

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia**

**REGULACION DE LA “SPIKE TIMING DEPENDENT
PLASTICITY” POR LA HIPERPOLARIZACION LENTA POST-
ESPIGA (sAHP).**

**TESIS DOCTORAL
MARCO FUENZALIDA NUÑEZ
MADRID 2007**

INDICE

GLOSARIO	2
RESUMEN	5
SUMMARY	7
I. INTRODUCCION	9
1. Hipocampo: aprendizaje y memoria.	11
2. Hipocampo y plasticidad a largo plazo.	13
3. Inducción y expresión de la LTP.	14
4. Spike Timing Dependent Plasticity (STDP) en circuitos neuronales.	17
5. Integración sináptica, dendrita y STDP.	19
6. Conductancias de K^+ activadas por Ca^{2+} .	21
II. OBJETIVOS	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. El hipocampo y rodajas de hipocampo.	33
2. Rodajas de hipocampo.	33
3. Soluciones de registro.	34
4. Registro electrofisiológicos.	35
5. Inducción de la sAHP.	36
6. Estimulación sináptica.	37
7. Protocolo de STDP.	37
8. Variaciones de Ca^{2+} intracelular.	38
9. Análisis.	39
IV. RESULTADOS	41
1. La inducción de la LTP por el protocolo de STDP es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDAR.	43
2. La LTP inducida por STDP se expresa postsinápticamente.	46
3. Inducción de la sAHP.	47
4. La activación de la sAHP puede inhibir la potenciación inducida por el STDP.	49
5. La sAHP inhibe la LTP en sinapsis proximales y distales.	55
6. El aumento de la conductancia de la membrana (g_m) que subyace a la activación sAHP inhibe la LTP.	57
7. La sAHP reduce la ventana temporal para la inducción de LTP.	60
8. La amplitud y forma de onda del PEPS regula la ventana temporal de coincidencia.	67
V. DISCUSIÓN	73
VI. CONCLUSIONES	85
VII. BIBLIOGRAFÍA	89

ABREVIATURAS

AMPAR: receptor ionotrópico de glutamato (sensibles al (RS)-ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionóico).

APV: D-aminophosphonovalerate, bloqueador de receptores de NMDA.

BAPTA: 1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane- N,N,N',N'-tetraacetic acid quelante de Ca^{2+}

CAMKII: proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina tipo 2.

CEPS: corriente excitatoria postsináptica.

Cm: capacitancia de la membrana.

DIC: diferencial interference contrast.

DPP: depresión por pares de pulso

EGTA: glycol-bis(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetic acid, quelante de Ca^{2+}

FPP: facilitación por pares de pulso

GABAaR: receptor ionotrópico de GABA (sensible al ácido gamma aminobutírico).

IP3: inositol trifosfato

LCR: líquido cefaloraquídeo artificial.

LTP: potenciación a largo plazo (del ingles Long Term Potentiation).

LTD: depresión a largo plazo (del ingles Long Term Depression).

NMDAR: receptor ionotrópico de glutamato (sensible al ácido N-Metil-D-Aspártico).

mAHP: hiperpolarización media post-espiga.

PEPS: potencial excitatorio postsináptico.

PAR: potencial de acción retropropagado.

PKA: proteína kinasa A.

Ri: resistencia axial o interna.

Rm: resistencia específica de la membrana.

sAHP: hiperpolarización lenta post-espiga.

Shunt: cortocircuito

SIU: unidad de aislamiento de estímulos.

STDP: Spike Timing Dependent Plasticity.

STP: potenciación a corto plazo

RESUMEN

El sustrato neuronal del aprendizaje depende de los cambios en la eficacia de las conexiones sinápticas. De acuerdo con el postulado de Hebb, las sinapsis incrementan su eficacia cuando las neuronas conectadas son activadas simultáneamente. Estudios recientes han demostrado que la asociación entre la actividad pre y postsináptica puede inducir potenciación a largo plazo (LTP) o depresión a largo plazo (LTD) dependiendo del orden temporal entre los potenciales de acción pre y postsinápticos. Este fenómeno es denominado “Spike Timing Dependent Plasticity” (STDP). En este trabajo se ha investigado la regulación de la STDP, mediada por la conductancia de K^+ dependiente de Ca^{2+} , que genera una hiperpolarización lenta post-espiga (sAHP). Utilizando registros de patch-clamp en neuronas piramidales de CA1 del hipocampo, generamos LTP, asociando un potencial postsináptico excitatorio (PESP) con un potencial de acción retropropagado (PAR) evocado por la inyección de corriente en el soma. Se observó una inhibición de la inducción de la LTP cuando el protocolo de STDP se aplicó durante la sAHP. Los resultados indican que el aumento de la conductancia de la membrana (g_m), asociada a la activación de los canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes que subyacen a la sAHP pueden actuar como un interruptor celular que modifica la duración de la ventana temporal entre el EPSP y el potencial de acción postsináptico determinando la polaridad y magnitud de las conexiones sinápticas en circuitos neuronales del sistema nervioso central.

ABSTRACT

The neuronal substrate of the learning depends on the changes in the effectiveness of the synaptic connections. In agreement with the postulate of Hebb, the synapse increases its effectiveness when the connected neurons are activated simultaneously. Recent studies have demonstrated that the association between pre and postsynaptic activity can induce long term potentiation (LTP) or long term depression (LTD) depending on the temporal order between the pre and postsynaptic action potentials. This phenomenon is termed “Spike Timing Dependent Plasticity” (STDP). In this work has been investigated the regulation of the STDP by the slow Ca^{2+} -dependent K^+ conductance that mediates the slow after-hyperpolarization (sAHP). Using patch-clamp recordings in CA1 pyramidal neurons of the hippocampus, we generated LTP by associating an excitatory postsynaptic potential with a back-propagated action potential evoked by the current injection in soma. The results show an inhibition of the induction of the LTP when the STDP was applied during sAHP. These effects were mediated by the increase of membrane conductance (g_m), associated to the activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels that underlie the sAHP. These results showed that the sAHP may act as a cellular switch that modifies the duration of the temporal window of coincidence between the EPSP and the postsynaptic action potential that determine the magnitude of the synaptic potentiation in central neural circuits.

I. INTRODUCCION

1. HIPOCAMPO: APRENDIZAJE Y MEMORIA.

El concepto de plasticidad sináptica involucra la capacidad del sistema nervioso de modificar sus circuitos de acuerdo a los requerimientos y desafíos con los que se enfrenta un organismo. Esta plasticidad se expresa, entre otras formas, como una variación en la eficacia de la transmisión sináptica. Numerosa evidencia experimental demuestra que cambios a mediano y largo plazo de la eficacia de las sinapsis son fundamentales para muchas funciones cerebrales, como la formación y refinamiento de conexiones neuronales durante el desarrollo (Katz y Shatz, 1996; Cline 1998), así como para procesos de aprendizaje y la memoria (Martines y Derrick, 1996; Malenka y Bear, 2004; Dan y Poo, 2004, 2006).

La primera hipótesis sobre el almacenamiento de información en el cerebro fue enunciada por Santiago Ramón y Cajal (1894), quien sugirió que el aprendizaje podría provocar cambios morfológicos permanentes en las conexiones sinápticas y que dichos cambios podrían servir como base física de la memoria. En 1949, Donald Hebb, sugirió que la memoria es almacenada como alteraciones en la eficacia de la transmisión sináptica. Su postulado señala: *“Cuando el axón de la neurona A está lo suficientemente cerca para excitar a la neurona B, y repetida y persistentemente se da esta excitación, algunos procesos de crecimiento o cambios metabólicos tienen lugar en una o en ambas células nerviosas, de tal manera que la eficacia de la célula A para excitar a B se incrementa”*. Además, Hebb postuló, que las conexiones sinápticas pueden fortalecerse cuando la neurona presináptica y postsináptica se activan sincronizadamente. Esta asociación temporal entre el disparo de una neurona presináptica y de una neurona postsináptica, que determina la naturaleza asociativa de esta forma potenciación de la transmisión sináptica ha sido descrita en varias estructuras cerebrales, incluyendo la neocorteza y el hipocampo (revisado en Bear y Kirkwood, 1993; Lynch, 2004; Zhou y Poo, 2004; Malenka y Bear, 2004).

El hipocampo es una estructura límbica cortical, que está involucrada en algunas formas de aprendizaje y memoria (Penfield y Milner, 1958). Evidencias clínicas y experimentales indican que el hipocampo cumple funciones importantes en la memoria espacial, memoria

explícita y consolidación de la memoria (Rempel-Clower et al. 1996). Esta estructura cerebral recibe información procedente de todas las áreas asociativas corticales a través de la vía perforante originada en la corteza entorrinal (Figura 1). Esta proyección es glutamatérgica y excitadora. Proyecciones principalmente colinérgicas, dopaminérgicas, noradrenérgicas ingresan al hipocampo por la vía de la fimbria-fórnix procedentes del *septum*, de la banda diagonal de Broca, el hipotálamo o los núcleos de la formación reticular (Amaral y Witter, 1989).

En términos generales el hipocampo puede dividirse en tres regiones principales: el giro dentado, el asta de Amón y el complejo subicular. Utilizando tinción de Golgi, Lorente de Nó dividió el Asta de Amón en 4 regiones denominadas CA1-CA4. Desde la capa externa a la medial el Asta de Amón contiene el *stratum alveus* y *oriens*, y las capas piramidales, *radiatum*, *lacunosum* y *moleculare*. A partir de zona distal de la región de CA1, se extiende el *subiculum* el cual es distalmente reemplazado por el pre y parasubiculum y la corteza entorrinal adyacente (Amaral and Witter, 1989; Witter et al., 2000).

En 1971 se demostró que el flujo de información de las vías excitadoras que unen cada región hipocampal es unidireccional (Anderson et al., 1971; revisado en Amaral y Witter, 1989). Este circuito denominado “circuito trisináptico”, tiene el inicio en las aferencias neuronales que alcanzan el hipocampo provenientes de la corteza entorrinal, a través de la vía perforante (VP) la cual proyecta predominantemente al giro dentado. Las células granulares del giro dentado, proyectan a través de las fibras musgosas a la región de CA3. Las células piramidales de CA3 emiten axones colaterales, denominadas Colaterales de Schaffer (CS) que proyectan directamente sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la región de CA1. Finalmente, las eferencias neuronales desde la región de CA1 salen a través del *alveus*, hacia el fornix, proyectando en gran parte hacia el área septal y la región subicular (Witter et al., 2000).

En este circuito trisináptico, las sinapsis glutamatérgicas mejor estudiadas son las que establecen las terminales axónicas de las CS y las neuronas piramidales de CA1. Estas sinapsis muestran una corriente sináptica que depende de la activación de receptores ionotrópicos

sensibles a (RS)-ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionóico (AMPA) y a el ácido N-Metil-D-Aspártico (NMDA). Los receptores de tipo AMPA median las corrientes excitadoras postsinápticas (EPSCs) rápidas, mientras los de tipo NMDA median el componente lento (Collingridge et al., 1983; Hestrin et al., 1990).

2. HIPOCAMPO Y PLASTICIDAD A LARGO PLAZO

Estudios electrofisiológicos y de lesiones han demostrado que la formación hipocampal juega un papel fundamental en el aprendizaje y memoria (Lynch, 2004; Bennette, 2000). El almacenamiento de la información en el hipocampo depende en gran medida de un incremento en la eficacia sináptica. En 1966, Anderson y Lomo observaron que breves trenes de estímulos eléctricos en los axones de la vía perforante incrementaban transitoriamente la eficacia de la transmisión en las sinapsis en las células granulares del giro dentado del hipocampo. Posteriormente, Bliss y Lomo (1973), encontraron que estimulando eléctricamente a alta frecuencia la vía perforante en conejos anestesiados se producía un incremento sostenido de la eficacia de la transmisión de las células granulares del giro dentado. Este resultado experimental constituye la primera descripción cuantitativa de la potenciación a largo plazo o LTP (del inglés *long-term potentiation*). En un trabajo posterior Bliss y Gardner-Medwin (1973), demostraron que este incremento en la eficacia de las células granulares podía ser de larga duración, permaneciendo días e incluso semanas. En 1975, Schwartzkroin y Wester, mostraron que la LTP también podía ser inducida por estimulación repetitiva del *stratum radiatum* en sinapsis de neuronas de CA1 del hipocampo, y que podía perdurar por varias horas. Estos trabajos pioneros y otros que le siguieron durante la década del 1970 confirmaron la naturaleza “Hebbiana” de esta forma de plasticidad sináptica (Landfield et al., 1978). Estos estudios confirmaron que la LTP, se trataba de un fenómeno no sólo duradero, sino también de inducción rápida y con características de asociatividad, de cooperatividad y de especificidad de estímulos, lo que convierte a la LTP en el sustrato biológico para diferentes formas de aprendizaje y la memoria.

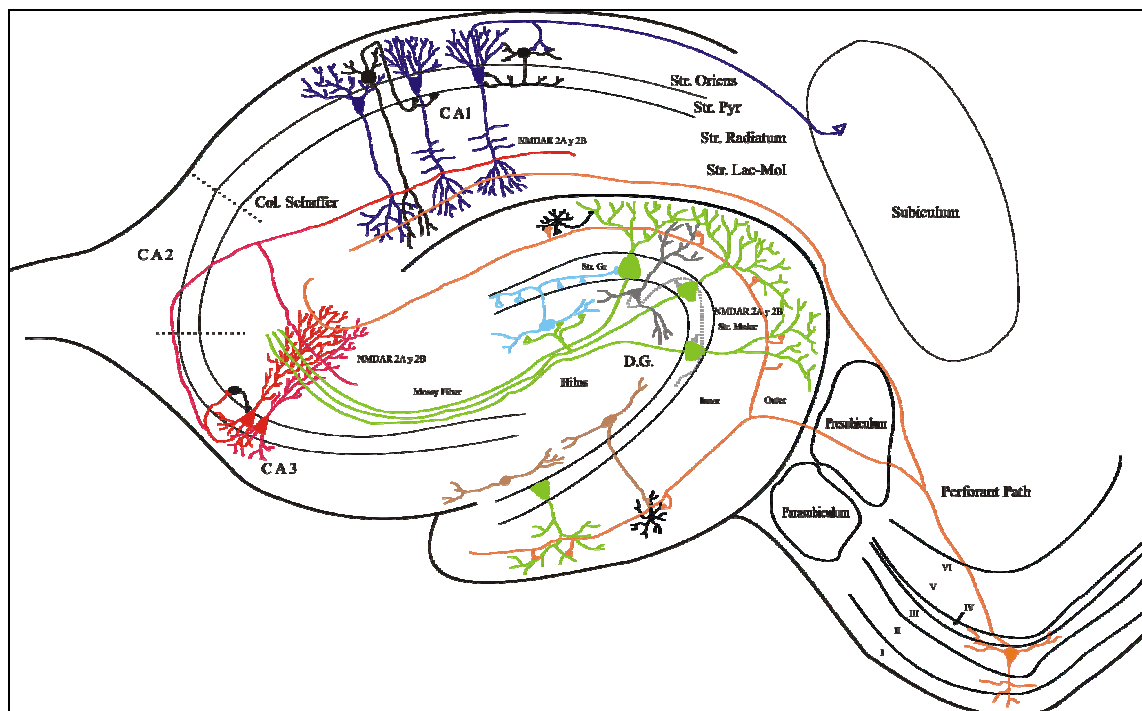


Figura 1. Esquema de la formación hipocampal. Diagrama esquemático que muestra las principales regiones que componen el hipocampo, sus principales aferencias y eferencia.

3. INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE LA LTP

En 1978, McNaughton y sus colaboradores, mostraron que la LTP de la vía perforante en las células granulares inducida por estimulación de alta frecuencia es un proceso cooperativo que requiere la activación conjunta de un gran número de axones. Está bien fundamentado que se requiere un umbral de intensidad de estimulación para obtener LTP. Bajo este “umbral de cooperatividad”, un tren de alta frecuencia resulta solamente en una potenciación a corto plazo (STP, del inglés, *short-term potentiation*) que se mantiene durante unos pocos minutos. McNaughton y sus colaboradores propusieron que la estrecha correlación entre el tren de alta frecuencia y la despolarización postsináptica podría ser el factor determinante en la inducción de la LTP asociativa. La razón que explica la existencia de este umbral fue determinada

posteriormente gracias a una serie de trabajos que establecieron que la inducción de la LTP está bajo el control de un subtipo de receptor para glutamato, el receptor NMDA (NMDAR). Una característica crucial e inusual de los NMDAR es que a potencial de reposo se mantiene silente, y no conduce a menos que la membrana sea despolarizada (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Cuando el glutamato se une al receptor el poro del receptor se abre pero la conducción del canal esta bloqueada por el ión Mg^{2+} extracelular (Watkins y Evans, 1981; McLennan y Liu, 1982). El bloqueo por Mg^{2+} es dependiente de voltaje, dado que cuando la membrana celular es despolarizada el Mg^{2+} es retirado, desbloqueando la boca del canal, permitiendo la conducción de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). La primera demostración del papel central de los NMDAR en la inducción de la LTP fueron realizados por Collingridge y sus colaboradores en 1984, quienes mostraron que el antagonista específico de los NMDAR, el D-aminophosphonovalerate (APV), bloquea la inducción de LTP en la región de CA1 en rodajas de hipocampo *in vitro*, sin afectar la respuesta evocada por la estimulación de las CS. Efectos similares del APV, fueron descritos posteriormente en el giro dentado y otras estructuras cerebrales (Morris et al., 1986; Errington et al., 1987; Feldman et al., 1999).

La dependencia de voltaje del NMDAR proporciona la base celular para la inducción de LTP: una sinapsis podría incrementar su eficacia sináptica, si y sólo si, la región de la dendrita en la cual se encuentra esta fuertemente despolarizada (Wigstrom and Gustafsson, 1985). Esta formulación proporciona una explicación inmediata, no sólo para la cooperatividad, sino que para otras dos importantes propiedades de la LTP, la asociatividad, la cual indica que una entrada sináptica débil, no puede por sí sola inducir LTP, sino que requiere combinarse con la estimulación tetánica de una vía convergente (McNaughton et al., 1978; Levy y Steward, 1979; Barrionuevo y Brown, 1983, Wigstrom y Gustaffson, 1985) y la especificidad, que se refiere a que sólo se potencian las entradas activadas durante la estimulación tetánica (Andersen et al., 1980; Lynch, 2004).

El NMDAR actúa como un detector de coincidencia, respondiendo a la activación simultánea de las fibras aferentes y una adecuada despolarización de las dendritas. La activación de los NMDAR induce un rápido aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} en la célula postsináptica, condición indispensable para la inducción de LTP. En 1983, Lynch y sus colaboradores, mostraron que la inyección intracelular de EGTA (un quelante de Ca^{2+}) en neuronas piramidales de CA1, bloquea la inducción de LTP por estimulación de la CS. Además se demostró que el aumento intracelular de Ca^{2+} es necesario y suficiente para inducir una prolongada potenciación de la transmisión sináptica (Malenka et al., 1988).

Una vez que se estableció que la activación de los NMDAR produce un aumento del Ca^{2+} citosólico y que este era el factor crítico en la inducción de la LTP, la atención se centró en el análisis de las consecuencias celulares de este incremento de Ca^{2+} . Se ha demostrado que la aplicación de inhibidores de proteínas quinasas bloquean la inducción de LTP, implicando directa o indirectamente a los diferentes tipos de proteínas quinasas postsinápticas en este fenómeno (Lisman et al., 2002; Esteban et al., 2003). El sensor primario de Ca^{2+} intracelular es la Ca^{2+} calmodulina quinasa II (CaM-KII). Experimentos genéticos y farmacológicos han demostrado que la CAM-KII es indispensable para la inducción y expresión de la LTP (Fukunaga et al. 1993; Otmakhov et al., 1997). CaMKII es una proteína muy abundante en el hipocampo que se encuentra co-localizada con los NMDAR en la densidad postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas, pudiendo modular la actividad de canales iónicos y otras proteínas quinasas implicadas en la transmisión sináptica y en la expresión y mantención de la potenciación sináptica (Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989).

El principal mecanismo de expresión de LTP, implica el incremento en el número de receptores AMPA (AMPA) en la membrana postsináptica, que depende del tráfico intracelular de estos receptores de glutamato, proceso que es regulado por la activación de la CAM-KII (Malenka y Nicoll, 1999; Malinow y Malenka, 2002). Se ha determinado que otro mecanismo implicado en la expresión de LTP, también dependiente de la actividad de la CAM-KII, es la

modificación de las propiedades biofísicas de la membrana postsináptica, expresadas como cambios de la conductancia de los AMPAR por fosforilación o desfosforilación de sus subunidades (Malenka y Nicoll, 1999, Soderling y Derkach, 2000). Además, existe numerosa evidencia experimental que muestra que cambios presinápticos pueden contribuir a la potenciación sináptica dependiente de NMDA-R (Malinow y Tsien, 1990; Bekkers y Stevens, 1990; Choi et al., 2000; Paré, 2004). Sin embargo esta forma de LTP presináptica es disparada postsinápticamente e implica cambios presinápticos relativamente rápidos que podrían depender de mensajeros retrógrados (óxido nítrico, ácido araquidónico o neurotrofinas) que comunican la membrana postsináptica y la terminal presináptica (revisado en Poo, 2001).

4. SPIKE TIMING DEPENDENT PLASTICITY (STDP) EN CIRCUITOS NEURONALES.

Como sugirió Hebb, numerosa evidencia experimental demuestra que la inducción de LTP en sinapsis excitatorias requiere la coincidencia temporal, entre el disparo de potenciales de acción presinápticos, que liberan glutamato el cual activa receptores postsinápticos generando potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS) y una fuerte despolarización postsináptica. De esta forma se ha demostrado que la estimulación de baja frecuencia acoplada con una despolarización postsináptica (*"pairing protocol"*), puede inducir LTP en el hipocampo y en diferentes áreas corticales (Kelso et al., 1986; Sastry et al., 1986, Wigström et al., 1986; Malenka y Nicoll, 1999; Lisman y Spruston, 2005). Sin embargo, este protocolo de asociación, con una despolarización postsináptica del orden de segundos o minutos, es mucho más prolongada que la escala de tiempo utilizada por las neuronas, que se caracteriza por el disparo de potenciales de acción en una ventana temporal de milisegundos. La retropropagación de potenciales de acción por el árbol dendrítico proporciona una señal despolarizante precisa capaz de informar a las sinapsis cuando la célula postsináptica ha disparado, pudiendo jugar un papel activo en las modificaciones sinápticas asociativas (Stuart y Sakmann, 1994; Stuart et al., 1997;

Paulsen y Sejnowski, 2000). Experimentos recientes en rodajas de corteza cerebral e hipocampo, han revelado la importancia que tiene el orden temporal de la actividad pre y postsináptica para inducir modificaciones en las conexiones sinápticas (Magee y Johnston, 1997; Markram et al., 1997). Estos estudios revelaron que un mismo par de potenciales de acción pre y postsinápticos pueden disminuir o aumentar la fuerza de las sinapsis. Específicamente, la presentación repetitiva de una espiga presináptica seguida de cerca de una espiga postsináptica induce LTP. Al contrario, si la espiga postsináptica precede a la presináptica se induce depresión a largo plazo (LTD). Estas conclusiones iniciales han sido confirmadas en diferentes preparaciones, incluyendo cultivos de neuronas piramidales de hipocampo (Debanne et al., 1998; Bi y Poo, 1998), sinapsis retinotectales *in vivo* (Zhang et al., 1998; Mu y Poo, 2006) rodajas de corteza cerebral e hipocampo (Feldman, 2000; Wittenberg y Wang; 2006; Nevian y Sakmann, 2006) y neuronas piramidales de corteza visual *in vivo* (Meliza y Dan, 2006). Dada sus características, a esta forma de inducir plasticidad sináptica se la ha denominado “Spike Timing Dependent Plasticity (STDP) (Song et al., 2000; Abbott y Nelson, 2000; Revisado en Dan y Poo, 2004, 2006).

