



**Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento**  
**Departamento de Farmacología y Terapéutica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Madrid**

**EFFECTO DE COLINA SOBRE LA EXCITABILIDAD  
NEURONAL Y LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN  
RODAJAS HIPOCAMPALES DE ROEDORES**

**Memoria presentada para optar al Título de Doctor por**

**Elisa Albiñana Durá**

**Director:**

**Jesús Miguel Hernández Guijo**

**Madrid, 2014**

# ÍNDICE

<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1. HIPOCAMPO</b> .....	<b>2</b>
1.1. <u>ESTRUCTURA DE LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL</u> .....	3
1.1.1. El giro dentado.....	4
1.1.2. El hipocampo.....	6
1.1.3. El complejo subicular.....	12
1.1.4. La corteza entorrinal.....	12
1.2. <u>CONEXIONES HIPOCAMPALES</u> .....	13
1.3. <u>FUNCIÓN DEL HIPOCAMPO</u> .....	16
1.4. <u>NEUROTRANSMISORES EN EL HIPOCAMPO</u> .....	17
1.4.1. Transmisión glutamatérgica.....	18
1.4.2. Transmisión GABAérgica.....	22
1.5. <u>PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO</u> .....	24
<b>2. RECEPTORES NICOTÍNICOS EN EL HIPOCAMPO</b> .....	<b>26</b>
2.1. <u>EL RECEPTOR NICOTÍNICO</u> .....	26
2.1.1. Estructura del receptor nicotínico neuronal.....	26
2.1.2. Clasificación de los receptores nicotínicos neuronales....	30
2.1.3. El receptor nicotínico $\alpha_7$ .....	32
2.1.4. Papel del receptor nicotínico neuronal.....	33
2.2. <u>TRANSMISIÓN COLINÉRGICA EN EL HIPOCAMPO</u> .....	34
2.2.1. Receptores nicotínicos en el hipocampo.....	35
2.3. <u>FARMACOLOGÍA DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS</u> ...37	
2.3.1. Colina.....	39
<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	<b>43</b>

**MATERIALES Y MÉTODOS..... 45**

**1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS RODAJAS  
DE HIPOCAMPO..... 46**

**2. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS..... 48**

2.1. CÁMARA DE REGISTRO..... 48

2.2. REGISTRO DE POTENCIALES EXTRACELULARES  
PROVOCADOS..... 49

2.3. REGISTRO DE POTENCIALES INTRACELULARES..... 53

2.4. ANÁLISIS DE DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS..... 53

**3. SOLUCIONES Y COMPUESTOS QUÍMICOS UTILIZADOS..... 54**

**4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 55**

**RESULTADOS**

**1. COLINA REDUCE LA EFICACIA DE LA TRANSMISIÓN  
SINÁPTICA..... 57**

**2. LA APLICACIÓN DE COLINA NO MODIFICA LA FACILITACIÓN INDUCIDA  
POR PARES DE PULSOS..... 59**

**3. COLINA PRODUCE UN INCREMENTO DE LA ESPIGA  
POBLACIONAL..... 62**

**EFFECTO DE COLINA SOBRE EL fEPSP REGISTRADO EN EL *STRATUM*  
ORIENS..... 65**

**4. COLINA MODULA LA NEUROTRANSMISIÓN EN EL  
GIRO DENTADO..... 67**

**5. EFECTO DE AGONISTAS NICOTÍNICOS SOBRE EL fEPSP..... 68**

6. LA APLICACIÓN DE MODULADORES ALOSTÉRICOS DEL RECEPTOR NICOTÍNICO NO MODIFICA EL EFECTO PRODUCIDO POR COLINA.....	70
7. EL EFECTO PRODUCIDO POR COLINA NO SE PREVIENE CON ANTAGONISTAS NICOTÍNICOS.....	71
8. LA APLICACIÓN DE ATROPINA NO MODULA EL EFECTO EJERCIDO POR COLINA.....	73
9. EFECTO DE COLINA EN RODAJAS HIPOCAMPALES DE RATONES <i>KNOCK- OUT</i> PARA EL RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha_7$ .....	74
10. LA INHIBICIÓN DE LA RECAPTACIÓN DE COLINA NO INFLUYE EN EL EFECTO SOBRE LOS fEPSP.....	78
11. CITICOLINA Y ESTABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	79
12. H89, INHIBIDOR DE LA PROTEÍNA QUINASA A DEPENDIENTE DE cAMP.....	80
13. LOS RECEPTORES GABA NO ESTÁN IMPLICADOS EN LA MODULACIÓN EJERCIDA POR COLINA.....	82
14. BLOQUEO DE LA INHIBICIÓN RECURRENTE EJERCIDA POR COLINA .....	84
15. EFECTO DE COLINA SOBRE LA PLASTICIDAD NEURONAL...	87
16. EFECTO DE COLINA SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN RODAJAS HIPOCAMPALES PROCEDENTES DE RATAS ANCIANAS.....	91
17. COLINA PRODUCE UN CAMBIO EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA CELULAR.....	95