La característica más notable del STDP es su dependencia del orden temporal de las espigas pre y postsinápticas. Dado que la inducción de STDP, exhibe componentes similares a la LTP y LTD, es posible que utilice los mismos mecanismos que subyacen a la LTP asociativa (Kelso et al., 1986; Wigstrom et al., 1986) y la LTD homosináptica (Dudek y Bear 1992; Mulkey y Malenka, 1992). En la mayoría de las sinapsis estudiadas, la inducción de STDP requiere la activación de NMDAR y de potenciales de acción retropropagados en las dendritas (Magee y Johnston, 1997; Markram et al., 1997; Debanne et al., 1998; Bi y Poo, 1998). La explicación directa para la dependencia temporal de la STDP está en la coincidencia entre la unión del glutamato a los NMDAR y la espiga retropropagada en la dendrita que determina el nivel de Ca^{2+} requerido para inducir LTP o LTD. LTP se induce cuando la espiga presináptica es seguida por una espiga postsináptica de modo que el glutamato activa el NMDAR y la despolarización

remueve el Mg^{2+} desde el NMDAR, provocando un gran aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, mientras que la generación de la espiga postsináptica seguida de una espiga presináptica induce LTD, probablemente debido a un pequeño aumento del Ca^{2+} intracelular por apertura de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes y/o una limitada activación de los NMDAR o a la activación de receptores metabotrópicos para glutamato (Revisado en Dan y Poo, 2004, 2006; Nevian y Sakmann, 2006) .

El influjo de Ca^{2+} a través de los NMDAR activa distintas cascadas de señalización intracelular que conducen a LTP o LTD (Malinow y Malenka 2002). Estudios recientes, utilizando registros de la señal de Ca^{2+} con sondas fluorescentes, han demostrado que el influjo de Ca^{2+} , a través de NMDAR y canales dependientes de voltaje, muestra una sumación supralineal cuando la espiga presináptica antecede a la postsináptica y es sublineal cuando la espiga postsináptica antecede a la presináptica (Yuste y Denk, 1995; Koester y Sakmann, 1998; Schiller et al., 1998).

Debido a que la constante de tiempo de unión del glutamato al NMDAR es mucho mas larga que 20 milisegundos (Mayer et al., 1984), la ventana temporal de coincidencia para inducir LTP puede depender de mecanismos celulares adicionales: la activación de canales de Ca^{2+} y de reservorios intracelulares de Ca^{2+} o la activación dependiente de Ca^{2+} de enzimas intracelulares (CaM-KII, Calmodulina, PKA) y la modulación de canales de K^+ dendríticos, que permiten la invasión sináptica de espigas retropropagadas (Hoffman et al., 1997; Watanabe et al. 2002; revisado en Dan y Poo, 2004, 2006).

5. INTEGRACIÓN SINÁPTICA, DENDRITA Y STDP.

Como se ha destacado, un elemento clave para la inducción de la STDP de sinapsis excitatorias involucra la asociación temporal entre potenciales de acción presinápticos y la retropropagación de potenciales de acción por el árbol dendrítico. Para iniciar un potencial de acción los PEPS deben propagarse desde su zona de generación a la zona de iniciación del

potencial de acción, el cono axónico (Stuart y Sakmann, 1994; Stuart et al., 1997). La propagación de potenciales sinápticos depende de las propiedades pasivas de la neurona, la estructura del árbol dendrítico y de canales iónicos presentes en las dendritas. El proceso de integración sináptica es potencialmente afectado por la propia generación de potenciales de acción, el cual puede “cortocircuitar” (shunt) el potencial sináptico y alterar la disponibilidad de conductancias activadas por voltaje en la neurona. La capacidad de un potencial sináptico de despolarizar la membrana celular hasta alcanzar el umbral de generación del potencial de acción en el cono axónico depende del tamaño del PEPS y de cual es su atenuación mientras se propaga por el árbol dendrítico. Tres propiedades eléctricas pasivas de las dendritas contribuyen a la estructura electrotónica del árbol dendrítico, la resistencia específica de la membrana (R_m), la capacitancia de la membrana (C_m) y la resistencia intracelular (R_i). Por ejemplo, valores elevados de R_i y valores bajos de R_m incrementan la atenuación de los potenciales sinápticos que se propagan por la dendrita. Además, esta atenuación depende de la frecuencia de la señal, siendo mayor la atenuación para señales más rápidas. (Rall, 1967; Spruston et al., 1994). Un factor crítico que afecta la sumación de potenciales sinápticos es la constante de tiempo de la membrana (τ_m), la cual esta dada por el producto de R_m y C_m . Dado que C_m es una constante biológica, las variaciones en la τ_m , dependen fundamentalmente de cambios en R_m (Spruston y Johnston, 1992).

Además de su estructura electrotónica las dendritas de las neuronas piramidales del hipocampo presentan una gran variedad de canales iónicos dependientes de voltaje o Ca^{2+} . Las conductancias iónicas de Na^+ y Ca^{2+} activadas por voltaje favorecen la propagación de los PEPSs y de potenciales de acción retropropagados (PAR), ya que despolarizan la membrana. Por el contrario, las conductancias de K^+ activadas por voltaje o Ca^{2+} atenúan la propagación de esos potenciales, hiperpolarizando las dendritas y aumentando la conductancia de membrana (Stuart y Sakmann, 1994; Hoffman et al., 1997; Migliore et al., 1999; Häusser et al., 2000; Johnston et al.,

2000). Algunas de estas conductancias iónicas están distribuidas uniformemente, mientras que otras no, lo que hace que las propiedades eléctricas del árbol dendrítico sean distintas a las del soma. Por ejemplo, en neuronas piramidales del hipocampo, los canales de Na^+ dependientes de voltaje presentan una densidad constante a lo largo de la dendrita, mientras que los canales de Ca^{2+} y K^+ presentan una distribución heterogénea que depende del tipo de canal. En neuronas piramidales de CA1, los canales de K^+ activados por voltaje, responsables de la corriente transitoria *I_a*, están localizados principalmente en las regiones más distales de las dendritas apicales. Estos canales desempeñan un importante papel en el control de la retropropagación de los potenciales de acción axónicos hacia zonas más distales de las dendritas.

En resumen, las propiedades y la distribución de estos canales iónicos en el axón, el soma y las dendritas determinan las características funcionales de los distintos territorios y su capacidad para regular el flujo de señales, así como la iniciación y propagación de la señal eléctrica que resultará finalmente en la generación de un potencial de acción propagado por el axón y retropropagado por la dendrita (Hoffman et al., 1997; Migliore et al., 1999; Johnston et al., 2000).

6. CONDUCTANCIAS DE K^+ ACTIVADAS POR Ca^{2+} .

Las conductancias de K^+ activadas por Ca^{2+} , juegan un papel fundamental en la regulación de la excitabilidad neuronal, participando en la adaptación de la frecuencia de disparo y la repolarización de los potenciales de acción (Sah y Faber, 2002). Existen varios tipos de conductancias de K^+ activadas por Ca^{2+} , que se han clasificado en tres familias: BK, IK y SK, de acuerdo a la conductancia unitaria de los respectivos canales iónicos, la sensibilidad a la concentración de Ca^{2+} citosólico libre, la cinética, su dependencia de voltaje y su farmacología (Sah, 1996). Los canales BK tienen una gran conductancia unitaria (200 a 400 pS) y son dependientes de voltaje (Marty, 1989).

Los canales BK son bloqueados por caribdotoxina, iberiotoxina, paxilina y tetraetilamonio (Blatz y Mangleby, 1987; Araque y Buño, 1995), y son los responsables de la repolarización rápida de la membrana que sigue a un potencial de acción. Se ha determinado que en neuronas, estos canales están asociados fundamentalmente a canales de Ca^{2+} tipo N. Los canales IK, presentan una conductancia intermedia (20-100 pS) y son sensibles a caribdotoxina e insensibles a apamina e iberiotoxina (Logsdon et al., 1997).

Los canales SK son de baja conductancia unitaria (5-20 pS) y son independientes de voltaje (Blatz y Magebly, 1986). Los canales SK son sensibles al Ca^{2+} y están asociados principalmente a canales Ca^{2+} de tipo L (Blatz y Magebly, 1986; Borde et al, 1999; Bowden et al., 2001). Existen, al menos, dos tipos de canales SK uno sensible a apamina y bicuculina, responsable de la generación de la post-hiperpolarización media inducida por la corriente llamada mIAHP (Lankaster y Adams, 1986) y otro insensible a apamina y bicuculina y con una cinética más lenta, que genera la post-hiperpolarización lenta mediada por la corriente sIAHP (del inglés, slow after hyperpolarization) que siguen al tren de potenciales de acción.

La sIAHP es una corriente de K^+ que se activa por el influjo de Ca^{2+} a través de canales tipo L y el subsecuente aumento de concentración intracelular de Ca^{2+} . Se caracteriza por una cinética lenta, tanto en su fase de activación, como en la fase de desactivación (Borde et al., 1999; Bonansco y Buño, 2003; Wu et al., 2004). La sIAHP es insensible a cambios de voltaje y es modulada por distintos neurotransmisores como acetilcolina, glutamato, noradrenalina, serotonina y hormonas como la CRH (hormona liberadora de corticotropina), VIP (péptido intestinal vasoactivo) y CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) (Lorenzon y Foehring, 1992; Bond et al., 1999; Melyan et al., 2002; Lankaster et al., 2006). Estas sustancias ejercen sus efectos a través de receptores acoplados a proteínas G y distintas cascadas de segundos mensajeros que modulan la actividad de diferentes tipos de proteínas quinasas y fosfatasas.

Varios estudios han mostrado que la sAHP, juega un papel muy importante en la modulación de la excitabilidad neuronal y plasticidad sináptica (Sah y Bekkers, 1996; Borde et al., 1999; Bonansco y Buño, 2003; Wu et al., 2004; Le Ray et al., 2004; Fernández de Sevilla et al., 2007). Se ha sugerido, que en neuronas piramidales de CA1, los canales que subyacen a la sAHP están ubicados principalmente en el soma y la rama principal de las dendritas apicales (Sah y Bekkers, 1996; Johnston et al., 2000). Se describió que la sAHP puede regular la eficacia sináptica cortocircuitando los PEPS (Sah y Bekkers, 1996; Borde et al., 1999; Lancaster et al., 2001) o facilitando el rebloqueo por Mg^{2+} del receptor de NMDA (Wu et al., 2004). Se demostró además, que la estimulación de alta frecuencia o a frecuencia del ritmo theta de en neuronas piramidales de CA1 puede inducir facilitación o depresión de la sAHP (Kaczorowski et al., 2003; Le Ray et al., 2004). De esta forma, la depresión o potenciación de la sAHP no sólo puede modificar la excitabilidad neuronal, sino que puede alterar la propagación hacia el soma de señales sinápticas que se producen en zonas más distales de las dendritas y controlar de la propagación retrógrada de potenciales de acción axónicos, mecanismos celulares fundamentales para la regulación de la plasticidad sináptica, substrato celular de los mecanismos de memoria y aprendizaje.

II. OBJETIVOS

Se ha determinado que la activación de la sAHP en neuronas piramidales de hipocampo puede regular la excitabilidad y la propagación de señales bioeléctricas en las dendritas (Sah y Bekkers, 1996; Bonansco y Buño, 2003; Le Ray et al., 2004; Fernández de Sevilla et al 2007). La propagación de estas señales bioeléctricas por el árbol dendrítico depende fundamentalmente de la estructura electrotónica y la distribución de los canales iónicos en la dendrita. Debido a que se ha demostrado que los canales K^+ dependientes de Ca^{2+} que subyacen a la sAHP pueden regular la propagación de señales en las dendritas neuronas piramidales de CA1, el objetivo general de este estudio fue:

Analizar el papel de la sAHP en la regulación de la ventana temporal de coincidencia durante la cual la asociación entre un potencial excitatorio postsináptico y un potencial de acción retropropagado induce LTP en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo.

La característica más notable de la inducción de LTP por protocolos de STDP es la dependencia temporal de los potenciales pre y postsinápticos. En la mayoría de las sinapsis estudiadas el intervalo de coincidencia de la STDP ronda la decena de milisegundos (Magee y Johnston, 1997; Markram et al., 1997; Bi y Poo, 1998). Dado que se desconoce la ventana temporal de coincidencia necesaria para inducir LTP en las sinapsis entre las colaterales de Schaffer (CS) y neuronas piramidales de CA1, el primer objetivo específico fue:

***i)* Determinar la ventana temporal de coincidencia entre el PEPS y el PAR necesaria para inducir LTP en sinapsis entre las CS y neuronas de CA1 del hipocampo. Analizar los mecanismos de inducción de la LTP por el protocolo de STDP y determinar si la expresión de esta potenciación sináptica es de origen presináptico o postsináptico.**

Como se ha mencionado anteriormente la sAHP puede regular la generación y propagación de los potenciales sinápticos y los potenciales de acción en neuronas piramidales de CA1 (Madison y Nicoll, 1984; Lancaster y Adams, 1986; Sah y Bekkers, 1996; Borde et al., 1999; Buño et al., 2004). De manera que bloqueando o modificando la amplitud y/o el curso temporal de estas señales bioeléctricas que se propagan por la dendrita, la sAHP puede inhibir la inducción de potenciación evocada por el protocolo de STDP. Para determinar si la sAHP es capaz de regular la asociación PEPS-PAR, necesaria para inducir LTP los siguientes objetivos fue:

ii) Determinar los efectos de la activación de la sAHP sobre la inducción de la LTP por el protocolo de STDP

iii) Determinar los cambios inducidos por la sAHP sobre la amplitud, forma y propagación de los PEPS evocados por la estimulación de las CS y de los PA retropropagados en dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1 de hipocampo.

Los cambios inducidos por la sAHP sobre los PEPS y el PAR pueden ser debidos al aumento de la conductancia de la membrana (gm) y/o a la hiperpolarización de la membrana neuronal generada durante la activación de la sAHP. Para distinguir entre estas posibilidades el siguiente objetivo fue:

iv) Determinar si el aumento de la gm o la hiperpolarización o la combinación de ambos mecanismos que subyace a la sAHP son los responsables de inducir cambios sobre los PEPS y los PAR.

Se ha demostrado que el pulso despolarizante, utilizado para generar la sAHP, también induce la activación del componente medio de AHP, la mAHP. Se ha demostrado que la inhibición de este componente puede incrementar la excitabilidad y reducir el umbral de inducción de la LTP en neuronas piramidales de hipocampo. Además, en dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1 se ha demostrado que la corriente catiónica I_h puede acelerar la cinética de los PEPS en la dendrita apical y modificar la integración sináptica (Nolan et al., 2004; Magee 1999). Debido a que la mAHP es activada por el pulso despolarizante que induce la sAHP y que la hiperpolarización que subyace a la sAHP puede activar la corriente I_h el siguiente objetivo fue:

v) Analizar si la mAHP y la corriente catiónica I_h modifican el umbral de inducción de LTP por el protocolo de STDP.

Una reducción en la amplitud y duración de los PEPS inducida por la sAHP, puede reducir la ventana temporal de coincidencia necesaria para inducir LTP. De manera que es posible que aumentando la amplitud y duración de los potenciales sinápticos la ventana temporal de coincidencia del STDP aumente. Para determinar si la amplitud y curso temporal de los PEPS son determinantes en la regulación de la ventana temporal de coincidencia para inducir LTP

vi) Analizar si la CTZ, una droga que induce un importante incremento de la amplitud y duración de los PEPS AMPA es capaz de aumentar la ventana temporal de inducción de LTP por STDP y revertir la inhibición de la inducción de LTP por la sAHP.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. EL HIPOCAMPO.

El hipocampo es un modelo ampliamente utilizado para la investigación de la LTP (Bliss y Collingridge, 1993). La formación hipocampal juega un importante papel en el aprendizaje y la memoria (Collingridge y Bliss, 1995; Frey y Morris, 1998) y fue la primera estructura donde se describió experimentalmente la LTP (Bliss y Lomo, 1973). Utilizando la técnica de rodajas del sistema nervioso, un gran número de estudios *in vitro* han ampliado las posibilidades de investigar las propiedades eléctricas en circuitos sinápticos con organizaciones celulares muy precisas. Es el caso de las rodajas transversales del hipocampo, donde la organización laminar de sus componentes neuronales permite que gran parte del circuito sináptico permanezca intacto, facilitando así el registro intracelular y la estimulación selectiva de sus vías aferentes, así como la aplicación de drogas. El estudio de la plasticidad sináptica en el hipocampo ha permitido establecer una serie de paradigmas experimentales de procesos cognitivos superiores, tales como la plasticidad sináptica a largo.

2. RODAJAS DE HIPOCAMPO.

Las rodajas transversales de hipocampo (**Figura 2**) fueron obtenidas de ratas Wistar de 13 a 18 días postnatal de ambos sexos. Brevemente, los animales fueron decapitados y sus hemisferios expuestos por craneotomía. El encéfalo se extrajo rápidamente por disección roma y sumergidos en líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) frío (≈ 4 °C). La composición iónica del LCR de disección en mM fue: 124.00 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.00 Mg₂SO₄, 26.00 NaHCO₃, 2.00 CaCl₂, 10.00 glucosa. La rápida disección e inmediato enfriamiento son necesarios para evitar el estrés oxidativo debido al incremento de la actividad metabólica de las neuronas causada por el método de preparación. Una vez que el bloque de tejido fue sumergido en LCR frío, se realizaron cortes transversales de 350 - 400 μ m de espesor, en un vibratomo (Pelco, 3000). Las rodajas obtenidas se incubaron durante 30 a 60 minutos en LCR burbujeado permanentemente con carbógeno (95 % O₂

– 5 % CO₂), manteniendo el pH estable (7.4) y a temperatura ambiente (23-25 °C). Una vez incubadas, las rodajas se transfirieron a la cámara de registro, fijada a un microscopio “upright” (Olympus; BX51WI, Tokio Japón), equipado con el sistema de video microscopia de infrarrojo DIC (del inglés “*differential interference contrast*”) y un objetivo de inmersión 40x. El sistema se encontraba sobre una mesa antivibratoria (Newport), equipada con un dispositivo neumático de amortiguación, que posibilitaba la obtención de registros estables a largo plazo impidiendo la transmisión de vibraciones ambientales a la preparación. A su vez todo el sistema se encontraba encerrado en una jaula de Faraday, que lo aislaba eléctricamente evitando así, la introducción de artefactos eléctricos externos en los registros obtenidos. Las rodajas fueron perfundidas con LCR (1 ml/minuto a temperatura ambiente), de forma que el recambio de LCR se completó en aproximadamente 5 minutos.

3. SOLUCIONES DE REGISTRO.

La composición iónica del LCR de registro, fue la misma utilizada en la mantención de las rodajas, en mM: 124.00 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.00 Mg₂SO₄, 26.00 NaHCO₃, 2.00 CaCl₂, 10.00 glucosa y pH 7.4. Durante las diferentes condiciones experimentales se le añadieron al LCR diferentes tipos de drogas según el requerimiento de cada experimento. La picrotoxina (PTX, 50 µM) fue añadida al LCR en todos los experimentos en orden a eliminar la actividad inhibitoria, mediada por receptores de GABA_A (GABA_AR). La solución intracelular utilizada en este estudio contenía (en mM): 135 KMeSO₄, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 Na₂-ATP, 0.4 Na₃-GTP, ajustada a un pH de 7.2 – 7.3 con KOH. En algunos experimentos la solución intracelular contenía heparina (5 mg/ml), ruthenium red (100 µM) o BAPTA (50 mM). Las restantes drogas utilizadas fueron APV (50 µM), nimodipina (10µM), thapsigargina (1 µM), ZD7288 (50 µM), isoproterenol (10 µM) apamina (100 nM) y ciclothiazida (100 µM).

El APV, PTX, ZD7288, thapsigargina, isoproterenol, apamina, heparina y reuthenium red fueron disueltos en agua destilada. Mientras que nimodipina y ciclothiazida fueron disueltas en

DMSO (0.01%). BAPTA fue diluido directamente en la solución intracelular de registro. El DMSO a la concentración utilizada no tuvo efectos sobre las respuestas sinápticas y tampoco sobre las conductancias postsinápticas (n=3). Las sales y las drogas fueron adquiridas en Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain), Tocris (Biogen Científica, Madrid, Spain) y laboratorios Alomone (Jerusalem, Israel).

4. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Una vez situada la rebanada en la cámara de registro, los registros electrofisiológicos se obtuvieron bajo visualización directa del soma de neuronas piramidales de CA1 (**Figura 2**). Una vez que las neuronas piramidales de CA1 fueron identificadas, se realizaron los registros electrofisiológicos, con la técnica de “patch-clamp” en su configuración de célula entera, utilizando las modalidades de fijación de corriente (con el objeto de medir los cambios del potencial de membrana neuronal) y en fijación de voltaje (con el objeto de medir los cambios de las corrientes iónicas de membrana). Los microelectrodos de registros, utilizados en este estudio estaban constituidos por un alambre de plata clorurada (Ag/AgCl) incluido en una micropipeta de vidrio/borosilicato (diámetro externo-interno: 1.5 - 0.84 mm) con capilar interno, fabricadas con un estirador de pipetas (Sutter Instrument Co., P-80) y rellenas con la solución intracelular (ver soluciones de registro). Las micropipetas tuvieron una resistencia entre 3-8 M Ω , con comportamiento óhmico. Los electrodos de registro fueron conectados a un amplificador Axoclamp-2B (Axon Instrument, Foster City, CA). En los experimentos de fijación de voltaje el potencial de “holding” (V_h) fue ajustado a -65 mV. En condición de fijación de corriente el potencial de membrana fue ajustado a un valor similar inyectando corriente DC. En fijación de voltaje la resistencia en serie se compensó en ~80 % y las neuronas fueron aceptadas solo cuando la resistencia del sello fue > 1G Ω y la resistencia en serie no cambia más de un 20% durante el experimento. Los registros en fijación de corriente y voltaje fueron filtrados a 3 KHz y muestreados entre 6 y 10 KHz, a través de un conversor análogo-digital Digidata 1322a

(Molecular Device, Chicago, IL. USA). Como electrodo de referencia se empleó un electrodo epoxy relleno de KCl y con una resistencia de 2.7 K Ω (World Precision Instruments, Inc.). El programa p-Clamp (Molecular Device, Chicago, IL. USA.), se utilizó para generar los estímulos y pulsos de corrientes transmembrana, registrar las respuestas neuronales y para el posterior análisis de los datos.

5. INDUCCIÓN DE LA SAHP.

Utilizando la modalidad de fijación de corriente, la sAHP fue activada por un pulso de corriente despolarizante (intensidad 0.5 nA, duración 200 ms) aplicado a través del electrodo de registro. El pulso despolarizante genera un tren de potenciales de acción (7.4 ± 2.3 , n=41) al que le sigue una hiperpolarización del potencial de membrana que presenta dos componentes, una post-hiperpolarización media (mAHP) y una lenta sAHP. La sAHP simulada fue generada inyectando a través de la pipeta de registro la forma de onda, obtenida el promedio de una sAHP “real”. La intensidad de la corriente inyectada fue ajustada para generar una sAHP simulada, de amplitud y curso temporal similar a la sAHP real.

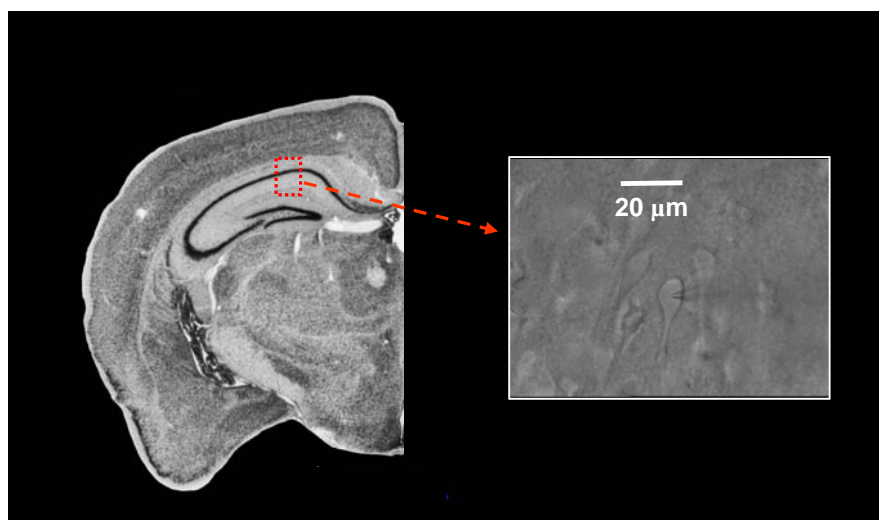


Figura 2. Rodajas de hipocampo y registros electrofisiológicos.

6. ESTIMULACIÓN SINÁPTICA.

Tanto las corrientes excitadoras postsinápticas (CEPS) como los potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS) fueron evocados estimulando las colaterales de Schaffer (CS) con un electrodo extracelular bipolar (60 μm de diámetro y una separación de las puntas 100 μm), puesto en el *stratum radiatum* a una distancia aproximada de 150 μm desde la capa piramidal y a 50 μm del tronco principal de la dendrita apical de la neurona piramidal de registro. Para comparar los PEPS entre diferentes experimentos, la intensidad de estimulación fue ajustada para evocar PEPS cuya amplitud oscilaba entre 4 y 6 mV. Para la estimulación sináptica se utilizó un estimulador Grass S88 y una unidad de aislamiento de estímulo SIU (Quincy, MA, USA). En algunos casos un grupo separado de fibras de las CS fue estimulado con un segundo electrodo colocado a 250 μm de la capa piramidal y a 50 μm del árbol dendrítico, que estaba conectado a un estimulador Grass S88 y una SIU (Quincy, MA, USA). Para determinar que ambos electrodos estimulaban grupos de fibras independientes se utilizó la prueba de facilitación por pulsos pareados entre los dos sitios de estimulación.

7. PROTOCOLO DE STDP.

El registro basal de las corrientes excitatorias postsinápticas (CEPS), se extendió por un período de 10 minutos a una frecuencia de estimulación de 0.3 Hz. Transcurrido este período, el registro fue cambiado al modo de fijación de corriente y un único PEPS fue asociado con un único potencial de acción postsináptico evocado por un pulso de corriente transmembrana, que tenía una duración de 3 ms y de 0.5 a 2 nA de intensidad, aplicada a un intervalo de entre 2 y 40 ms del PEPS a través de la pipeta de registro (**Figura 3**). Este protocolo de inducción de LTP fue repetido 60 veces a una frecuencia de 1 Hz (Bi y Poo, 1998). Terminado este período de inducción de LTP, el registro fue restituido a fijación de voltaje, y se registraron la CEPS por un período superior a 30 min, a una frecuencia de estimulación de 0.3 Hz. El curso temporal de la potenciación en fijación de voltaje, fue expresado como el porcentaje de cambio de amplitud de las CEPS, con respecto a la

respuesta control (registro basal). Los cambios en la resistencia de entrada fueron monitoreados durante todo el período de registro, aplicando un pulso de corriente despolarizante de 10 pA de intensidad y 100 ms de duración. Los registros fueron detenidos y los datos descartados, cuando la resistencia de entrada cambió más de un 20%, con respecto a los valores del registro basal.

8. VARIACIONES DEL Ca^{2+} INTRACELULAR.

Simultáneamente a los registros electrofisiológicos de la sAHP, se midieron las variaciones del Ca^{2+} intracelular mediante el uso de indicadores fluorescentes sensibles a Ca^{2+} (Grynkiewicz y col., 1985). La técnica consiste en el llenado de la célula con un indicador fluorescente sensible a Ca^{2+} , que tras el proceso de unión de Ca^{2+} sufre un cambio en su espectro de excitación y/o emisión de fluorescencia. Las células fueron cargadas con Fluo 3 (100 μM) junto a la solución intracelular de la pipeta de registro. Los registros de la señal de Ca^{2+} fueron realizados después de 15 minutos de entrar en la configuración de célula entera con la técnica de patch-clamp, permitiendo que el indicador de Ca^{2+} se equilibrara uniformemente en el soma y las dendritas. Las células fueron iluminadas a 490 nm durante 40 ms a una frecuencia de 0.33 Hz, con un sistema de fluorimetría Polychrome IV (TILL Photonics), equipado con un grupo de filtros (Chroma Thecnology Corp.) optimizados para detectar el indicador Fluo 3. Una cámara Cohu fue utilizada para obtener 3 imágenes por segundo. Para realizar el registro y el análisis de los datos se utilizó el software “Imaging Workbench” (versión 5.0, INDEC System Inc, Santa Clara, CA). Las imágenes fueron presentadas como el porcentaje de cambio de fluorescencia relativo a la fluorescencia basal ($\Delta F/F_0$), que proporciona un índice de los cambios concentración del Ca^{2+} intracelular. Para evitar mediciones erróneas durante los experimentos se corrigió el “bleaching” (fotoblanqueado) del indicador, sustrayendo la señal medida de la señal obtenida bajo las mismas condiciones pero cuando la célula no fue estimulada. El registro de los cambios del Ca^{2+} intracelular en el tiempo fueron obtenidos “off-line” desde el soma neuronal.

9. ANÁLISIS.

Para el análisis de los registros se utilizó el programa Clampfit perteneciente al conjunto de programas denominado “pCLAMP 9” (Molecular Device Corporation). Para la representación de las gráficas se utilizó el programa de computador “Origin” (versión 7.0, Origin Lab Corp, MA, USA).

Para estudiar si el origen de los cambios de amplitud de las CEPS son pre o postsináptico se utilizó la prueba de facilitación por pulsos pareados (FPP) y el método de análisis de la varianza de la amplitud de los CEPS (Creager et al., 1980; Faber y Korn 1991; de Sevilla et al., 2002; Cabezas y Buño, 2006).

El índice de facilitación por pares de pulsos (FPP), $(R2-R1)/R1$, donde R1 y R2 fueron los picos de amplitud del primera y segunda CEPS respectivamente, fue usado para calcular la magnitud de las modificaciones en la FPP.

Los cambios en la varianza de la amplitud de CEPS fueron estimados utilizando el método del coeficiente de variación al cuadrado $(1/CV^2)$ (Bekkers y Stevens 1990; Malinow y Tsien, 1990; de Sevilla et al., 2002). El coeficiente de variación libre de ruido fue (CV_{NF}) de las respuestas sinápticas fue estimado con el formalismo:

$$CV_{NF} = (\sqrt{\delta_{EPSC}^2 - \delta_{noise}^2})/m,$$

Donde la δ_{EPSC}^2 y la δ_{noise}^2 son la varianza del pico de los CEPS y la línea base, respectivamente y m es la media de la amplitud de los CEPS. Se construyeron graficas comparando la variación en m con los cambios en la varianza del CEPS medido durante la potenciación, normalizado a sus controles respectivos.

Para el análisis estadístico y representación gráfica de los resultados se utilizó el programa “Origin 7.0” (Origin Lab Corporation, MA. USA). Los resultados son presentados en el texto y las figuras como la media \pm el error estándar (n = número de células) y los porcentajes relativos al valor

control. El análisis estadístico fue realizado usando la prueba t (t-student) de dos colas y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***)).

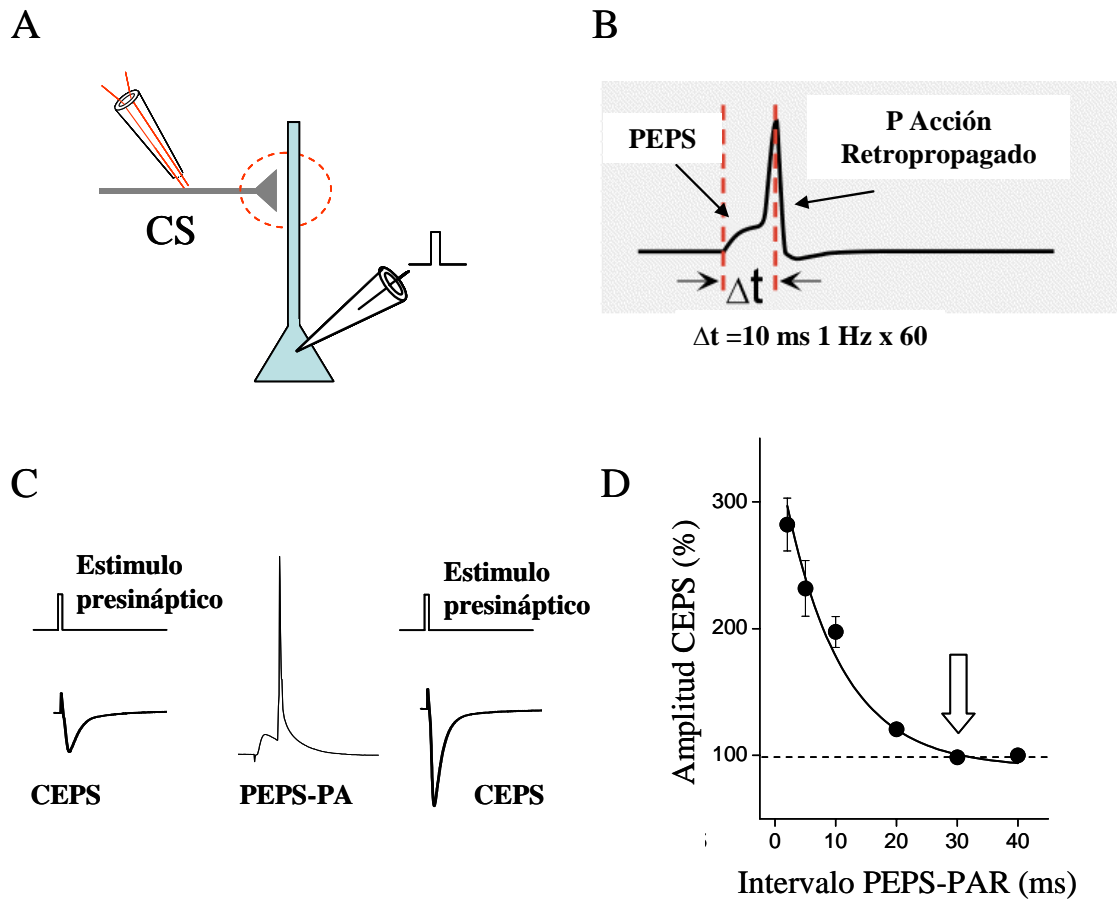


Figura 3. Inducción de la LTP por el protocolo de STDP A, diagrama esquemático del arreglo experimental mostrando los electrodos de registro y estimulación. En B, diagrama registro en modo fijación de corriente del apareo entre PEPS y el PAR con un intervalo (Δt) de 10 ms, el protocolo es repetido 60 veces a frecuencia de 1 Hz. En C, se muestra el registro control de las CEPS antes y 25 minutos después de aplicado el protocolo de STDP (PEPS-PA). En D, se muestra la relación entre el intervalo PEPS-PA y la magnitud de la LTP, esta relación se ajusta a una exponencial simple.

IV. RESULTADOS

1. LA INDUCCIÓN DE LA LTP POR EL PROTOCOLO DE STDP ES DEPENDIENTE DE LA ENTRADA DE Ca^{2+} A TRAVÉS DE LOS NMDAR.

Estudios recientes han demostrado que muchas neuronas del sistema nervioso central pueden exhibir potenciación o depresión a largo plazo, en respuesta a la precisa asociación temporal entre los potenciales de acción pre y postsinápticos (Markram et al., 1997; Magee y Johnston, 1997; Bi y Poo, 1998). A esta forma de plasticidad se la ha denominado “Spike Timing Dependent Plasticity (STDP) (Song et al., 2000; revisado en Dan y Poo 2004, 2006). Los resultados de este trabajo, muestran que la asociación de un PEPS unitario con una única espiga postsináptica aplicada con un retardo de 10 ms, repetido 60 veces durante un minuto (**Figura 4 A**) indujo una potenciación a largo plazo (LTP) de la amplitud de las CEPS (un $218.0 \pm 22.2\%$; $P < 0.05$; $n = 20$) (**Figura 4 B-D**). En un grupo separado de experimentos, cuando el intervalo de asociación entre la actividad pre y postsináptica se incrementó a 30 ms, la potenciación se inhibió totalmente ($98.5 \pm 2.5\%$; $P > 0.05$; $n = 10$). Además, cuando el intervalo de asociación se redujo a 5 ms, el protocolo de STDP generó una LTP de mayor magnitud ($282.0 \pm 50.7\%$; $P < 0.05$; $n = 8$). Para descartar que cambios en la resistencia de entrada neuronal (R_{in}) alteraran los resultados, la R_{in} fue monitoreada durante todo el período de registro (ver métodos). La R_{in} de la neurona postsináptica ($180.5 \pm 10.5 \text{ M}\Omega$; $n = 20$) permaneció estable a través de los experimentos (**Figura 4 B**). Cuando el protocolo de inducción de LTP fue omitido la amplitud de las CEPS no cambió durante los registros prolongados ($101.6 \pm 4.4\%$; $P > 0.05$; $> 30 \text{ min}$; $n = 6$), descartando que en estas condiciones experimentales la neuronas piramidales de CA1 manifestaran “run-down” de las corrientes excitatorias.

La potenciación a largo plazo de la eficacia sináptica entre las CS y neuronas piramidales de CA1 son dependientes de la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA, un efecto que es inhibido con la aplicación del antagonista competitivo de receptores de NMDA el APV o por el secuestro del Ca^{2+} intracelular con los quelantes de Ca^{2+} , BAPTA o EGTA (Lynch et al., 1983; Malenka et al., 1989; Regehr y Tank 1990; Zucker 1999). Cuando se bloquearon los receptores de

NMDA con 50 μ M APV o cuando la célula fue cargada a través de la pipeta de registro con 50 mM de BAPTA, el protocolo de STDP fue incapaz de inducir LTP (**Figura 4 D**).

El flujo de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, podría participar en la inducción de la LTP contribuyendo así al aumento en el Ca^{2+} citosólico. Se ha demostrado que los canales de Ca^{2+} tipo L, pueden jugar un papel fundamental en el influjo de Ca^{2+} , cuando las neuronas piramidales de CA1 son despolarizadas (Christie et al., 1995; Yasuda et al., 2003; Raymond y Redman, 2006). De esta manera, se examinó el efecto de la nimodipina (10 μ M), una droga que bloquea selectivamente los canales de Ca^{2+} tipo L, sobre la inducción de la LTP. Encontramos que la nimodipina no bloqueó la potenciación pero sí provocó una reducción en la amplitud de la LTP comparado con la amplitud de la LTP en ringer control (180.4 ± 11.2 %; $P < 0.05$; $n = 10$) (**Figura 4 D**).

Diversos estudios experimentales han mostrado que los reservorios intracelulares de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) y la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (LCIC) desde estos depósitos intracelulares, pueden contribuir a la inducción y mantención de la potenciación o depresión de sinapsis excitatorias en el SNC (Harvey y Collingridge, 1992; Schiegg et al., 1995; Lu y Hawkins, 2002; Raymond y Redman, 2002; 2006). Por este motivo, se analizaron los efectos de la participación de los reservorios intracelulares en la potenciación inducida por el protocolo por STDP.

La aplicación intracelular, a través de la pipeta de registro, del antagonista de los receptores de IP₃, heparina (5 mg/ml) o del antagonista de receptores de rianodina, ruthenium red (100 μ M), no fue capaz de inhibir la inducción de la LTP, la cual alcanzó valores de 206.1 ± 13.1 % ($n = 5$) y 200.1 ± 16.6 % ($n = 5$) respectivamente (**Figura 4 D**), sin mostrar diferencias significativas con el nivel de LTP alcanzado en la condición control (218.0 ± 22.2 %; $P < 0.05$)

Para verificar que la regulación de los reservorios de Ca^{2+} del RE o que la LCIC no están implicados en la inducción de la LTP, se analizó el efecto de la perfusión con thapsigargina, droga que vacía los reservorios de Ca^{2+} por inhibición de la recaptura de Ca^{2+} por la bomba Ca^{2+} -ATPasa

(Thastrup et al., 1990; Harvey y Collingridge, 1992). La perfusión con thapsigargina ($1\mu\text{M}$) no modificó el nivel de potenciación inducida por el protocolo de STDP ($197.0 \pm 8.5\%$; $P < 0.05$; $n = 4$) (**Figura 4 D**).

En conjunto estos datos indican que la inducción de LTP por el protocolo de STDP esta determinada por mecanismos postsinápticos, donde el influjo de Ca^{2+} a través de receptores de NMDA juega un papel central, mientras que la contribución de Ca^{2+} provenientes desde otras fuentes celulares (canales de Ca^{2+} tipo L o el retículo endoplasmático), no parecen ser esenciales.

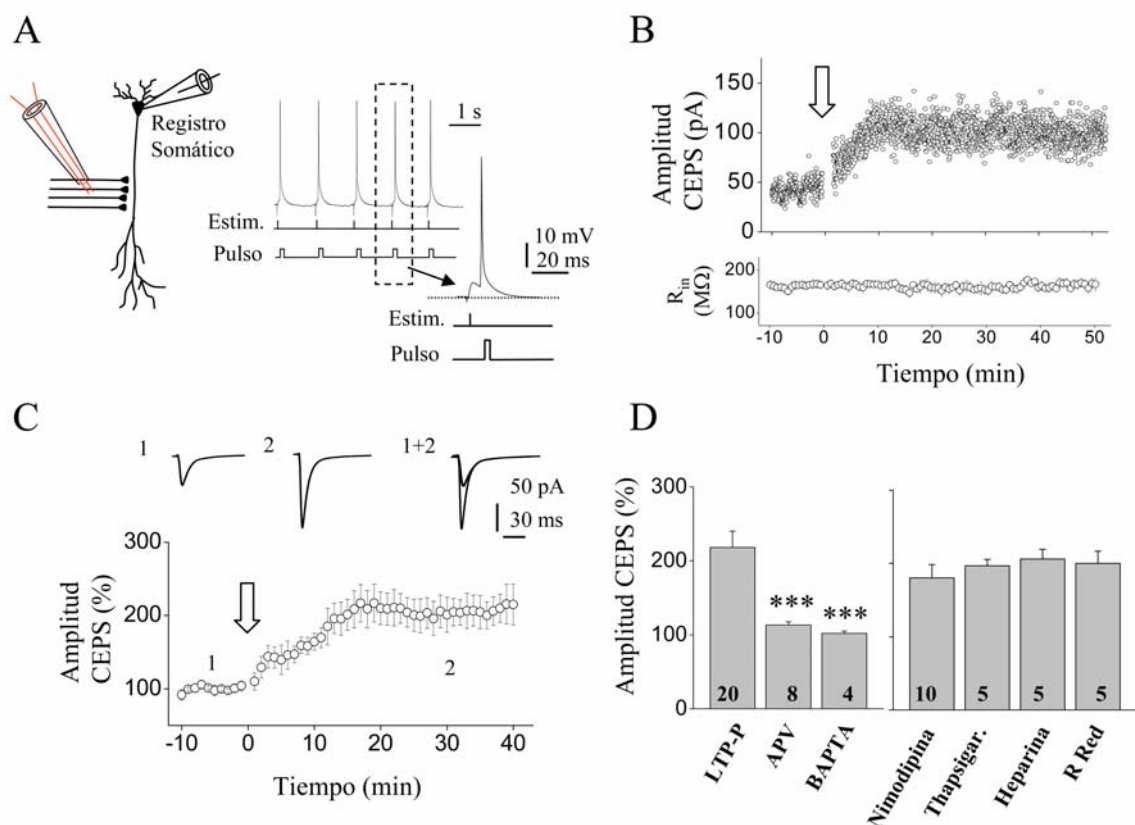


Figura 4. La inducción de la LTP por el protocolo de STDP es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDAR. **A**, a la izquierda, diagrama esquemático del arreglo experimental mostrando los electrodos de registro y estimulación. **A**, a la derecha, registro en modo fijación de corriente del apareo entre PEPS y el PAR con un intervalo de 10 ms, el inserto muestra una versión expandida del registro. **B**, arriba, se muestra el curso temporal de los cambios de amplitud de las CEPSs inducidas por el protocolo de STDP. El inserto muestra un CEPS (promedio de 10 respuestas) registrada antes (1) y 30 minutos después de aplicado el protocolo (2). **B**, abajo, el gráfico muestra que la R_{in} celular no cambia durante experimento. Estimamos la R_{in} utilizando un pulso de corriente despolarizante (10 pA, 100 ms). **C**, Datos promediados ($n=20$) que muestra la magnitud de la LTP inducida por el protocolo de STDP. **D**, se muestra el efecto sobre la potenciación del bloqueo de NMDAR con APV ($50\mu\text{M}$), quelación del Ca^{2+} intracelular con BAPTA (50mM), el bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo L con nimodipina ($10\mu\text{M}$), la depleción de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} con thapsigargina ($1\mu\text{M}$) o el bloqueo de receptores de rianodina o de IP3 (el n° de experimentos se señala en cada caso).