## **DISCUSIÓN**

<b>1. RECEPTOR NICOTÍNICO E HIPOCAMPO.....</b>	<b>99</b>
<b>2. COLINA Y TRANSMISIÓN SINÁPTICA.....</b>	<b>100</b>
<b>3. COLINA Y EXCITABILIDAD NEURONAL.....</b>	<b>103</b>
<b>4. LOS RECEPTORES GABA NO ESTÁN IMPLICADOS EN LA MODULACIÓN EJERCIDA POR COLINA.....</b>	<b>105</b>
<b>5. FARMACOLOGÍA DE LA ACCIÓN MEDIADA POR COLINA.....</b>	<b>107</b>
5.1. <u>LOS AGONISTAS <math>\alpha 7</math> NO REPRODUCEN EL EFECTO DE</u>	
5.2. <u>COLINA.....</u>	107
5.3. <u>EL EFECTO PRODUCIDO CON COLINA NO REVIERTE CON</u>	
<u>ANTAGONISTAS NICOTÍNICOS.....</u>	107
5.4. <u>LA APLICACIÓN DE MODULADORES ALOSTÉRICOS NO MODIFICA</u>	
<u>EL EFECTO DE COLINA.....</u>	108
5.5. <u>EFECTO DE COLINA EN RODAJAS HIPOCAMPALES DE RATONES</u>	
<u>KNOCK-OUT PARA EL RECEPTOR NICOTÍNICO <math>\alpha 7</math>.....</u>	108
5.6. <u>LA APLICACIÓN DE ATROPINA NO PREVIENE EL EFECTO</u>	
<u>EJERCIDO POR COLINA.....</u>	109
<b>6. EFECTO DE COLINA SOBRE LA PLASTICIDAD NEURONAL....</b>	<b>110</b>
<b>7. ESTABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....</b>	<b>113</b>
7.1. <u>LA INHIBICIÓN DE LA RECAPTACIÓN DE COLINA NO INFLUYE EN</u>	
<u>EL EFECTO SOBRE LOS fEPSP.....</u>	114
<b>8. COLINA PRODUCE UN CAMBIO EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA</b>	
<b>CELULAR.....</b>	<b>115</b>
<b>9. EFECTO DE COLINA SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN RODAJAS</b>	
<b>HIPOCAMPALES PROCEDENTES DE RATAS ANCIANAS.....</b>	<b>116</b>

<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	<b>120</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	<b>122</b>

# **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico
<b>AMP<sub>c</sub></b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>CA</b>	<i>Cornu Ammonis</i>
<b>CCDV</b>	Canales de calcio dependientes de voltaje
<b>CCK</b>	Colecistoquinina
<b>CD</b>	Corriente directa hiperpolarizante
<b>CDP-colina</b>	Citidina difosfocolina
<b>CGP 55845</b>	(2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Diclorofenil)etil]amino-2-hidroxi]propil](fenilmetil) ácido fosfínico
<b>ChAT</b>	Acetilcolintransferasa
<b>CHT</b>	Transportador de colina de alta afinidad
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria 50
<b>CK</b>	Colina quinasa
<b>CNQX</b>	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
<b>CTL</b>	Transportador específico de colina
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>D-APV</b>	Ácido D(-)-2-amino-5 fosfonoaléxico
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva media
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EP</b>	Espiga poblacional
<b>EPSP</b>	Potencial postsináptico excitatorio
<b>fEPSP</b>	Potencial postsináptico excitatorio de campo
<b>FV</b>	<i>Fiber volley</i> o potencial de fibra poblacional
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GTS-21</b>	3-(2,4-Dimetoxibenzilideno)-anabaseina
<b>GYKI 52466</b>	4-(8-Metil-9H-1,3-dioxolo[4,5- <i>h</i> ][2,3]benzodiazepin-5-yl)-benzenamina
<b>H89</b>	N-[2-(p-Bromocinnamilamino)etil]-5-isoquinolinsulfonamida