2. LA LTP INDUCIDA POR STDP SE EXPRESA POSTSINÁPTICAMENTE.

Se ha demostrado que la expresión de la LTP en las sinapsis entre CS y las neuronas piramidales de CA1 se origina postsinápticamente y puede ser generada por un aumento en el número y/o un incremento en la conductancia iónica unitaria de receptores postsinápticos funcionales de AMPA (AMPA) (Kullmann y Siegelbaum, 1995; Malenka y Bear, 2004; Collingridge et al., 2004) o por un aumento de la sensibilidad de los AMPARs al glutamato liberado (Kullman y Siegelbaum, 1995; Malinow y Malenka, 2002). Sin embargo, también se ha propuesto que mecanismos presinápticos pueden estar contribuyendo a la expresión de LTP en neuronas piramidales de CA1 (Kullmann y Siegelbaum, 1995; Cabezas y Buño, 2006).

Para determinar si paralelamente a la inducción de la potenciación, también ocurren cambios en la probabilidad de liberación de glutamato desde las CS, se analizaron las modificaciones en el índice de facilitación por pulsos pareados (FPP) (Creager et al., 1980; McNaughton, 1982; Manabe et al., 1993; Debanne et al., 1996). El signo y magnitud de la plasticidad por pulsos pareados dependen de la probabilidad de liberación de las sinapsis. Las sinapsis con alta probabilidad de liberación muestran depresión por pulsos pareados (DPP), mientras las sinapsis con baja probabilidad de liberación muestran FPP (Creager et al., 2002; De Sevilla et al., 2002; Cabezas y Buño, 2006). Se observó que todas las CEPSs analizadas mostraron FPP, indicando que el grupo de sinapsis activadas poseen una baja probabilidad de liberación. Estos datos muestran que la magnitud de la FPP no cambia con la inducción de LTP (FPP en control fue 0.77 ± 0.08 y 0.74 ± 0.06 durante la LTP; $P > 0.05$; $n = 10$; **Figura 5 A**), indicando que no hay cambios en la probabilidad de liberación en las sinapsis activadas durante la potenciación. También se comparó el valor de $1/CV^2$ (valor proporcional a la media del contenido cuantal) de las CEPS antes y durante la LTP, ya que se ha demostrado que el análisis de la distribución de $1/CV^2$ versus el valor de M (valor medio de la amplitud de las CEPS) permite determinar si la inducción de la LTP es de origen pre o postsináptico (Faber y Korn, 1991; Bekkers y Stevens, 1990; De Sevilla et al., 2002; Cabezas y Buño, 2006). Nuestros resultados muestran que los valores de la distribución de $1/CV^2$ se agrupan

consistentemente entorno a la línea de pendiente -0.09 ± 0.1 , con un valor medio de 2.2 ± 0.1 , lo que demuestra que la potenciación inducida por el protocolo de STDP se expresa postsinápticamente (Bekkers y Stevens 1990; Malinow y Tsien, 1990; Cabezas y Buño, 2006) (**Figura 5 B**).

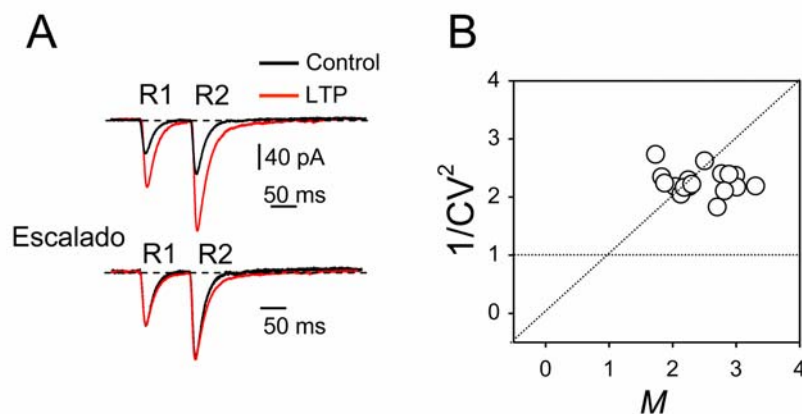


Figura 5. Figura 3. La LTP inducida por el protocolo de STDP se expresa postsinápticamente. **A**, arriba, superposición de CEPS promediadas (10 trazos de 10 células diferentes), que muestran la FPP de la CEPS (intervalo R1-R2 80 ms) antes (trazo negro) y 30 minutos después de inducida la LTP (trazo rojo). **A**, abajo, superposición de las CEPSs antes (trazo negro) y después de inducida la LTP (trazo rojo) escaladas a la R1. Note la ausencia de cambios en la FPP con la potenciación. **B**, Se muestra la relación entre el valor de $1/CV^2$ y el valor de M (ver materiales y métodos). Note que todos los valores tienden a agruparse horizontalmente sobre la línea de pendiente -0.09 ± 0.1 , sugiriendo que la STDP-LTP se expresa postsinápticamente.

3. INDUCCIÓN DE LA sAHP.

Utilizando el modo fijación de corriente y a un potencial de membrana de -60 mV, la sAHP fue activada por un pulso de corriente despolarizante, de intensidad 0.5 nA y 200 ms de duración, aplicado a través de la pipeta de registro somático (**Figura 6 A**). El pulso despolarizante induce un tren de potenciales de acción (7.4 ± 2.3 espigas, $n=41$) que es seguido por una hiperpolarización del potencial de membrana que presenta dos componentes, una post-hiperpolarización media (mAHP) y una lenta sAHP (**Figura 6 A**). La amplitud de la sAHP fue medida 250 a 300 ms después del final del pulso despolarizante, cuando la mAHP, cuya constante de caída (τ mAHP) es ≈ 200 ms (Stocker et al., 1999; de Sevilla et al., 2006), ha desaparecido y la sAHP alcanza su máxima amplitud (Storm

1989; Borde et al. 1999; 2000). Estos resultados muestran que la amplitud de la sAHP alcanza una amplitud de 5.8 ± 0.7 mV ($n = 10$). Además se determinó que la sAHP decae lentamente, con una constante de tiempo (τ sAHP) de 3.5 ± 0.3 s (inserto de la **Figura 6 A**).

Estudios previos han establecido que en neurona piramidales de corteza cerebral e hipocampo, el curso temporal que subyace a la activación de la sAHP esta determinada por el curso temporal de la señal de Ca^{2+} intracelular (Martín et al., 2001; Abel et al., 2004). Estos resultados muestran, que la máxima señal de Ca^{2+} coincide con el final del tren de potenciales de acción y que la constante de caída de la señal de Ca^{2+} es de 2.7 ± 0.5 s., cuyo curso temporal es similar al mostrado por la hiperpolarización lenta que subyace a la sAHP (inserto de la **Figura 6 A**).

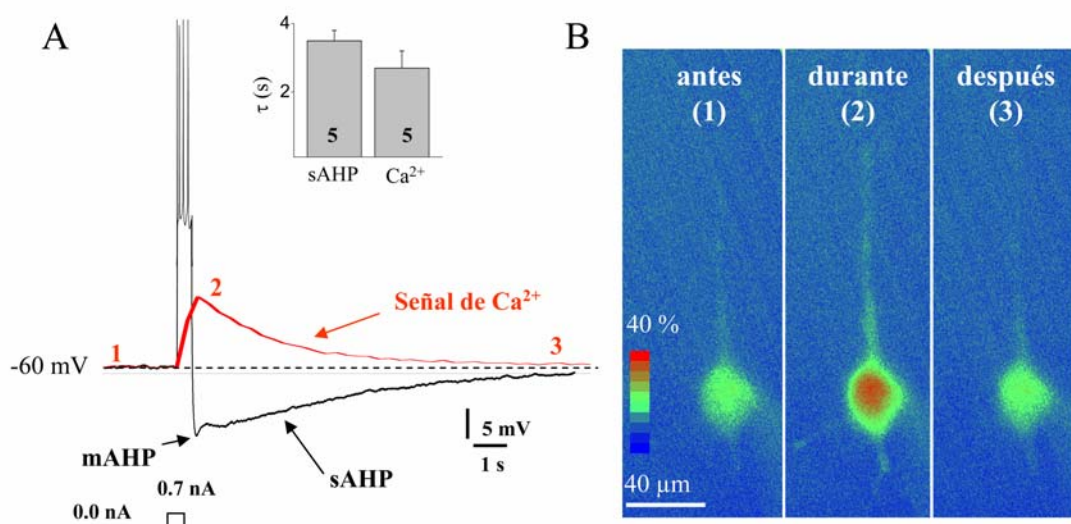


Figura 6. La activación y curso temporal de sAHP está asociada a la entrada de Ca^{2+} . A, registros en modo fijación de corriente donde se muestra la sAHP, y el curso temporal de la señal intracelular de Ca^{2+} . El inserto muestra la τ de recuperación de la hiperpolarización que subyace a la sAHP y τ de caída de la señal Ca^{2+} . En B, imágenes que muestran la señal de Ca^{2+} antes (1) durante (2) y después (3) de la activación de la sAHP

4. LA ACTIVACIÓN DE LA sAHP PUEDE INHIBIR LA POTENCIACIÓN INDUCIDA POR EL STDP.

La sAHP puede disminuir la excitabilidad y regular la inducción LTP por el protocolo de STDP en neuronas piramidales de CA1, por medio de dos mecanismos: (i) controlando la generación de potenciales de acción y regulando su retropropagación por el árbol dendrítico (Madison y Nicoll, 1984; Lancaster y Adams, 1986; Lancaster y Nicoll, 1987) y (ii) disminuyendo la eficacia sináptica a través de modificaciones en la amplitud, forma y propagación de los PEPS que arriban al soma procedentes de las dendritas apicales (Andreasen y Lambert, 1995; Sah y Bekkers, 1996; Borde et al., 1999; Buño et al., 2004). Utilizamos varias estrategias experimentales para investigar si la sAHP es capaz de inhibir la inducción de LTP o controlar la ventana temporal de coincidencia del STDP.

En estos experimentos la sAHP fue generada con un pulso de corriente despolarizante inyectado a través del electrodo de registro pero a una frecuencia de 0.25 Hz (ver descripción en métodos), una tasa de repetición que permite que la sAHP esté permanentemente activada (Borde et al., 1995). Para inducir LTP, asociamos un PEPS con un PA postsináptico con un intervalo de 10 ms (ver métodos y **Figura 5 A**). Cuando este protocolo de STDP se aplicó durante la sAHP, fue incapaz de inducir LTP (**Figura 7 A**), de modo que la amplitud de las CEPSs en control y 25 minutos después de aplicado el protocolo de STDP, no fueron significativamente distintas (103.2 ± 5.7 %; $P > 0.05$; $n = 10$) (**Figura 7 B**). Sin embargo, cuando la sAHP se inhibió (en un 80.2 ± 10.2 %; $P < 0.05$; $n = 8$) (**Figura 7 C**), con el agonista de receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (10 μ M) (Foehring et al., 1989; Martín et al., 2001; Bonansco y Buño, 2003) el mismo protocolo de STDP generó una robusta potenciación, la LTP alcanzó un 197.8 ± 10.9 % ($P < 0.05$; $n = 8$) (**Figuras 7 y 8 D**). Hay que destacar, que en condiciones control el isoproterenol no modifica la amplitud de las CEPSs (102.8 ± 5.0 %; $P > 0.05$; $n = 4$).

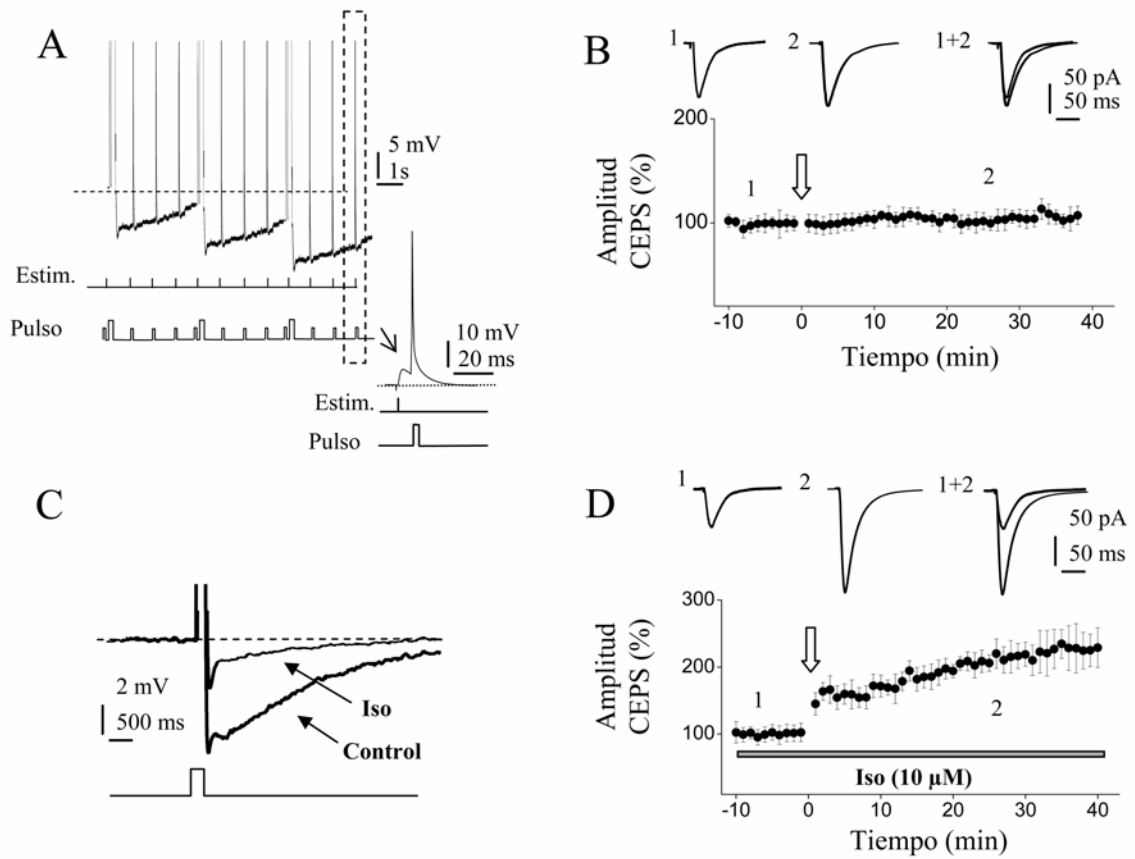


Figura 7. La sAHP inhibe la inducción de la LTP. **A**, registro representativo, que muestra el protocolo de STDP aplicado durante la sAHP. **B**, CEPSs promediadas (n=10), que demuestran la ausencia de LTP cuando el protocolo de STDP es aplicado durante la sAHP. El inserto superior muestra la CEPS promedio (10 trazos) antes y 20 minutos después de aplicado el protocolo de STDP. **C**, muestra que la perfusión de isoproterenol (Iso) induce una gran reducción de la sAHP. **D**, cuando la sAHP es bloqueada con isoproterenol el protocolo de STDP (10 ms de intervalo) induce una potente LTP. El inserto muestra en promedio (10 trazos) las CEPSs registradas antes y después de la inducción de la LTP.

Estudios previos han demostrado que la activación de los receptores β -adrenérgicos puede disminuir el umbral de inducción de la LTP homosináptica (Katsuki et al., 1997; Winder et al., 1999; Yang et al., 2002a) y la asociativa (Lin et al., 2003). Sin embargo, el isoproterenol no modificó la magnitud de la potenciación inducida por el protocolo de STDP (una potenciación de $213.2 \pm 18.7 \%$; $P < 0.05$; $n=4$) comparado con la potenciación inducida en ausencia de la sAHP (**Figura 7 y 8 D**).

Como se ha destacado anteriormente el pulso despolarizante induce un tren de potenciales de acción que es seguido por una hiperpolarización del potencial de membrana que presenta dos componentes, la mAHP y la sAHP (**Figura 6 A**).

El componente medio de la AHP, la mAHP (conductancia que precede y tiene una cinética más rápida que la sAHP) es bloqueado específicamente por la apamina. Esta droga puede incrementar la excitabilidad (Lankaster et al., 2001; Garduño et al., 2005) y reducir el umbral de inducción de LTP en células piramidales de CA1 (Stackman et al., 2002; Hammond et al., 2006). Estos resultados muestran que la aplicación extracelular de apamina (100 nM) inhibió totalmente la mAHP ($96.4 \pm 6.1\%$ de reducción, $P > 0.05$; **Figura 8 A y B**) sin afectar la amplitud, ni el curso temporal de la sAHP. La inhibición de la mAHP con apamina no modificó la capacidad de la sAHP de inhibir la inducción de la LTP ($102.9 \pm 4.0 \%$; $P > 0.05$, $n = 6$) (**Figura 8 C y D**). Cuando la sAHP no fue activada, la apamina no evitó que el protocolo STDP generara una robusta potenciación de las CEPS (by $200.8 \pm 2.2 \%$; $P < 0.01$; $n=4$) (**Figura 8 C**).

Se ha descrito que la corriente catiónica hiperpolarizante I_h puede acelerar la cinética de los PEPS en la dendrita apical y modificar la integración sináptica en neuronas piramidales de CA1 (Nolan et al., 2004; Magee 1999). De este modo, la I_h podría modificar el umbral de inducción de LTP debido a que la hiperpolarización de la membrana inducida por la sAHP puede activar la I_h . Sin embargo el uso del bloqueador específico de los canales de la I_h , ZD7288 (50 μ M), no modificó la capacidad de la sAHP de inhibir la inducción de la LTP ($113.5 \pm 9.2 \%$; $P > 0.05$, $n=8$; **Figura 8 D**).

Además cuando la sAHP no fue activada, la perfusión de ZD7288, no modificó el nivel de potenciación inducida por el protocolo de STDP.

Estos resultados sugieren que el componente medio de la AHP, la mAHP y la corriente catiónica I_h , no contribuyen significativamente a la inhibición de la LTP en neuronas piramidales de CA1.

El aumento de Ca^{2+} intracelular provocado por el tren de potenciales de acción que induce la sAHP, puede activar distintas cascadas intracelulares de segundos mensajeros que podrían inducir LTP (Bear et al., 1987; Artola y Singer, 1993). Nuestros resultados muestran que el isoproterenol bloqueó la sAHP (**Figura 9 A y B**) sin modificar la descarga inicial de espigas inducida por el pulso despolarizante (7.9 ± 3.3 , $n = 8$), ni el pico máximo de la señal de Ca^{2+} (109.5 ± 8.4). Sin embargo, la τ de caída de la señal de Ca^{2+} incrementó un 30.7 ± 5.3 % (Desde un 2.7 ± 0.5 s en control a un 3.9 ± 0.5 s en isoproterenol) (**Figura 9 A y B**). Este incremento en la señal de Ca^{2+} , puede depender del aumento del influjo de Ca^{2+} en la neurona ya que se ha demostrado que la activación de los receptores β -adrenérgicos puede modular los canales de Ca^{2+} tipo L o aumentar la Rm y compactar eléctricamente la neurona haciendo más efectiva la despolarización (Fisher y Jonhston, 1990; Timmons et al., 2004; Hoogland y Saggau, 2004).

En conjunto estos datos indican que la sAHP puede modificar específicamente el umbral de inducción del LTP para protocolos de STDP cuyo intervalo entre el PEPS y el PAR es de 10 ms.

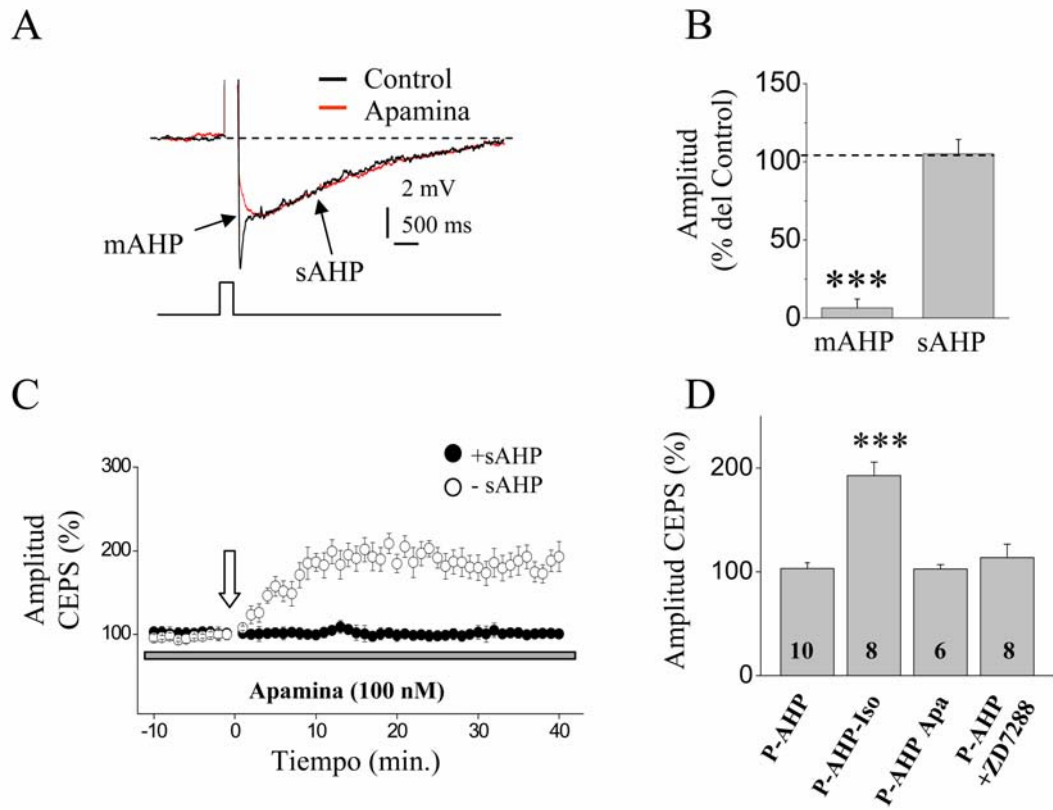


Figura 8. La mAHP y la *I_h* no participan en la inhibición de la LTP inducida por la sAHP. **A**, se muestra un registro representativo de la mAHP y la sAHP en situación control (trazo negro) y durante la perfusión de apamina (100 nM) (trazo rojo). **B**, se muestra en promedio el efecto de la apamina sobre la amplitud de la mAHP (n=6) y la sAHP (n=6). **C**, la apamina no altera la capacidad de la sAHP en bloquear la LTP. Además en ausencia de activación de la sAHP, apamina no afecta la inducción de LTP. **D**, se muestra el efecto del isoproterenol (10 μ M), apamina (100 nM) y ZD7288 (50 μ M) sobre la amplitud de las CEPSs antes y 30 minutos después de aplicado el protocolo de STDP en control y durante la sAHP (el n° de experimentos se indica en cada caso).

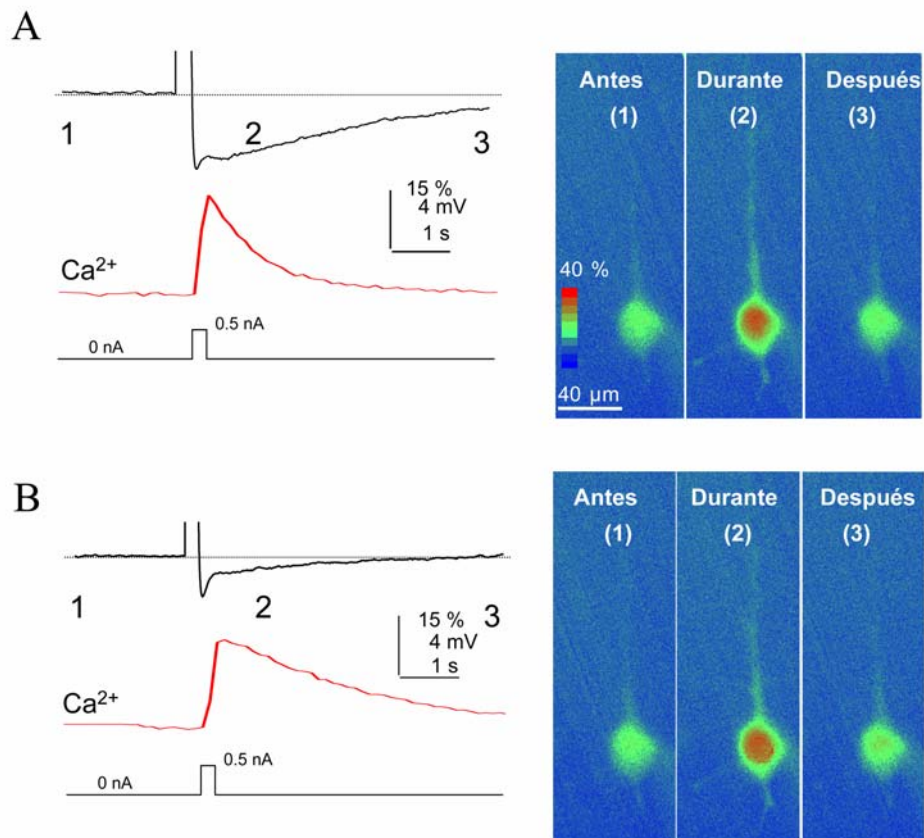


Figura 9. El bloqueo de la LTP no es inducido por la activación de cascadas intracelulares. **A**, a la izquierda, registros representativos que muestran la sAHP y el registro de la señal de Ca^{2+} , generados por un pulso de corriente despolarizante. **A**, a la derecha, imagen que muestra la señal de Ca^{2+} , antes, durante y después de la sAHP. En **B** izquierda y derecha, igual que en **A** pero bloqueando la sAHP con 10 μ M de isoproterenol.

5. LA sAHP INHIBE LA LTP EN SINAPSIS PROXIMALES Y DISTALES.

Se ha descrito que la potenciación en la región de CA1 es entrada-específica, propiedad de la LTP homosináptica (LTP Hebbiana), que se refiere a que sólo se potencian las entradas que son activadas durante la estimulación que induce la potenciación (Andersen et al., 1977; Lynch et al., 1990; Malenka y Nicholl, 1999; Dan y Poo, 2004, 2006). Se ha sugerido que los canales de la sAHP en neuronas piramidales de CA1 están distribuidos principalmente en el soma y en la porción inicial de la dendrita apical (Sah y Bekkers, 1996; Beckkers, 2000; Fernández de Sevilla et al., 2007). Sin embargo, se desconoce si la inhibición de la LTP por la sAHP esta restringida a una región en particular o si se extiende por todo el árbol dendrítico. De esta forma, probamos si la inhibición de la LTP inducida por sAHP es entrada-específica, estimulando dos grupos separados de fibras de CS con dos electrodos de estimulación, uno puesto cerca del soma 150 μm (proximal) y otro a 250 μm del soma (distal). Las CEPSs fueron evocadas alternativamente, estimulando a baja frecuencia (0.3 Hz) las entradas sinápticas distales y proximales (**Figura 10 A**). Además, para comprobar que no existe facilitación cruzada entre los grupos de fibras, se estimuló secuencialmente las entradas proximales y distales a un intervalo de 50 ms. En un grupo de experimentos el protocolo de STDP aplicado en la entrada proximal indujo una robusta LTP, en cambio en la entrada distal no hubo cambios en la magnitud de las CEPS (esta vía fue usada como control). En otro grupo de experimentos se aplicó el protocolo de STDP en las entradas distales lo que indujo potenciación sólo en estas entradas sinápticas, sin cambios en la amplitud de las CEPS proximales (control), demostrando que el protocolo de STDP es capaz de inducir una LTP entrada específica, cumpliendo con una de las características principales de la LTP “Hebbiana”, la especificidad. Además observamos que la magnitud de la LTP inducida distalmente fue menor que la evocada en la entrada proximal (distal: $147.7 \pm 8.9 \%$ y proximal $215.1 \pm 14.9 \%$; $P > 0.05$, $n=8$; **Figura 10 A**). Cuando el protocolo de STDP fue aplicado durante la sAHP, se produjo una inhibición de la LTP tanto en la entrada distal como la proximal. De

modo que la amplitud de la CEPS control y 30 minutos después de aplicado el protocolo de STDP fueron similares (proximal $105 \pm 7.9\%$; $P < 0.05$ y distal $104 \pm 4.9\%$; **Figura 10 B**).

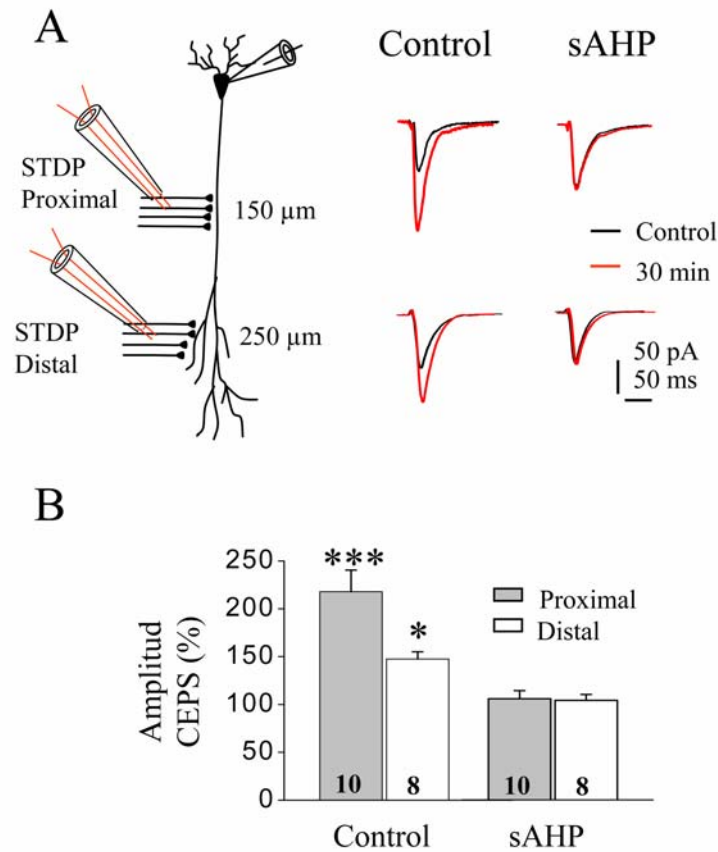


Figura 10. La sAHP inhibe la LTP en entradas sinápticas proximales y distales. **A**, a la izquierda, se muestra un diagrama del arreglo experimental indicando los electrodos de registro y estimulación. **A**, a la derecha, registros representativos de las CEPS (promedio 10 trazos) en control y durante la sAHP, antes (trazo negro) y después (trazo rojo) de aplicado el protocolo de STDP tanto en las entradas proximales (150 μm) como distales (250 μm). **C**, datos agrupados que muestra que la LTP inhibe la potenciación de las entradas proximales y distales, mientras que en control la LTP se induce en ambas entradas sinápticas. Note que la magnitud de la potenciación es mayor en las entradas proximales que en las distales.

6. EL AUMENTO DE LA CONDUCTANCIA DE LA MEMBRANA (*gm*) QUE SUBYACE A LA ACTIVACIÓN sAHP INHIBE LA LTP.

El bloqueo de la potenciación inducido por la sAHP puede deberse a: (i) el aumento de la *gm* asociado a la sAHP o (ii) a la hiperpolarización generada durante la sAHP y al rebloqueo por Mg^{2+} de los NMDARs o a la combinación de ambos mecanismos. Para distinguir entre estas posibilidades se realizaron dos pruebas. Primero, se aplicó el protocolo de STDP con un intervalo PEPS-PAR de 10 ms durante la sAHP “simulada”, la cual fue generada aplicando la forma de onda de la corriente obtenida del promedio de una sAHP “real”, a través del electrodo de registro somático (**Figura 11 A**). Cuando el protocolo de STDP se aplicó durante la sAHP simulada, generó una robusta potenciación de las CEPS (un $185.2 \pm 5.2 \%$; $P < 0.05$; $n=6$) (**Figura 10 B**), indicando que la hiperpolarización evocada por la sAHP simulada no afecta la inducción de la LTP (**Figura 10 A y B**). Adicionalmente, aplicamos el protocolo STDP durante la sAHP real, generada con el pulso despolarizante, pero esta vez el potencial de membrana fue mantenido a -85 mV (muy cercano al potencial de equilibrio del ión K^+) utilizando una inyección continua de una corriente hiperpolarizante (**Figura 11 C**). A potencial de membrana de -85 mV el protocolo de STDP fue incapaz de inducir LTP cuando la sAHP fue activada ($104.6 \pm 10.6 \%$; $P > 0.05$; $n=6$). Además es destacable, que este potencial (-85 mV) la sAHP no genera hiperpolarización (**Figura 11 C**), demostrando que el potencial de membrana se encuentra muy cerca del potencial de reversión para el ión K^+ . Debemos destacar que cuando el protocolo de STDP-LTP se aplicó a -85 mV en ausencia de activación de la sAHP se generó una robusta LTP ($198.8 \pm 10.6 \%$; $P < 0.05$; $n=4$).

Estos resultados indican que la hiperpolarización asociada con la activación de la sAHP no participa en la inhibición de la potenciación. Por el contrario, el aumento de la *gm* asociado a la apertura de los canales K^+ de la sAHP es determinante para la inhibición de la LTP.

Para confirmar que durante la sAHP se produce un incremento en la *gm*, y que este es el factor clave para la inhibición de la LTP, aplicamos un breve pulso de corriente despolarizante

(10 pA; 200ms) antes y durante la activación de la sAHP simulada así como durante la sAHP real (a potencial de membrana de -60 mV y a -85 mV) (**Figura 12 A**). La amplitud y constante de tiempo (τ) de la despolarización evocada por el pulso despolarizante fueron idénticas antes y durante la sAHP simulada (amplitud 5.6 ± 1.2 a 5.5 ± 1.3 mV;; $P=0.91$ y τ 31.8 ± 7.9 a 30.8 ± 11.2 ms, $P=0.82$, $n=6$) (**Figura 12 A y B**), mostrando la activación de la I_h o por el rebloqueo de los NMDAR por el Mg^{2+} extracelular no inducen modificaciones en la gm . Por el contrario, a potencial de membrana hiperpolarizado (-85 mV) se produjo un gran aumento de la gm asociada a la apertura de los canales de la sAHP, este aumento de gm fue similar a los dos potenciales de membrana utilizados en reposo (-60 mV) e hiperpolarizado (-85 mV). A -60 mV, la gm aumentó un 161.2 ± 11.1 % ($P < 0.05$; $n = 6$) y un 154.5 ± 8.3 % a -85 mV ($P < 0.05$; $n = 6$) (**Figura 12 B**).

Estos resultados son consistentes con que (*i*) el bloqueo de la LTP es causado por un incremento en la gm inducida por la apertura de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} que subyacen a la sAHP y (*ii*) con que la hiperpolarización *per se* no modifica el umbral de inducción de la LTP.

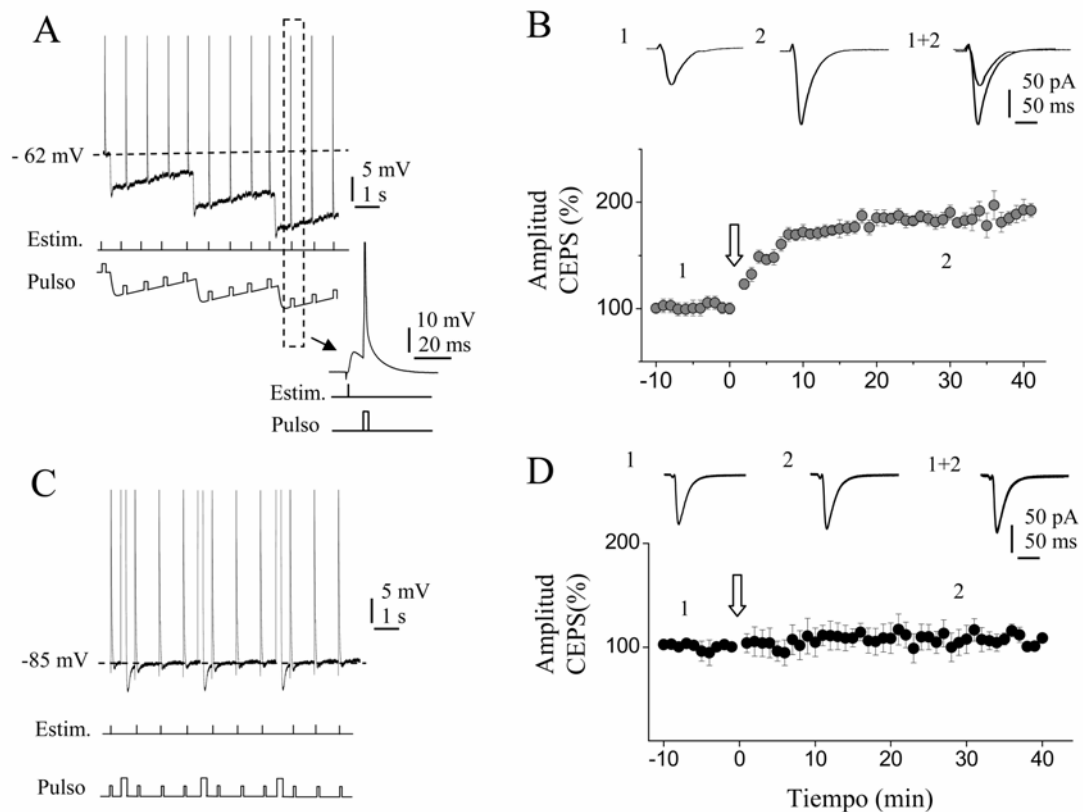


Figura 11. El aumento de la conductancia de la membrana (g_m) inducida por la sAHP bloquea la LTP. **A**, registro representativo que muestra el protocolo de STDP aplicado durante la sAHP simulada. El inserto muestra una versión expandida del protocolo. **B**, la sAHP simulada no bloquea la LTP inducida por el protocolo de STDP (10 ms). El inserto muestra las CEPS (promedio 10 trazos) antes y 30 minutos después de aplicado el protocolo de STDP. **C**, se muestra el protocolo de la sAHP aplicado durante la sAHP mientras el potencial de membrana es mantenido a -85 mV (cerca de reversión para el ión K^+). Note a la ausencia de hiperpolarización -85 mV. **D**, a la derecha, la LTP fue bloqueada cuando el protocolo de STDP fue aplicado durante la sAHP a -85 mV. El inserto muestra el registro de las CEPS antes y después de 30 min de aplicado el protocolo de STDP.

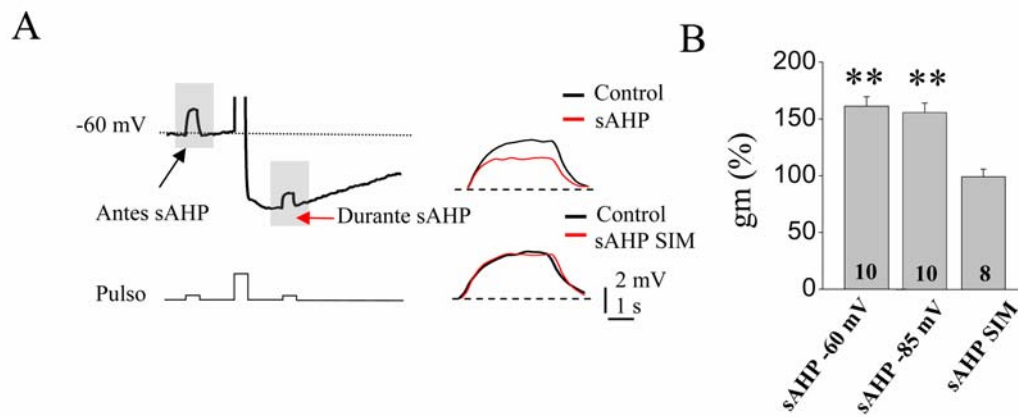


Figura 12. La sAHP induce un gran incremento de la g_m . En **A**, a la derecha, se muestra el protocolo utilizado para calcular el cambio de g_m inducida por la sAHP, midiendo los cambios de voltaje evocado por un pulso de corriente despolarizante (10 pA, 200 ms). **A**, a la derecha, se muestra el incremento de la g_m durante la sAHP “real” y la ausencia de cambio en g_m con la sAHP simulada. **B**, datos agrupados que muestran los cambios relativos de la g_m inducidos por la sAHP real (a -60 y -85 mV) y la sAHP simulada.

7. LA sAHP REDUCE LA VENTANA TEMPORAL PARA LA INDUCCIÓN DE LTP.

La capacidad del protocolo de STDP para inducir potenciación disminuye rápidamente cuando el intervalo de asociación entre el PEPS y el PAR aumenta (Bi y Wang 2002; Sjöström y Nelson 2002; Dan y Poo, 2004; 2006). Se ha determinado que la activación de la sAHP provoca una aceleración de la τ de caída del PEPS en las dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1 (Sah y Bekeers, 1996; Fernández de Sevilla et al., 2007). De manera que es posible que la asociación de un PEPS de corta duración y el PA postsináptico requiera de un intervalo de coincidencia inferior para inducir la STDP. Para ello se analizó si la disminución del intervalo PEPS-PAR puede inducir LTP durante la sAHP. Como se había demostrado el protocolo de STDP aplicado a un intervalo de 10 ms entre PEPS y el PA postsináptica durante la sAHP inhibió la inducción de LTP ($108.6 \pm 13.5\%$; $P = 0.7$; $n = 6$; Figura 8). Por el contrario, un segundo protocolo de STDP aplicado a 5 ms de intervalo en las mismas 10 células fue capaz de

inducir LTP durante la activación de la sAHP ($160.8 \pm 9.7\%$; $P < 0.05$; **Figura 13 A**), indicando que la sAHP puede reducir la ventana temporal de coincidencia de actividad pre y postsináptica necesaria para inducir LTP.

Para estimar las modificaciones que induce la sAHP sobre la ventana temporal de coincidencia entre la actividad pre y postsináptica, se realizaron una serie de experimentos con protocolos de STDP a diferentes intervalos (de 2 a 40 ms) entre el PEPS y el PA postsinápticos en condición control (sin activación de la sAHP). El protocolo de STDP aplicado a un intervalo de 15 ms indujo potenciación (un $166.6 \pm 10.2\%$ de aumento; $P < 0.05$, $n = 6$). Cuando se aumentó el intervalo a valores superiores a 30 ms la LTP no fue generada ($101.7 \pm 3.4\%$; $P > 0.05$, $n=4$; **Figura 13 B**). Por el contrario, cuando el intervalo fue reducido a 5 ms las CEPSs alcanzaron un mayor nivel de potenciación ($231.6 \pm 5.7\%$; $P < 0.001$; $n=6$; **Figura 13 B**).

Durante la sAHP el protocolo de STDP sólo fue capaz de inducir LTP si el intervalo entre el PEPS y PA postsináptico fue igual o inferior a 5 ms. A un intervalo de 5 ms la LTP alcanza un $140.1 \pm 10\%$, $P < 0.05$, $n=10$; mientras que a un intervalo de 2 ms, la potenciación alcanzó un $147.0 \pm 8.2\%$, $P < 0.05$, $n=6$). En contraste, cuando el protocolo de STDP se aplicó durante la sAHP a un intervalo de coincidencia PEPS-PAR superior a 5 ms, la potenciación es inhibida ($103.2 \pm 9.3\%$; $P > 0.05$, $n = 6$, **Figura 13 B**).

Además, se analizó la relación entre la magnitud de la LTP inducida por STDP, diferentes intervalos de coincidencia del PEPS y el PA postsináptico, en situación control y durante la activación de la sAHP. Se determinó que esta relación se ajusta a una exponencial simple (**Figura 13 B**). En control, el ajuste exponencial alcanzó un valor de 9.3 ± 0.5 ms cuyo coeficiente de correlación (R^2) tuvo un valor de 0.97 ($n = 34$). Por el contrario, cuando el protocolo de STDP se aplicó durante la sAHP, el ajuste exponencial arrojó un valor de 2.5 ± 0.5 ms ($R^2 = 0.99$; $n = 30$) el cual fue significativamente menor que en control ($p < 0.05$). Esto confirma que la sAHP reduce significativamente la duración de la ventana temporal de coincidencia entre el PEPS y el PAR en neuronas piramidales de CA1.

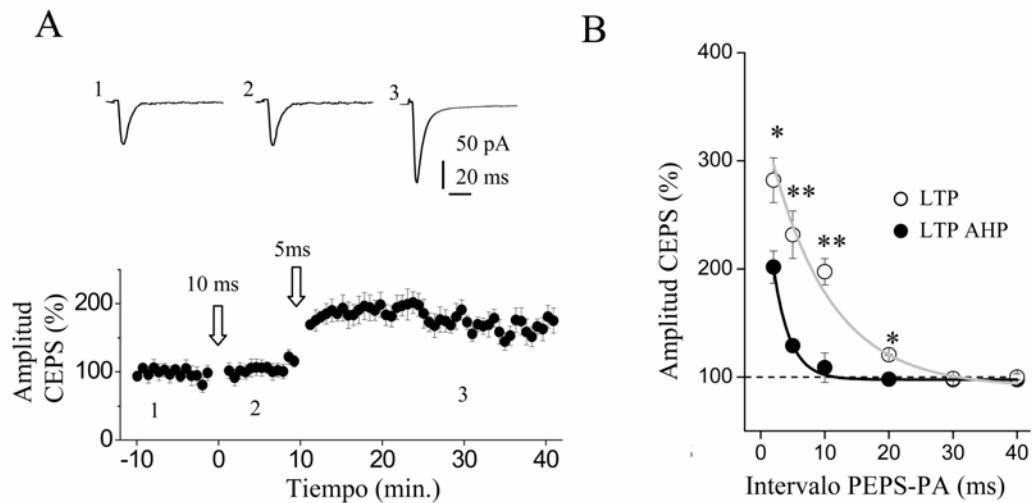


Figura 13. La sAHP reduce la ventana temporal de la LTP. **A**, Durante la sAHP el protocolo de STDP aplicado a 10 ms de intervalo no genera LTP. Sin embargo si se reduce este intervalo PEPS-PAR un segundo protocolo de STDP aplicado en las mismas células induce potenciación (n=10). El inserto muestra la CEPS (promedio 10 trazos) antes y después de 10 después del primer protocolo de STDP y 20 minutos del segundo protocolo de STDP. **B**, Datos agrupados que muestran la relación funcional entre la amplitud de la LTP de las CEPS y en intervalo PEPS-PAR. Los datos fueron ajustados a una función exponencial.