<b>IS</b>	Interneuronas selectivas
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inhibición
<b>KRB</b>	Krebs-Ringer bicarbonato
<b>LEA</b>	Área entorrinal lateral
<b>LTD</b>	Depresión de larga duración
<b>LTP</b>	Potenciación de larga duración
<b>MEA</b>	Área entorrinal medial
<b>MLA</b>	Metillicaconitina
<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspártico
<b>OTC</b>	Transportador de baja afinidad poliespecífico de cationes orgánicos
<b>PA</b>	Potenciales de acción
<b>PEMPT</b>	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PNU 120596</b>	<i>N</i> -(5-cloro-2,4-dimetoxifenil)- <i>N'</i> -(5-metil-3-isoxazolil)-urea
<b>PNU 282987</b>	<i>N</i> -(3 <i>R</i> )-1 Azabicyclo [2.2.2] oct-3-il- 4-clorobenzamida
<b>PPF</b>	Facilitación por pares de pulsos
<b>PV</b>	Parvalbúmina
<b>SM</b>	Segmentos transmembrana
<b>SRCAA</b>	Sistema de recaptación de colina de alta afinidad
<b>STP</b>	Plasticidad de corta duración
<b>V<sub>m</sub></b>	Potencial de membrana
<b>Ω</b>	Ohmios

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. HIPOCAMPO

El término hipocampo (del griego *hippocampus*) aparece por primera vez en el siglo XVI, después de que el anatomista Aranzi (1564) considerara que esta estructura situada en el suelo del cuerno inferior del ventrículo lateral guardaba cierta semejanza con el animal marino.

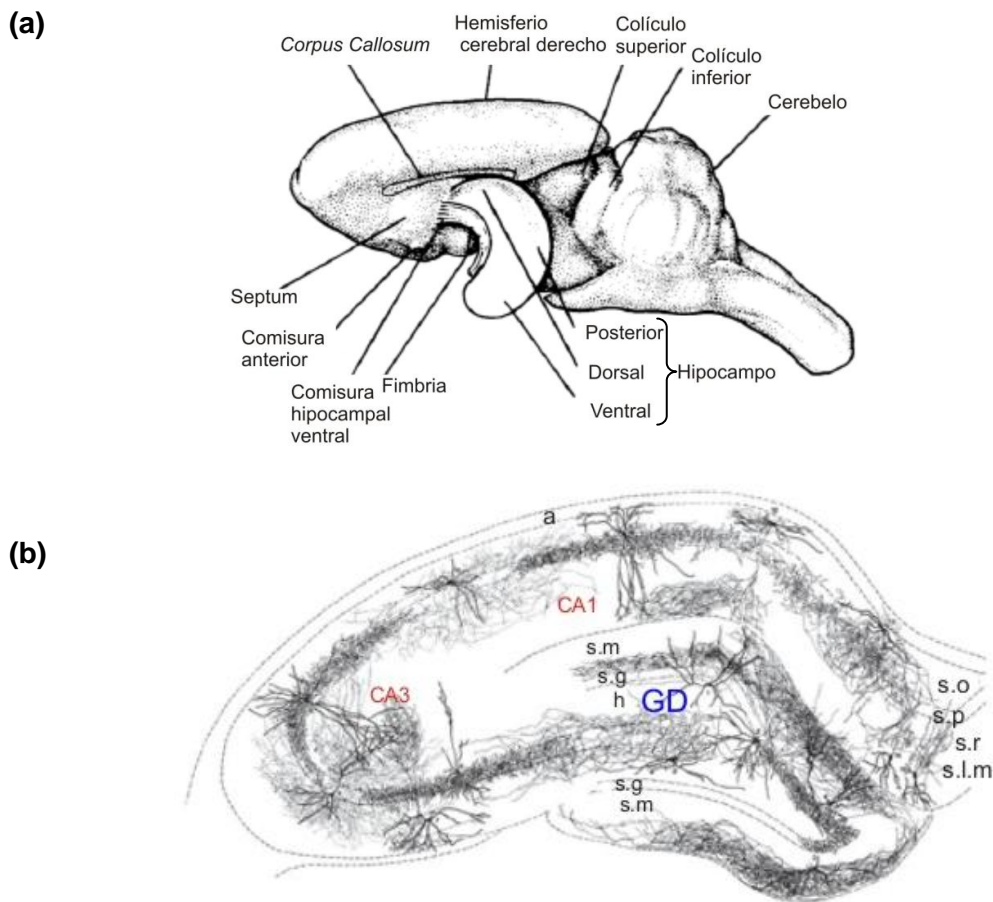
Uno de los avances más importantes para el conocimiento de la estructura del sistema nervioso central fue la introducción, por Camillo Golgi, de la tinción con cromato de plata (reacción negra) en 1873, lo que permitió observar la morfología de las células nerviosas del hipocampo (Golgi, 1873). Ramón y Cajal se sirvió de este método para estudiar prácticamente la totalidad del sistema nervioso. En sus obras, Ramón y Cajal describe el hipocampo, o asta de Amón, como una circunvalación adelgazada que acompaña a la fascia dentada (o cuerpo abollonado) y que se encuentra bordeando la superficie o *limbus* de los ventrículos laterales. Entre otras observaciones, Ramón y Cajal detalló las diferentes partes del hipocampo y propuso un circuito funcional para esta estructura. Años después, en 1934, Lorente de Nó, basándose en el trabajo de Ramón y Cajal, empleó los términos CA1-CA4 para delimitar las áreas del hipocampo.