El aumento de la *gm* inducida por la activación de la sAHP puede no sólo tener como consecuencia directa una disminución de la amplitud y curso temporal de los PEPS en dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1 (Sah y Bekkers, 1996; Buño et al., 2004; Fernández de Sevilla et al., 2007), sino que puede modificar la retropropagación de los PA por el árbol dendrítico. Como se demostró, el aumento de la *gm* asociada a la sAHP inhibió la inducción de la LTP cuando el protocolo de STDP es aplicado a intervalos superiores a 5 ms, pudiendo existir una relación funcional entre el aumento de la *gm*, las modificaciones de amplitud y duración de los PEPS, alteraciones en la retropropagación de los PA y el umbral de inducción de la LTP. Para ello, hemos examinado los cambios en la amplitud y la forma de onda de los PEPS y del PA postsináptico antes y durante la activación de la sAHP (**Figura 14 A**). Durante la sAHP la amplitud de los PEPS disminuyó un $29.7 \pm 5.4\%$ (de 5.1 ± 0.2 mV a 3.5 ± 0.2 mV; $P < 0.05$, n=10). La τ de caída del PEPS, también disminuyó significativamente un $53.2 \pm 3.1\%$ (de 62.1 ± 3.8 ms a 33.2 ± 2.4 ms; $P < 0.05$; n=10) (**Figura 14 A**). Por el contrario, la activación de la sAHP

no afectó la amplitud ni la forma de onda del PA postsináptico, cuya amplitud antes y durante la activación de la sAHP mostró valores similares (antes de la sAHP 106.1 ± 1.3 mV y 104.0 ± 1.2 mV durante la sAHP; $P > 0.5$, $n = 10$; **Figura 14 B**). Además se observó que la latencia entre el PEPS y el PA postsináptico no fue afectada por la activación de la sAHP (intervalo PEPS-AP control 10.1 ± 0.1 ms en control, $n = 10$ y 10.2 ± 0.2 ms, $n = 10$; $p = 0.8$).

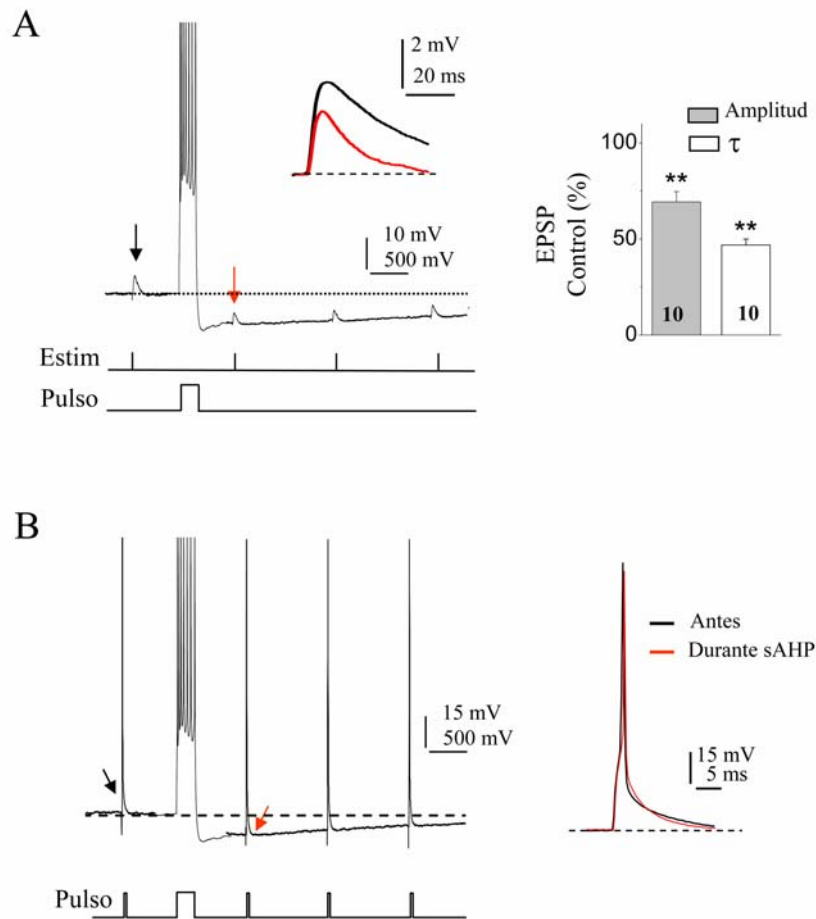


Figura 14. La sAHP modifica la amplitud y curso temporal de los PEPS. **A**, a la izquierda registro representativo que muestra los cambios en la forma de onda de los PEPS antes (trazo negro) y durante (trazo rojo) la sAHP. El inserto muestra superpuesto el PEPS antes (negro) y durante (rojo) la activación de la sAHP. En **A**, a la derecha datos agrupados que muestran la disminución de la amplitud y el curso temporal de los PEPS durante la sAHP. **B**, a la izquierda, registro representativo de los PA postsinápticos antes (trazo negro) y durante (trazo rojo) la sAHP. **B**, derecha, muestra superpuesto el PA antes (negro) y durante (rojo) la activación de la sAHP. Note que la sAHP no modifica al PA (promedio 10 trazos).

Trabajos previos han descrito que la disminución en la amplitud del PEPS es causada principalmente por el cambio de la *gm* asociado a la retropropagación del PA por la dendrita apical de neuronas piramidales de CA1, descartando la participación en este fenómeno de cambios en la *gm* generados por la activación de conductancias hiperpolarizantes (Häusser et al., 2001). En contraste, se ha descrito en neuronas piramidales de CA1 que la asociación de un PEPS con un PA postsináptico puede amplificar el PA dendrítico e inducir LTP (Magee y Johnston, 1997) a través de la inhibición de la corriente transitoria de K^+ , *Ia* (Watanabe et al., 2002).

Para estudiar el efecto de la asociación del PEPS con el PA postsináptico sobre el PEPS y el PA, se analizó aisladamente los diferentes componentes de las respuestas. Se observó que la amplitud y duración del PEPS no fueron afectadas por el potencial de acción (95.2 ± 10.1 %; $P > 0.05$; $n=8$, **Figura 15 A**). De manera similar la amplitud y forma de PA postsináptico no fueron modificados por el PEPS. Esto sugiere que en nuestras condiciones experimentales, cambios de conductancia dependiente del PA y la inactivación de la *Ia* producida por el PEPS, no son esenciales en términos de bloquear o inducir potenciación sináptica.

En conjunto nuestros resultados indican que el aumento en la *gm* asociada con la activación de la sAHP fue un factor clave para modificar los PEPS. Se probó esta hipótesis, midiendo los cambios en la amplitud y la τ de caída del PEPS en función del cambio de *gm* asociado con la apertura de los canales de K^+ que generan la sAHP. Se observó una relación lineal con una pendiente negativa entre el incremento de *gm* asociado con la activación de la sAHP, la amplitud y τ de caída de los PEPS (**Figura 15 B**). Estos resultados sugieren que el cambio en la *gm* y no la hiperpolarización, es el factor central que subyace al efecto de la sAHP sobre los PEPS.

También se midió los cambios de la *gm* evocado por la activación de la sAHP estimando los cambios en la amplitud de la amplitud de la sAHP evocada por un pulso de corriente y

determinando el valor umbral de g_m requerido para bloquear la inducción de LTP. Se encontró que existe una relación no lineal inversa entre el aumento de la g_m y la magnitud de la LTP evocada por la asociación entre el PEPS y PA postsináptico un intervalo de 10 ms. La magnitud de la LTP fue gradualmente más pequeña para valores de g_m cada vez más grandes. Cuando el aumento en la g_m inducida por la activación de la sAHP fue mayor al 40% del valor control, la inducción de la LTP fue totalmente inhibida. ($P > 0.05$, $n=12$) (**Figura 15 B**).

Los resultados aquí presentados muestran que el incremento de la g_m generada por activación de los canales de K^+ que median la sAHP induce una reducción en la amplitud y especialmente en la τ de caída de los PEPS, lo que genera una reducción de la ventana temporal de coincidencia entre el PEPS y el potencial de acción. De manera que en condición control la ventana de coincidencia está entre 1 y 20 ms, mientras que durante la sAHP el intervalo de coincidencia se reduce a valores entre 1 y 5 ms, demostrando que las características de los PEPS son un factor clave en la regulación de la ventana temporal de coincidencia entre la actividad pre y postsináptica, indispensable para inducir LTP.

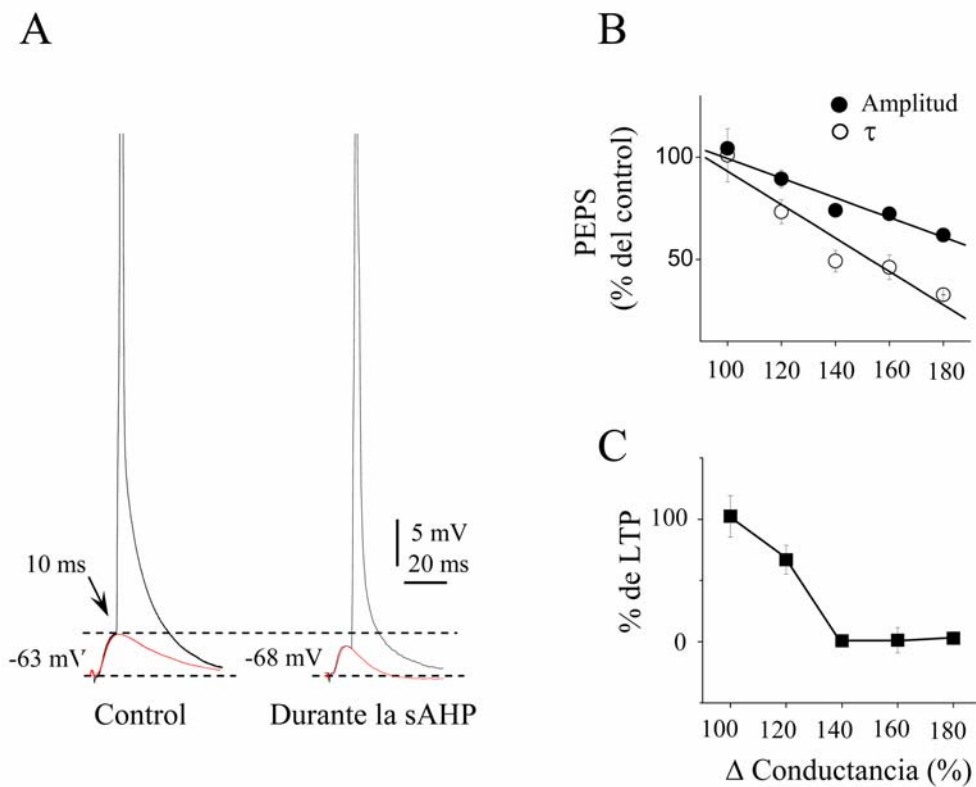


Figura 15. La sAHP modifica la amplitud y curso temporal de los PEPS. **A**, cambios en la forma de onda de los PEPS antes y durante la sAHP sin y con el potencial de acción con un intervalo PEPS-PAR 10 ms. El PEPS (trazo rojo) fue obtenido sustrayendo el potencial de acción del trazo de apareo del PEPS-PA (10 ms). Note que durante la sAHP disminuye la amplitud y curso temporal del PEPS. **B**, datos agrupados que muestran la relación lineal existente entre el aumento de g_m asociada a la membrana y la amplitud (círculos blancos) y curso temporal (círculos negros) del PEPS. **C**, datos agrupados que muestran la relación entre el aumento de la g_m durante la sAHP y la magnitud de la LTP. Cuando el aumento de g_m es mayor al 40% del control la LTP es bloqueada.

8. LA AMPLITUD Y FORMA DE ONDA DEL PEPS REGULA LA VENTANA TEMPORAL DE COINCIDENCIA.

Como hemos demostrado la sAHP reduce la ventana temporal de coincidencia requerida para inducir LTP, debido fundamentalmente a una reducción de la amplitud y τ de caída del PEPS. De modo que es posible que aumentando la amplitud y duración de los potenciales sinápticos la ventana temporal de coincidencia del STDP aumente. Se ha determinado que la CTZ, una droga que inhibe la desensibilización de los AMPAR, induce un importante incremento de la amplitud y duración de los PEPS AMPA sin afectar al componente NMDA (Yamada y Tang, 1993; Arai y Lynch, 1996; Staubli et al., 1994). Además, este modulador de los AMPAR puede aumentar la potenciación sináptica y la memoria (Arai y Lynch, 1992, Staubli et al., 1994; Arai et al., 2004).

Hemos analizado el efecto de la CTZ sobre la duración de la ventana temporal de coincidencia entre el PEPS y el PAR, tanto en control como cuando el protocolo de STDP es aplicado durante la sAHP. El protocolo de STDP fue aplicado a distintos intervalos de asociación (desde 1 a 40 ms) en presencia de CTZ (100 μ M). En presencia de CTZ, cuando la sAHP no fue activada el protocolo de STDP aplicado a intervalos menores de 30 ms generaron una robusta LTP, cuya magnitud fue mayor a la inducida por el mismo protocolo pero en ringer control. Para un intervalo de 20 ms la LTP alcanzó un 179.2 ± 4.9 % ($P < 0.05$, $n=6$), para un intervalo de 10 ms alcanzó un 235 ± 4.9 % ($P < 0.05$, $n=10$) y para intervalo de 5 ms, la LTP alcanzó una magnitud de 299.6 ± 9.3 %, $P < 0.05$, $n=6$; Figura 10).

El mismo protocolo de STDP a tres intervalos PEPS-PAR distintos 20, 10 y 5 ms, aplicado durante la sAHP en presencia de 100 μ M de CTZ, también indujo LTP, aunque su magnitud es menor que en control ($128.8 \pm 14.3\%$, $n=6$; 188.0 ± 8.6 %, $n=10$ y 260.5 ± 10.2 % $n=6$; que corresponde a 20, 10 y 5 ms de intervalo, respectivamente) (**Figura. 16 B**).

Estos resultados indican que cuando la amplitud y curso temporal del PEPS son aumentados con la aplicación del modulador alostérico de los AMPAR la CTZ, el efecto de la

sAHP es contrarrestado, aumentando significativamente el intervalo de coincidencia, entre los PEPSs y los PA postsinápticos.

Se graficó la relación entre la magnitud de la LTP inducida por diferentes intervalos entre PEPS-PAR en condición control y durante la sAHP, en presencia de CTZ (100 μ M) en el medio extracelular. Se determinó que esta relación se ajusta a una función exponencial simple (**Figura 16 B**). El ajuste exponencial fue significativamente diferente en control, que durante la sAHP. En control la τ alcanzó un valor de 13.7 ± 2.1 ms ($R^2 = 0.99$; $n = 36$), mientras que durante la sAHP la τ tuvo un valor de 9.3 ± 1.3 ms ($R^2 = 0.99$; $n = 36$). Esto confirma que la sAHP en presencia de CTZ, reduce significativamente la ventana temporal de coincidencia entre el PEPS y el PA postsinápticos. Si comparamos la ventana temporal de STDP durante la activación de la sAHP, en control y en presencia de CTZ, observamos que la CTZ tiene un efecto contrario y podría contrarrestar los efectos inhibitorios de la sAHP sobre la LTP.

Adicionalmente se determinó si la CTZ inducía cambios en la probabilidad de liberación de glutamato, analizando el índice de FPP. Se observó que, aunque la amplitud y duración de las corrientes excitadoras fueron aumentadas significativamente por la perfusión de CTZ, el índice de FPP no fue modificado (0.74 ± 0.06 en solución control y 0.67 ± 0.04 en CTZ), lo que indica que la CTZ no produce cambios significativos en la probabilidad de liberación en las sinapsis entre la CS y neuronas piramidales de CA1 (**Figura 16 C y D**)

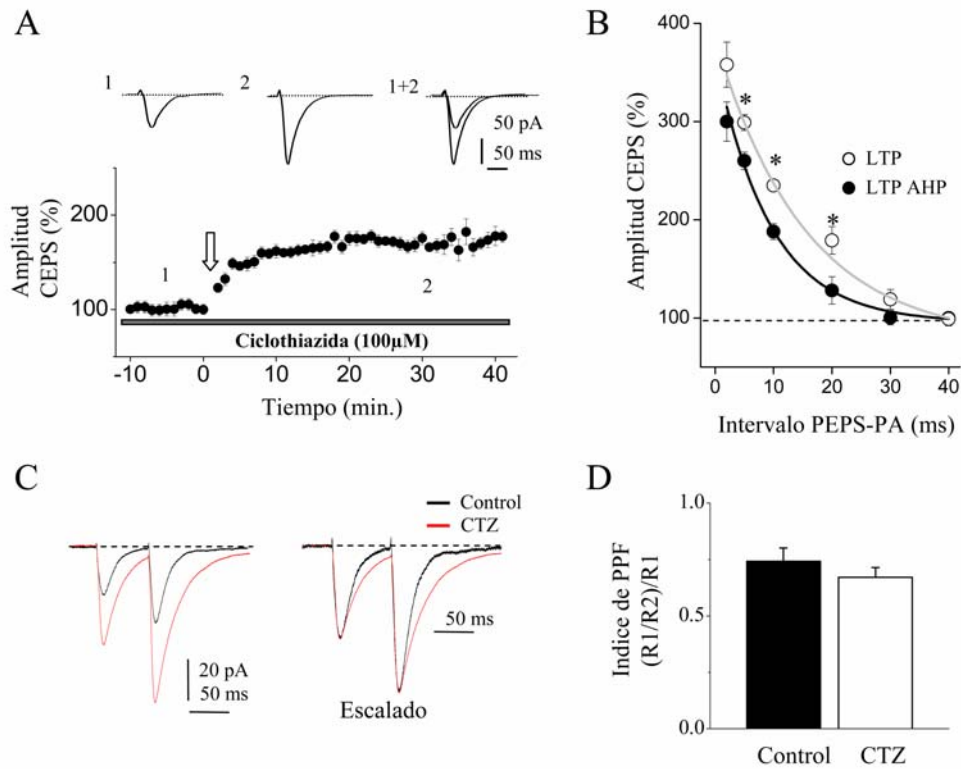


Figura 16. La ventana temporal de la STDP-LTP depende de la forma de onda del PEPS. A, se muestra que el protocolo de STDP aplicado (10 ms de intervalo PEPS-PAR) en presencia de 100 μ M de CTZ durante la sAHP induce LTP. El inserto muestra el registro de las CEPS (promedio de 10 trazos) antes y 30 minutos después de aplicado el protocolo de STDP. **B,** se muestra la relación funcional entre la magnitud de la potenciación y el intervalo de apareo PEPS-PAR, aplicado en presencia de CTZ, en situación control (círculos blancos) y durante la sAHP (círculos negros). Note que la CTZ aumenta la duración de la ventana temporal de coincidencia PEPS-PA. Los datos fueron ajustados a una función exponencial. **C,** se muestran los registros de FPP, tanto en control (trazo negro) como en CTZ (trazo rojo). **D,** los datos agrupados muestran que la CTZ no modifica el índice de FPP (n=20).

También comparamos la amplitud y τ de caída del PEPS en condición control y durante la sAHP, perfundiendo con solución control o adicionando 100 μ M de CTZ. En control la amplitud y τ de caída del PEPS fueron incrementados significativamente por la CTZ (de 5.5 ± 0.3 a 7.1 ± 0.3 mV y de 62.1 ± 3.8 a 99.5 ± 3.9 ms, respectivamente; $P < 0.05$; $n=10$). Durante la aplicación de CTZ, la sAHP disminuye la amplitud y curso temporal de los PEPS (7.1 ± 0.2 mV a 5.7 ± 0.3 mV y de 99.5 ± 2.4 ms a 72.1 ± 3.9 ms, respectivamente; $P < 0.05$; $n=10$). Aunque en presencia de CTZ la sAHP reduce la amplitud y curso temporal de los PEPS el valor de estos parámetros es muy similar al valor en ringer control, de forma que la CTZ contrarresta el efecto de la sAHP sobre los PEPS (**Figura 17 B**).

El aumento de la duración de los PEPS inducido por la perfusión de CTZ, determina que el cambio de g_m asociado a la sAHP tenga un menor efecto sobre la τ de caída del PEPS (reducción de un $28.2 \pm 6.1\%$; **Figura 8D**) (Spruston et al., 1994; Sah y Bekkers, 1996; Fernández de Sevilla et al., 2007). Además, observamos que la perfusión de CTZ no modifica la amplitud y la duración de los PA ($96.6 \pm 8.5\%$ y 98.5 ± 6.3 , respectivamente), ni la resistencia de entrada neuronal (190.5 ± 18.5 M Ω).

En resumen, la CTZ aumenta la ventana temporal para la STDP en condición control y puede contrarrestar el efecto de la sAHP, sugiriendo que la amplitud y forma de onda de los PEPS son un factor clave para determinar la duración de la ventana temporal para el STDP tanto en condición control como cuando la g_m incrementa por la activación de la sAHP.

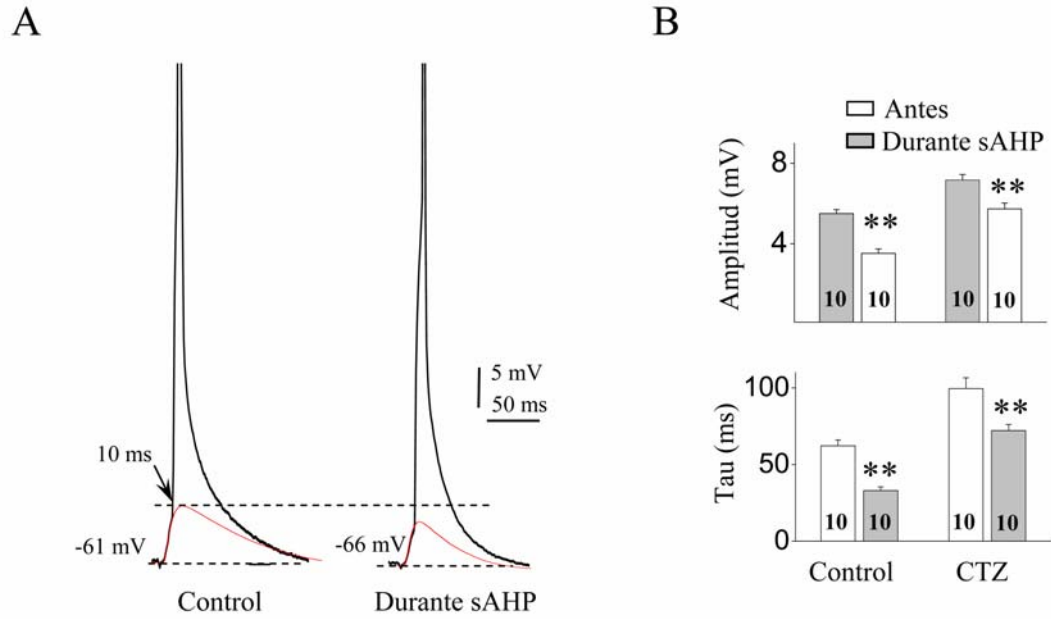


Figura 17. La CTZ contrarresta el efecto de la sAHP, aumentando la amplitud y duración de los PEPS. A, registro representativo del PEPS, antes y durante la sAHP, aislado o asociado con el PAR. El PEPS (trazo rojo) fue obtenido restando el PAR del PEPS-PAR. **B,** se muestra las diferencias en la amplitud y curso temporal de los PEPS en control y durante la sAHP, en ringer normal y con CTZ. Note que tanto la amplitud, como el curso temporal de los PEPS (en ringer solución control y con CTZ) son reducidos por la sAHP (el número de células se indica en cada caso).

V. DISCUSSION

En este trabajo se demostró que la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} que subyacen a la activación de la sAHP puede disminuir la ventana temporal de coincidencia entre los PEPS y los PA retropropagados necesarios para la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP). Los resultados sugieren que los cambios en la amplitud y especialmente en la cinética de los PEPS son los factores clave que determinan la duración de la ventana temporal en STDP. Como se demostró en otros trabajos (Sah y Bekkers, 1996; Buño et al., 2004; Fernández de Sevilla et al., 2007) el incremento de la *gm* que subyace a la apertura de los canales de la sAHP disminuye la amplitud y curso temporal de los PEPS en neuronas piramidales de CA1.

La inducción de LTP en sinapsis excitadoras del sistema nervioso central requiere la asociación entre la actividad presináptica (despolarización de la terminal sináptica y liberación de glutamato) y una fuerte despolarización postsináptica. En este contexto el receptor de NMDA tiene un papel fundamental. La apertura de este receptor, requiere de la unión de glutamato y de la despolarización postsináptica, permitiendo la entrada de Ca^{2+} , que conduce a la activación de cascadas bioquímicas intracelulares necesarias para inducir potenciación sináptica.

Aunque hace tres décadas se demostró que la despolarización postsináptica tiene un papel fundamental en la plasticidad sináptica, sólo recientemente se han caracterizado las propiedades funcionales de esta despolarización, fenómeno fundamental para inducir LTP en dendritas de neuronas centrales. El descubrimiento de la retropropagación de potenciales de acción de Na^+ por el árbol dendrítico de neuronas piramidales de corteza e hipocampo (Spruston et al., 1995; Stuart et al., 1997) sugirió que este evento despolarizante postsináptico podía ser determinante para la inducción de la plasticidad “Hebbiana”.

Siguiendo esta idea se realizaron una serie de experimentos en rodajas de corteza cerebral e hipocampo, que revelaron la importancia de la coincidencia temporal de la actividad pre y postsináptica para inducir plasticidad sináptica en las conexiones sinápticas (Magee y Johnston, 1997; Markram et al., 1997). Estos trabajos demostraron que la asociación temporal de un PEPS y un potencial de acción postsináptico puede inducir LTP o LTD. Específicamente, la inducción

de la LTP requiere que el PEPS sea seguido por un PA postsináptico con un retardo de entre 10 y 20 ms. En contraste LTD requiere que la espiga ocurra en una pequeña ventana de tiempo (< 40 ms) justo antes del PEPS (Markram et al., 1997; Magge y Johnston, 1997; Debanne et al., 1998; Bi y Poo, 1998; Song et al., 2000; Sjöström et al., 2001).

A esta forma de inducir plasticidad sináptica se la ha denominado “Spike Timing Dependent Plasticity (STDP) (Song et al., 2000; Abbott y Nelson, 2000; Revisado en Dan y Poo, 2004, 2006). Los requerimientos temporales para la inducción de la LTP asociativa con el protocolo de STDP han sido confirmadas en una amplia variedad de sinapsis excitatorias del sistema nervioso central, incluyendo sinapsis corticales y del hipocampo (Bi y Poo, 1998; Feldman, 2000; Wittenberg y Wang; 2006; Nevian y Sakmann, 2006).

En este trabajo se demostró que la ventana temporal para la inducción de la LTP en sinapsis entre las CS-CA1 es aproximadamente 20 ms y al igual que en otras sinapsis centrales la magnitud de la potenciación depende del intervalo PEPS-PAR, cuanto menor es el intervalo mayor es el nivel de la LTP alcanzado

Los mecanismos celulares que subyacen a la inducción de LTP con el protocolo de STDP no son del todo conocidos, aunque numerosas evidencias experimentales indican que existe una asociación entre la activación de los NMDAR y el PA postsináptico la cual determina el influjo y aumento de Ca^{2+} intracelular necesario para inducir potenciación sináptica (Bi and Poo, 1998; Bi, 2002; Kampa et al., 2004, 2006; Dan y Poo, 2004, 2006). Una serie de estudios utilizando imagen de Ca^{2+} , han demostrado que la interacción entre el PEPS y el potencial de acción retropropagado necesaria para inducir LTP es dependiente de la sumación supralinear de Ca^{2+} en las espinas dendríticas de las células piramidales (Yuste y Denk, 1995; Köster y Sakmann, 1998; Schiller et al., 1998). Este aumento transiente de Ca^{2+} en la espina dendrítica finalmente puede activar una serie de cascadas bioquímicas intracelulares responsables de inducir la LTP (Malenka y Nicoll, 1998; Malinow y Malenka 2002; Malenka y Bear, 2004).

Los resultados presentados aquí demuestran que el protocolo de STDP es incapaz de generar LTP cuando los receptores de NMDA son bloqueados con APV o cuando la neurona es cargada con el quelante rápido de Ca^{2+} BAPTA, indicando que la activación de los NMDAR, su desbloqueo del Mg^{2+} y el aumento intracelular de Ca^{2+} son absolutamente necesarios para inducir la LTP.

El flujo de Ca^{2+} a través de canales voltaje dependientes puede aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular e inducir LTP. En neuronas piramidales de CA1 se ha demostrado que la activación de canales de Ca^{2+} tipo L juegan un papel muy importante en el influjo de Ca^{2+} cuando las neuronas son despolarizadas (Bi y Poo 1998; 2001; Schiegg et al., 1995; Raymond y Redman, 2002, 2006). Sin embargo, en este trabajo se muestra que la inducción de LTP por el protocolo de STDP es independiente de la activación de canales de Ca^{2+} tipo L ya que la aplicación extracelular del bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo L nimodipina no inhibe la potenciación. No obstante aunque la inducción de LTP no es alterada, la nimodipina puede disminuir la magnitud de la LTP en neuronas piramidales de CA1.

Otra fuente potencial de Ca^{2+} que puede contribuir a la inducción de la plasticidad sináptica, son los reservorios intracelulares de Ca^{2+} (Harvey y Collingridge, 1992; Schiegg et al., 1995; Lu y Hawkins, 2002; Raymond y Redman, 2002; 2006). En este trabajo se demuestra que el bloqueo de los receptores de IP₃ y rianodina con heparina y reuthenium red respectivamente, no fue capaz de inhibir la inducción ni reducir la magnitud de la LTP. Además se muestra que la perfusión con thapsigargina, droga que vacía los reservorios de Ca^{2+} por inhibición de la recaptura de Ca^{2+} por la bomba Ca^{2+} -ATPasa presente en la membrana del retículo endoplasmático (Thastrup et al., 1990; Harvey y Collingridge, 1992), no inhibió ni modificó el nivel de LTP inducida por el protocolo de STDP.

Estos resultados demuestran que la inducción de la LTP por el protocolo de STDP esta determinada por mecanismos postsinápticos, donde el aumento de Ca^{2+} intracelular depende

fundamentalmente de la activación de los NMDAR, mientras que otras fuentes celulares de Ca^{2+} (Canales de Ca^{2+} tipo L o reservorios intracelulares) no son esenciales.

La inducción de la LTP en la sinapsis entre las CS y neuronas piramidales de CA1 se origina postsinápticamente (Malinow y Malenka, 2002; Malenka y Bear, 2004; Collingridge et al., 2004). Sin embargo existe gran controversia acerca del sitio (pre o postsináptico) de expresión de la LTP (Paré, 2004; Malenka y Bear, 2004; Martín y Buño 2003; Cabezas y Buño 2005). Postsinápticamente la LTP se puede expresar como un aumento en el número y/o un incremento en la conductancia iónica unitaria de receptores postsinápticos funcionales de AMPA (AMPA) (Kullmann y Siegelbaum, 1995; Malenka y Bear, 2004; Collingridge et al., 2004) o por un aumento de la sensibilidad de los AMPARs al glutamato liberado (Kullman y Siegelbaum, 1995; Malinow y Malenka, 2002). Sin embargo, también se ha propuesto que mecanismos presinápticos como el aumento en la probabilidad de liberación o la cantidad de glutamato liberado pueden estar contribuyendo a la expresión de LTP en neuronas piramidales de CA1 (Kullmann y Siegelbaum, 1995; Voronin y Cherubini, 2004; Cabezas y Buño, 2006).

Los resultados muestran que la expresión de la LTP inducida por el protocolo de STDP está determinada exclusivamente por cambios postsinápticos, sin contribución significativa de cambios en las terminales presinápticas. Tanto el índice de facilitación por pulsos apareados o la distribución del coeficiente de variación muestran que la probabilidad de liberación no se ve modificada con la inducción de la LTP por STDP en neuronas piramidales de CA1.

Los mecanismos celulares que subyacen a la expresión de potenciación por el protocolo de STDP no han sido determinados. Los resultados aquí mostrados, sugieren que la expresión de la LTP puede requerir los mismos mecanismos celulares descritos para la expresión postsináptica de otras formas de LTP, como la conversión de sinapsis silentes en funcionales (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995; Cabezas y Buño, 2006), el aumento del número de receptores de AMPA expresados en las espinas dendríticas potenciadas (Malenka y Nicoll, 1999; Malinow y Malenka,

2002; Bear y Malenka, 2004) o a modificaciones en las propiedades biofísicas de los receptores de AMPA (Benke et al., 1998; Malenka y Nicoll 1999; Soderling y Derkach, 2000).

La sincronización entre la actividad pre y postsináptica que determina la ventana temporal necesaria para inducir potenciación sináptica, depende en gran medida de la interacción de los PEPSs y los PARs con las propiedades electrotónicas del árbol dendrítico y principalmente con los canales iónicos presentes en las dendritas de neuronas centrales (Stuart et al, 1997; Hoffman et al., 1997; Migliore et al., 1999; Stuart y Häusser, 2001). La activación de canales iónicos en el árbol dendrítico puede modificar significativamente la interacción entre los PEPS y los PA postsinápticos que se propagan por la dendrita (Hoffman et al., 1997; Stuart y Häusser, 2001). Recientemente se ha sugerido que la distribución y densidad de canales de K^+ que subyacen a la corriente transitoria *I_a* y canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} pueden modular la inducción de LTP, regulando la propagación y forma de onda de los PEPS y PA postsinápticos (Sourdret y Debanne, 1999; Shouval et al., 2002; Le Ray et al., 2004; revisado en Dan y Poo, 2004, 2006). En este sentido, recientemente se ha demostrado que los PEPS pueden inactivar los canales de K^+ responsables de la corriente transitoria *I_a* en dendritas distales de neuronas piramidales de CA1, amplificando significativamente el PA dendrítico, contribuyendo a una disminución del umbral de inducción de la LTP en dendritas distales de neuronas piramidales de CA1 (Watanabe et al., 2002).

Diferentes tipos de neurotransmisores y hormonas, distintos patrones de actividad neuronal, el aprendizaje y memoria o condiciones patológicas como la epilepsia, pueden inducir modificaciones en varias conductancias iónicas presentes en las dendritas de neuronas piramidales de hipocampo. Los canales de K^+ que subyacen a la sAHP pueden ser modulados por varios neurotransmisores. La acetilcolina, el glutamato y diferentes monaminas como norepinefrina, serotonina, dopamina e histamina pueden suprimir la sAHP e incrementar la excitabilidad de neuronas piramidales de hipocampo (Pedarzani y Storm, 1993; Haug y Storm, 2000; Melyan et al., 2002; Fisahn et al., 2005). Este aumento de la excitabilidad de las dendritas puede jugar un

papel muy importante en la regulación de la capacidad computacional de la neurona y de las reglas que gobiernan la inducción de la plasticidad sináptica. De esta manera, diferentes tipos de neurotransmisores que reducen la amplitud de la sAHP, pueden incrementar la excitabilidad neuronal facilitando la propagación de los PEPS y favorecer la retropropagación de los PA, ambos, elementos claves para alcanzar el nivel mínimo de despolarización requerida para generar LTP (Magee y Johnston, 1997; Watanabe et al., 2002; Kampa et al., 2004, 2006; Le Ray et al., 2004).

El presente trabajo demuestra que la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} que subyacen a la sAHP puede reducir la ventana temporal de coincidencia entre el PEPS y los PA postsinápticos el cual es indispensable para inducir la LTP. Tal vez sea funcionalmente relevante que la reducción de la ventana temporal por la sAHP pueda conducir a una inhibición total de la LTP cuando el protocolo es aplicado a intervalos PEPS-PA superiores a 10 ms o reducir la magnitud de la potenciación cuando el intervalo es más breve (5 ms). De esta manera la sAHP induce una reducción en la probabilidad de asociación temporal entre la actividad pre y postsináptica modificando las capacidades computacionales y aumentando el umbral de inducción de la LTP asociativa en dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1 de hipocampo.

La potenciación en la región de CA1 del hipocampo es entrada-específica, es decir que sólo se potencian las entradas que son activadas por el protocolo que induce LTP. (Andersen et al., 1977; Lynch et al., 1990; Malenka y Nicholl, 1999; Dan y Poo, 2004, 2006). Existe, evidencia experimental que indica que los canales de la sAHP en neuronas piramidales de CA1 están distribuidos principalmente en el soma y en la porción inicial de la dendrita apical (Sah y Bekkers, 1996; Beckers, 2000; Fernández de Sevilla et al., 2007). Lo anterior sugiere que la inhibición de la LTP por la sAHP podría estar restringida a una región en particular y no se extendería al resto del árbol dendrítico. Estimulando dos grupos separados de fibras de CS, una entrada proximal a 150 μm de la capa piramidal y una distal a 250 μm , se demostró en primer

término que el protocolo de STDP induce LTP sólo en las entradas sinápticas estimuladas, demostrando la naturaleza “Hebianna” de este protocolo de LTP. En segundo término y más importante, la potenciación sináptica es inhibida en ambas entradas sinápticas cuando el protocolo de STDP era aplicado durante la sAHP, sugiriendo que la sAHP es capaz de regular la inducción de LTP en una porción significativa del árbol dendrítico apical de neuronas piramidales de CA1.

En trabajos anteriores se demostró que la activación de la sAHP produce un cortocircuito (“shunt”) dendrítico selectivo, el cual es capaz de reducir la amplitud del componente NMDA (Buño et al., 2004; Fernández de Sevilla et al., 2007) y disminuir el curso temporal del componente AMPA de los PEPS en dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1 (Sah y Bekkers, 1996; Buño et al., 2004; Fernández de Sevilla et al., 2007). Estas modificaciones en la amplitud y forma de onda de los PEPSs parecen depender fundamentalmente del aumento de la g_m que subyace a la apertura de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} que activan sAHP. La reducción selectiva del componente NMDA puede estar determinada por un rebloqueo del canal del NMDAR, producido por la hiperpolarización que acompaña a la sAHP. Sin embargo, como se muestra en este trabajo la hiperpolarización generada por los canales de la sAHP, no inhibe la inducción de la LTP, lo que sugiere que la reducción de la amplitud del PEPS y la inhibición de la potenciación sináptica no es debida al rebloqueo del canal de NMDA por Mg^{2+} .

Los cambios inducidos por la sAHP sobre la ventana temporal de coincidencia son totalmente independientes de la hiperpolarización que se genera durante la activación de los canales de la sAHP por que (i) sin la presencia de la sAHP la hiperpolarización *per se* no modifica la ventana temporal de coincidencia y (ii) la activación de la sAHP a potenciales hiperpolarizados cercanos al potencial de reversión del K^+ no hiperpolariza la célula pero aumenta la g_m lo suficiente como para bloquear la inducción de la LTP.

Como se ha mostrado en este trabajo el pulso despolarizante, utilizado para generar la sAHP, también induce la activación del componente medio de AHP, la mAHP. Se ha

demostrado que la inhibición de este componente puede incrementar la excitabilidad (Lankaster et al., 2001; Garduño et al., 2005) y reducir el umbral de inducción de la LTP en neuronas piramidales de hipocampo (Stackman et al., 2002; Hammond et al., 2006). Sin embargo, mis resultados muestran que a pesar que la aplicación extracelular de apamina inhibe totalmente la mAHP, no altera la capacidad de la sAHP de inhibir la potenciación sináptica. En este contexto la apamina, tampoco modificó la magnitud de la potenciación.

En neuronas piramidales de CA1 la activación de la corriente catiónica I_h puede disminuir la duración del PEPS (Magee 1999, 2000; Williams y Stuart 2000). Sin embargo, estos resultados muestran que la I_h , que puede ser activada por la hiperpolarización que subyace a la sAHP, no interfiere con el protocolo de STDP, ya que la inhibición de los canales de la I_h con el bloqueador específico ZD7288, no evita que la sAHP inhiba la LTP.

Estos resultados permiten proponer que el efecto de la sAHP sobre la ventana de coincidencia del STDP, depende fundamentalmente de la reducción de la amplitud y duración de los PEPSs que se propagan por las dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1. Funcionalmente, esta modificación en la amplitud y forma de onda de los PEPSs y que provoca una disminución de la ventana temporal de coincidencia entre el PEPS y el PAR, puede estar determinada esencialmente por una disminución en el nivel mínimo de despolarización requerida por la espina dendrítica para activar los NMDAR (desbloqueo por Mg^{2+}), situación indispensable para inducir LTP. De acuerdo a esta hipótesis, aquí se demuestra que los efectos de la sAHP son contrarrestados por la CTZ una droga que elimina la desensibilización de los receptores de AMPA, la cual induce un importante incremento en la amplitud y duración del PEPS y por tanto del nivel de despolarización de la dendrita, sin afectar significativamente a los PA postsinápticos.

Es llamativo que, la CTZ induce una gran aumento de la ventana temporal para la inducción de potenciación no sólo cuando la sAHP esta activada sino también en condición control. Es importante destacar el efecto opuesto que muestran la sAHP y la CTZ sobre la ventana temporal de coincidencia PEPS-PAR, pues aporta una nueva evidencia acerca de la

importancia de las características del PEPS (amplitud y curso temporal) en la STDP, especialmente sobre los requerimientos temporales para la inducción de la LTP asociativa. Evidencia experimental reciente concuerda con esta hipótesis, ya que experimentos realizados tanto en corteza (Feldman, 2000; Sjöström et al., 2001) como en cultivos de neuronas de hipocampo (Bi y Poo, 1998; Debanne et al., 1998), han demostrado que la inducción de LTP demanda PEPS de gran amplitud, lo que sugiere que la despolarización aportada por el PEPS es indispensable para la generación de LTP. La contribución de las propiedades de los PEPSs (amplitud y duración) a la inducción de LTP, deben ser analizados en detalle debido a que el PEPS puede ser modificado de muchas maneras, como lo indica una serie de evidencias experimentales que muestran que el aumento de amplitud y curso temporal del componente AMPA puede facilitar la inducción de plasticidad sináptica y favorecer el aprendizaje (Arai y Lynch 1992, Staubli et al., 1994; Arai et al., 2004).

En suma estos resultados podrían tener una gran relevancia funcional, ya que la sAHP además de controlar la integración de las entradas sinápticas en dendritas apicales, pueden controlar el umbral de inducción de potenciación sináptica en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo. Es destacable que ráfagas de potenciales de acción registradas en ratas *in vivo* (Núñez et al., 1987; Kamondi et al., 1998) son seguidas comúnmente por una hiperpolarización lenta que podría ser mediada por los canales de la sAHP. De esta forma fisiológicamente la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , que median la sAHP pueden actuar como un interruptor celular que puede modificar la duración de la ventana temporal de coincidencia entre la actividad pre y postsináptica necesaria para la inducción de LTP. Los mecanismos que inducen cambios en la ventana temporal para el STDP pueden controlar la ganancia de las entradas sinápticas, regulando la magnitud de la potenciación sináptica. Nuestros resultados sugieren que la amplitud y duración de los PEPS tienen un papel muy relevante en el control de la ventana temporal de la STDP, proporcionando otro mecanismo de regulación dinámica de la plasticidad neuronal, pudiendo ser decisivo para la codificación del aprendizaje y la memoria.

VI. CONCLUSIONES

- 1- En neuronas piramidales de la región de CA1 del hipocampo el protocolo de STDP induce LTP con una ventana temporal de coincidencia PEPS y PAR de 20 milisegundos. La magnitud de la potenciación aumenta a medida que el intervalo de coincidencia disminuye.
- 2- La LTP inducida por el protocolo de STDP es dependiente de la activación de receptores para glutamato NMDA y del aumento intracelular de Ca^{2+} y la expresión de la LTP esta determinada por cambios postsinápticos.
- 3- La activación de los canales de la sAHP reduce la amplitud y curso temporal de los PEPS controlando su propagación en dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1
- 4- La reducción de la amplitud y duración de los PEPS inducida por la sAHP puede regular la ventana temporal de coincidencia entre el PEPS y el PAR, disminuyendo el nivel de despolarización dendrítica requerida para activar los receptores de NMDA e inducir LTP
- 5- Los cambios inducidos por la sAHP sobre la ventana temporal de la STDP son causados por aumento de la conductancia de membrana generada por la apertura de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} que subyacen a la sAHP y son totalmente independientes de la hiperpolarización de la membrana.
- 6- Los efectos de la sAHP pueden ser contrarrestados por la aplicación de CTZ, una droga que elimina la desensibilización de los receptores de AMPA, que induce una gran aumento en la amplitud y duración de los PEPS sin afectar a los PA postsinápticos.

- 7- La activación de los canales de K^+ calcio dependientes que subyacen a la sAHP pueden actuar como un interruptor celular que modifica la duración de la ventana temporal entre la actividad pre y postsináptica indispensable para la inducción de LTP que se piensa es la base del aprendizaje y memoria en el hipocampo.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abbott LF, Nelson SB** (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci* 3:1178-83.
- Abel HJ, Lee JC, Callaway JC, Foehring RC.** Relationships between intracellular calcium and afterhyperpolarizations in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 2004 Jan;91(1):324-35.
- Amaral DG, Witter MP** (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.*;31(3):571-91. Review.
- Andersen P, Sundberg SH, Sveen O, Swann JW, Wigstrom H** (1980). Possible mechanisms for long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices from guinea-pigs. *J Physiol.* 302:463-82.
- Anderson P, Lomo T.**(1966). Mode of activation of hippocampal pyramidal cells by excitatory synapses on dendrites *Exp Brain Res.* 2:247-60.
- Anderson P, Bliss TV, Skrede KK.** (1971). Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res.*;13(2):222-38.
- Andreasen M, Lambert JD** (1995). The excitability of CA1 pyramidal cell dendrites is modulated by a local Ca (2+)-dependent K(+)-conductance. *Brain Res* 698:193-203
- Arai A, Lynch G** (1992). Factors regulating the magnitude of long-term potentiation induced by theta pattern stimulation. *Brain Res.* 598:173-84.
- Arai A, Lynch G** (1996). Response to repetitive stimulation of AMPA receptors in patches excised from fields CA1 and CA3 of the hippocampus. *Brain Res* 716:202-6.
- Arai AC, Xia YF, Suzuki E** (2004), Modulation of AMPA receptor kinetics differentially influences synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* 123:1011-24.
- Araque A, Buzsáki W** (1995). Fast, persistent, Ca(2+)-dependent K⁺ current controls graded electrical activity in crayfish muscle. *Pflugers Arch.* 430:541-51.
- Artola A, Singer W** (1993). Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 16:480-7. Review.
- Barrionuevo G, Brown TH** (1983) Associative long-term potentiation in hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(23):7347-51.
- Bear MF, Cooper LN, Ebner FF** (1987). A physiological basis for a theory of synapse modification. *Science.* 237:42-8.
- Bear MF, Kirkwood A.** Neocortical long-term potentiation. *Curr Opin Neurobiol.* 1993 3:197-202.
- Bekkers JM, Stevens CF** (1990). Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 346:724-9.
- Bekkers JM.** (2000). Distribution of slow AHP channels on hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 83:1756-9.
- Benke TA, Luthi A, Isaac JT, Collingridge GL** (1998). Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393:793-7.
- Bennett MR.** The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol.* 2000 60:109-37.
- Bi GQ, y Poo MM** (1998). Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 18:10464-72.
- Bi GQ, Wang HX** (2002). Temporal asymmetry in spike timing-dependent synaptic plasticity. *Physiol Behav.* 77:551-5.

- Blatz AL, Magleby KL** (1986). Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323(6090):718-20.
- Bliss TV, Lomo T** (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232:331-56.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR** (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232(2):357-74.
- Bliss TV, Collingridge GL** (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-9.
- Bonansco C, Buno W** (2003). Cellular mechanisms underlying the rhythmic bursts induced by NMDA microiontophoresis at the apical dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus.*;13(1):150-63.
- Bond CT, Maylie J, Adelman JP** (1999) Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Ann N Y Acad Sci.* 868:370-8.
- Borde M, Cazalets JR, Buno W** (1995). Activity-dependent response depression in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. *J Neurophysiol.*74:1714-29.
- Borde M, Bonansco C, Buño W** (1999) The activity-dependent potentiation of the slow Ca²⁺-activated K⁺ current regulates synaptic efficacy in rat CA1 pyramidal neurons. *Pflugers Arch* 437:261-266.
- Bowden SE, Fletcher S, Loane DJ, Marrion NV** (2001). Somatic colocalization of rat SK1 and D class (Ca(v)1.2) L-type calcium channels in rat CA1 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 21(20):RC175.
- Buno W, Fernández de Sevilla D, Fuenzalida, M** (2004). The slow after hyperpolarization selectively shunts the NMDA component of glutamatergic EPSPs in CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *Soc Neurosci Abstract* 169.5.
- Cabezas C, Buno W** (2006) Distinct transmitter release properties determine differences in short-term plasticity at functional and silent synapses. *J Neurophysiol.* 95:3024-34.
- Cajal SR** (1894). The Croonian Lecture: La fine structure des centres nerveux. *Proc Royal Soc London* 55: 444-468.
- Choi S, Klingauf J, Tsien RW** (2000). Postfusional regulation of cleft glutamate concentration during LTP at 'silent synapses'. *Nat Neurosci.* 3:330-6
- Cline HT.** Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2001 Feb;11(1):118-26. Review.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H** (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol.* 334:33-46.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H** (1984). The action of some analogues of the excitatory amino acids in the dentate gyrus of the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 62:424-9.
- Collingridge GL, Bliss TV** (1995). Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci.* 18:54-6.
- Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT** (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:52-62.
- Creager R, Dunwiddie T, Lynch G** (1980). Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J Physiol* 299:409-24.
- Christie BR, Eliot LS, Ito K, Miyakawa H, Johnston D** (1995). Different Ca²⁺ channels in soma and dendrites of hippocampal pyramidal neurons mediate spike-induced Ca²⁺ influx. *J Neurophysiol.* 73:2553-7.
- Dan Y, Poo MM** (2004) Spike timing-dependent plasticity of neural circuits. *Neuron.* 44:23-30.
- Dan Y, Poo MM** (2006) Spike timing-dependent plasticity: from synapse to perception. *Physiol Rev.* 86:1033-48.

- de Sevilla DF, Cabezas C, de Prada AN, Sanchez-Jimenez A, Buno W** (2002) Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol.* 545:51-63.
- de Sevilla DF, Garduno J, Galvan E, Buno W** (2006) Calcium-activated afterhyperpolarizations regulate synchronization and timing of epileptiform bursts in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 96:3028-41.
- Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM** (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol* 491:163-76.
- Debanne D, Gahwiler BH, Thompson SM** (1998) Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J Physiol.* 507:237-47
- Dudek SM, Bear MF** (1993). Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J Neurosci.* 13:2910-8.
- Errington ML, Lynch MA, Bliss TV** (1987). Long-term potentiation in the dentate gyrus: induction and increased glutamate release are blocked by D(-)-aminophosphonovalerate. *Neuroscience.* 20:279-84.
- Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Haganir RL, Malinow R** (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci.* 6:136-43.
- Faber DS, Korn H** (1991). Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys J.* 60:1288-94.
- Feldman DE, Nicoll RA, Malenka RC.** Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses. *J Neurobiol.* 1999 Oct;41(1):92-101.
- Feldman DE** (2000). Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron* 27:45-56.
- Fernandez de Sevilla, Fuenzalida M, Portos-Pazos A, Buño W** (2007) Selective shunting of NMDA EPSP component by the slow after hyperpolarization in rat CA1 pyramidal neurons. Under revision *J Neurophysiol.*
- Fisahn A, Heinemann SF, McBain CJ** (2005). The kainate receptor subunit GluR6 mediates metabotropic regulation of the slow and medium AHP currents in mouse hippocampal neurones. *J Physiol.* 562:199-203.
- Fisher R, Johnston D.** (1990) Differential modulation of single voltage-gated calcium channels by cholinergic and adrenergic agonists in adult hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 64:1291-302.
- Foehring RC, Schwindt PC, Crill WE** (1989). Norepinephrine selectively reduces slow Ca²⁺- and Na⁺-mediated K⁺ currents in cat neocortical neurons. *J Neurophysiol.* 61:245-56.
- Frey U, Morris RG** (1998). Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 21:181-8.
- Fukunaga, K., Stoppini, L., Miyamoto, E. & Muller, D** (1993). Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol. Chem.* 268, 7863-7867.
- Garduno J, Galvan E, Fernandez de Sevilla D, Buno W** (2005). 1-Ethyl-2-benzimidazolinone (EBIO) suppresses epileptiform activity in in vitro hippocampus. *Neuropharmacology.* 49:376-88.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY** (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* Mar 25;260(6):3440-50.
- Gulledge AT, Kampa BM, Stuart GJ** (2005) Synaptic integration in dendritic trees. *J Neurobiol.* 64:75-90.
- Hammond RS, Bond CT, Strassmaier T, Ngo-Anh TJ, Adelman JP, Maylie J, Stackman RW** (2006) Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel type 2 (SK2) modulates hippocampal learning, memory, and synaptic plasticity. *J Neurosci.* 26:1844-53.

- Harvey J, Collingridge GL** (1992). Thapsigargin blocks the induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 139:197-200.
- Haug T, Storm JF** (2000). Protein kinase A mediates the modulation of the slow Ca²⁺-dependent K⁺ current, I(sAHP), by the neuropeptides CRF, VIP, and CGRP in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 83:2071-9.
- Hausser M, Spruston N, Stuart GJ** (2000) Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science* 290:739-44.
- Hausser M, Major G, Stuart GJ** (2001). Differential shunting of EPSPs by action potentials. *Science* 291:138-41.
- Hebb, D. O.** 1949 The organization of behavior. New York: Wiley.
- Hestrin S, Sah P, Nicoll RA** (1990) Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocampal slices. *Neuron* 5:247-53.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D** (1997). K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387:869-75.
- Hoogland TM, Saggau P** (2004) Facilitation of L-type Ca²⁺ channels in dendritic spines by activation of 2 adrenergic receptors. *J Neurosci* 24: 8416–8427
- Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC.** (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron.* 15:427-34.
- Johnston D, Hoffman DA, Magee JC, Poolos NP, Watanabe S, Colbert CM, Migliore M** (2000) Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* 1:75-81.
- Kamondi A, Acsady L, Wang XJ, Buzsaki G.** (1998) Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: activity-dependent phase-precession of action potentials. *Hippocampus.* 8:244-61.
- Kampa BM, Clements J, Jonas P, Stuart GJ** (2004). Kinetics of Mg²⁺ unblock of NMDA receptors: implications for spike-timing dependent synaptic plasticity. *J Physiol.* 556(Pt 2):337-45.
- Kampa BM, Stuart GJ** (2006). Calcium spikes in basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons during action potential bursts. *J Neurosci.* 26:7424-32.
- Katsuki H, Izumi Y, Zorumski CF** (1997) Noradrenergic regulation of synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region. *J Neurophysiol* 77: 3013–3020.
- Katz LC, Shatz CJ** (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science.* 274:1133-8.
- Kelso SR, Ganong AH, Brown TH** (1986). Hebbian synapses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:5326-30
- Kaczorowski, CC, Disterhoft JF, Spruston N** (2003). Differential activity-dependent plasticity of the slow afterhyperpolarization evoked by tetanic vs. theta-burst stimulation in CA1 pyramidal neurons: a role for the hyperpolarization-activated cation conductance. *Soc Neurosci Abs* 369.13.
- Koester HJ, Sakmann B** (1998). Calcium dynamics in single spines during coincident pre- and postsynaptic activity depend on relative timing of back-propagating action potentials and subthreshold excitatory postsynaptic potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:9596-601.
- Kullmann DM, Siegelbaum SA** (1995) The site of expression of NMDA receptor-dependent LTP: new fuel for an old fire. *Neuron* 15:997-1002.
- Lancaster B, Adams PR** (1986) Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 55:1268-82.
- Lancaster B, Nicoll RA** (1987) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 389:187-203.

- Lancaster B, Hu H, Ramakers GM, Storm JF** (2001) Interaction between synaptic excitation and slow afterhyperpolarization current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 536:809-23.
- Lancaster B, Hu H, Gibb B, Storm JF** (2006) Kinetics of ion channel modulation by cAMP in rat hippocampal neurones. *J Physiol*. 576:403-17.
- Landfield PW, McGaugh JL, Lynch G** (1978). Impaired synaptic potentiation processes in the hippocampus of aged, memory-deficient rats. *Brain Res*. 150:85-101.
- Le Ray D, Fernández de Sevilla D, Porto AB, Fuenzalida M Buño W** (2004). Heterosynaptic metaplastic regulation of synaptic efficacy in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *Hippocampus* 14:1011-1025.
- Levy WB, Steward O** (1979). Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brain Res*. 175:233-45.
- Liao D, Hessler NA, Malinow R.** (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature*.375:400-4.
- Lin YW, Min MY, Chiu TH, Yang HW** (2003) Enhancement of associative long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors at CA1 synapses in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 23:4173-81.
- Lisman J, Schulman H, and Cline H.** The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3: 175–190, 2002
- Lisman J, Spruston N** (2005). Postsynaptic depolarization requirements for LTP and LTD: a critique of spike timing-dependent plasticity. *Nat Neurosci*. 8:839-41.
- Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP, Aiyar J** (1997). A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 272:32723-6.
- Lorente de No, R** (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol*. 46: 113-177.
- Lorenzon NM, Foehring RC** (1992). Relationship between repetitive firing and afterhyperpolarizations in human neocortical neurons. *J Neurophysiol*. 67:350-63.
- Lu YF, Hawkins RD** (2002) Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurophysiol*. 88:1270-8.
- Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F** (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* Oct 20-26;305(5936):719-21.
- Lynch G, Kessler M, Arai A, Larson J** (1990). The nature and causes of hippocampal long-term potentiation. *Prog Brain Res*. 83:233-50.
- Lynch MA** (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*. 84:87-136.
- Madison DV, Nicoll RA** (1984). Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* .354:319-31
- Magee JC, Johnston D.** (1997). A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275:209-13.
- Magee JC** (1999) Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci* 2:508-14.
- Magee JC** (2000) Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci* 1:181-90.
- Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS, and Nicoll RA** (1988). Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242: 81–84, 1988

- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Nicoll RA** (1989) The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission-its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 12:444-50.
- Malenka RC, Nicoll RA** (1999) Long-term potentiation-a decade of progress. *Science* 285:1870-4.
- Malenka RC, Bear MF** (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW** (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science.* 245:862-6.
- Malinow R, Tsien RW** (1990) Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346:177-80.
- Malinow R, Malenka RC** (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity *Annu Rev Neurosci* 25:103-26.
- Manabe T, Willie DJA., Perkel DJ, Nicoll R A** (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effect on paired-pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 70: 1451-1459.
- Martinez JL Jr, Derrick BE** (1996) Long-term potentiation and learning. *Annu Rev Psychol.*;47:173-203. Review.
- Markram H, Lubke J, Frotscher M, Sakmann B** (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275:213-5.
- Martín ED, Araque A, Buño W** (2001) Synaptic regulation of the slow Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *J Neurophysiol* 86:2878-2886.
- Marty A** (1989). The physiological role of calcium-dependent channels. *Trends Neurosci.* 12: 420-4.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB** (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature.* 309:261-3.
- McLennan H, Liu J** (1982). The action of six antagonists of the excitatory amino acids on neurones of the rat spinal cord. *Exp Brain Res.* 45:151-6.
- McNaughton BL, Douglas RM, Goddard GV** (1978). Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents. *Brain Res.* 157:277-93.
- McNaughton BL** (1982). Long-term synaptic enhancement and short-term potentiation in rat fascia dentata act through different mechanisms. *J Physiol.* 324:249-62.
- Meliza CD, Dan Y.** Receptive-field modification in rat visual cortex induced by paired visual stimulation and single-cell spiking. *Neuron.* 49:183-9.
- Melyan Z, Wheal HV, Lancaster B** (2002). Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. *Neuron* 34:107-14.
- Migliore M, Hoffman DA, Magee JC, Johnston D** (1999). Role of an A-type K⁺ conductance in the back-propagation of action potentials in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J Comput Neurosci* 7:5-15.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M** (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 319:774-6.
- Mu Y, Poo MM** (2006). Spike timing-dependent LTP/LTD mediates visual experience-dependent plasticity in a developing retinotectal system. *Neuron* 50:115-25.
- Mulkey RM, Malenka RC** (1992). Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9:967-75
- Nevian T, Sakmann B** (2006). Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci.* 26:11001-13.

Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin D, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2003). The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* 15:551-64

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-5.

Nunez A, Garcia-Austt E, Buno W Jr. (1987). Intracellular theta-rhythm generation in identified hippocampal pyramids. *Brain Res.* 416:289-300.

Otmakhov, N., Griffith, L. C. & Lisman, JE (1997). Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing induced long-term potentiation. *J. Neurosci.* 17:5357–5365.

Pare D (2004). Presynaptic induction and expression of NMDA-dependent LTP. *Trends Neurosci* 27:440-1.

Paulsen O, Sejnowski TJ (2000). Natural patterns of activity and long-term synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 10:172-9.

Pedarzani P, Storm JF (1993). PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K⁺ current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron* 11:1023-35.

Penfield W, Milner B (1958). Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 79:475-97.

Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* 2:24-32.

Rall W (1967). Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for different soma-dendritic distributions of synaptic input. *J Neurophysiol.* 30:1138-68.

Raymond CR, Redman SJ (2002) Different calcium sources are narrowly tuned to the induction of different forms of LTP. *J Neurophysiol* 88:249-55.

Raymond CR, Redman SJ (2006) Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus *J Physiol.* 570:97-111.

Regehr WG, Tank DW (1990). Postsynaptic NMDA receptor-mediated calcium accumulation in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites. *Nature.*345:807-10

Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR, Amaral DG (1996). Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J Neurosci.* 16:5233-55.

Sah P, Bekkers JM (1996) Apical dendritic location of slow afterhyperpolarization current in hippocampal pyramidal neurons: implications for the integration of long-term potentiation. *J Neurosci* 16:4537-4542.

Sah P (1996). Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurons: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci;* 19:150-154.

Sah P, Faber ES (2002) Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol.* 66:345-53.

Sastry B.R., Goh J.W and Auyeung, A (1986). Associative induction of posttetanic and long-term potentiation in CA1 neurons of rat hippocampus. *Science* 232:900-988.

Schiller J, Schiller Y, Clapham DE (1998). NMDA receptors amplify calcium influx into dendritic spines during associative pre- and postsynaptic activation. *Nat Neurosci.* 1:114-8.

Schwartzkroin PA, Wester K (1975). Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. *Brain Res.* 89:107-19.

- Schiegg A, Gerstner W, Ritz R, van Hemmen JL** (1995). Intracellular Ca²⁺ stores can account for the time course of LTP induction: a model of Ca²⁺ dynamics in dendritic spines. *J Neurophysiol.* 74:1046-55.
- Shouval HZ, Bear MF, Cooper LN** (2002) A unified model of NMDA receptor-dependent bidirectional synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10831-6.
- Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB** (2001) Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron* 32:1149–1164.
- Sjostrom PJ, Nelson SB** (2002) Spike timing, calcium signals and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 12:305-14.
- Soderling TR, Derkach VA** (2000). Postsynaptic protein phosphorylation and LTP *Trends Neurosci.* 23:75-80.
- Song S, Miller KD, Abbott LF** (2000). Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* 3:919-26.
- Sourdet V, Debanne D.** (1999). The role of dendritic filtering in associative long-term synaptic plasticity. *Learn Mem.* 6:422-47.
- Spruston N, Johnston D** (1992). Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 67:508-29.
- Spruston N, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B.** (1995). Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science* 268:297-300.
- Spruston N, Jaffe DB, Johnston D** (1994). Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends Neurosci.* 17:161-6.
- Stackman RW, Hammond RS, Linardatos E, Gerlach A, Maylie J, Adelman JP, Tzounopoulos T** (2002) Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *J Neurosci* 22:10163-71.
- Staubli U, Rogers G, Lynch G** (1994) Facilitation of glutamate receptors enhances memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:777-81.
- Stocker M, Krause M, Pedarzani P.** An apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4662-7.
- Storm JF** (1989). An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol.* 409:171-90.
- Stuart GJ, Sakmann B** (1994). Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature.* 367:69-72.
- Stuart G, Schiller J, Sakmann B** (1997). Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol.* 505:617-32.
- Stuart GJ, Hausser M** (2001). Dendritic coincidence detection of EPSPs and action potentials. *Nat Neurosci* 4:63-71.
- Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP.** Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 87:2466-70.
- Timmons SD, Geisert E, Stewart AE, Lorenzon NM, Foehring RC.** (2004) alpha₂-Adrenergic receptor-mediated modulation of calcium current in neocortical pyramidal neurons. *Brain Res.* 1014:184-96.
- Voronin LL, Cherubini E. 2004 'Deaf, mute and whispering' silent synapses: their role in synaptic plasticity. *J Physiol.* May 15;557(Pt 1):3-12.

- Watanabe S, Hoffman DA, Migliore M, Johnston D** (2002) Dendritic K⁺ channels contribute to spike-timing dependent long-term potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:8366-71.
- Watkins JC, Evans RH** (1981). Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 21:165-204.
- Wigstrom H, Gustafsson B** (1985). On long-lasting potentiation in the hippocampus: a proposed mechanism for its dependence on coincident pre- and postsynaptic activity. *Acta Physiol Scand*. 123:519-22.
- Wigstrom H, Gustafsson B, Huang YY, Abraham WC** (1986). Hippocampal long-term potentiation is induced by pairing single afferent volleys with intracellularly injected depolarizing current pulses. *Acta Physiol Scand*. 126:317-9.
- Williams SR, Stuart GJ** (2000) Backpropagation of physiological spike trains in neocortical pyramidal neurons: implications for temporal coding in dendrites. *J Neurosci* 20:8238-46.
- Winder DG, Martin KC, Muzzio IA, Rohrer D, Chruscinski A, Kobilka B, Kandel ER** (1999). ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by beta-adrenergic receptors. *Neuron* 24: 715-726.
- Wittenberg GM, Wang SS**. Malleability of spike-timing-dependent plasticity at the CA3-CA1 synapse. *J Neurosci*. 26:6610-7.
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T** (2000). Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci*. 911:1-24.
- Wu WW, Chan CS, Disterhoft JF** (2004). Slow afterhyperpolarization governs the development of NMDA receptor-dependent afterdepolarization in CA1 pyramidal neurons during synaptic stimulation. *J Neurophysiol*. 92:2346-56.
- Yamada KA, Tang CM**. (1993). Benzothiadiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents. *J Neurosci*. 13:3904-15.
- Yang H-W, Lin Y-W, Yen C-D, Min M-Y** (2002) Change in bidirectional plasticity at CA1 synapses in hippocampal slices taken from 6-hydroxydopamine treated rats: the role of endogenous norepinephrine. *Eur J Neurosci* 16: 1117–1128.
- Yasuda R, Sabatini BL, Svoboda K** (2003). Plasticity of calcium channels in dendritic spines. *Nat Neurosci*. 6(9):948-55.
- Yuste R, Denk W** (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-4.
- Zhang LI, Tao HW, Holt CE, Harris WA, Poo M** (1998) A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. *Nature*. 395:37-44.
- Zhou Q, Poo MM** (2004). Reversal and consolidation of activity-induced synaptic modifications. *Trends Neurosci*. 27:378-83.
- Zucker RS** (1999). Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 9:305-13.