El hipocampo pertenece al sistema límbico, un término descrito por primera vez por el neurólogo Broca (1878), que comprende un conjunto de regiones cerebrales que reciben información de diversas áreas del sistema nervioso central y participan en procesos de memoria, aprendizaje e interacciones sociales.

Durante muchos años el hipocampo ha sido el área de elección para el estudio de la transmisión sináptica. Posee una anatomía peculiar con una arquitectura y organización simple, lo cual, unido a su capacidad para sobrevivir *in vitro* durante largos periodos de tiempo, ha permitido su utilización como modelo en numerosos estudios.

### 1.1. ESTRUCTURA DE LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL

La formación hipocámpal está formada por el giro dentado, hipocampo, subículo, presubículo, parasubículo y corteza entorrinal. Se encuentra en el suelo del asta inferior del ventrículo lateral y es arcuocorteza. El hipocampo es una estructura bilateral, blanca, con forma de media luna y medialmente cóncavo (Martin *et al.*, 1997; Rouvière y Delmas, 2005).

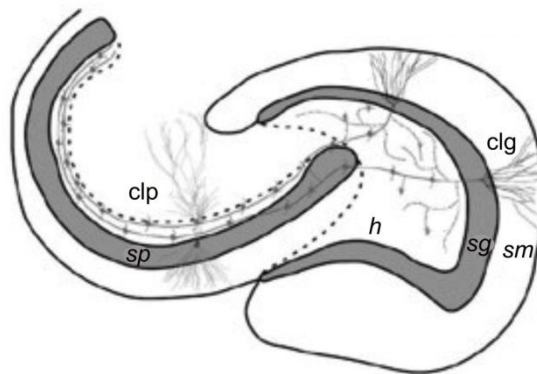


**Figura 1.** (a) Representación del cerebro de rata (Adaptado de O'Keefe y Nadel, 1978). (b). Sección horizontal del hipocampo con las diferentes capas y regiones. a: *stratum alveus*. s.o: *stratum oriens*. s.p: *stratum pyramidale*. s.r: *stratum radiatum*. s.l.m: *stratum lacunosum-moleculare*. s.m: *stratum moleculare*. s.g: *stratum granulosum*. h: *hilus*. GD: giro dentado (Adaptado de Freund y Buzsáki, 1996).

### 1.1.1. El giro dentado

Se considera la primera etapa del circuito trisináptico hipocámpico ya que es la diana de la mayoría de las aferencias entorrinales. De la corteza entorrinal va a proceder gran parte de la información sensorial que la formación hipocámpica utiliza para llevar a cabo sus funciones (Amaral *et al.*, 2007). Se trata de una estructura con forma de U y compuesto por tres capas.

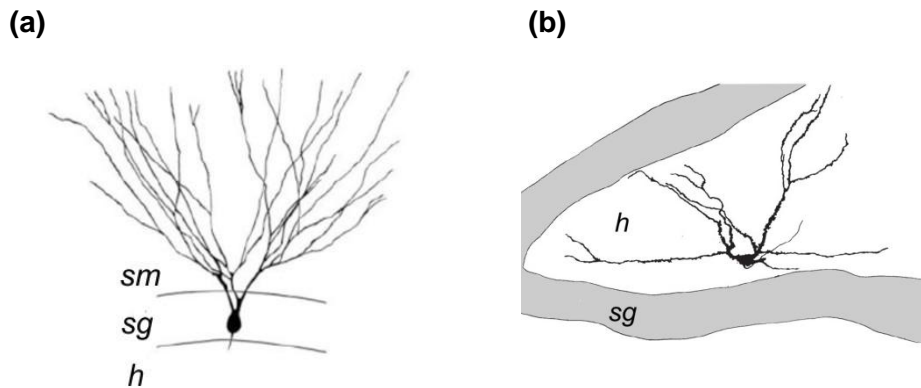
Superficialmente, la más cercana a la fisura hipocámpica se denomina capa molecular (*stratum moleculare*) y contiene las dendritas proximales de las células granulares. En esta capa también se localizan las fibras de la vía perforante que se originan en la corteza entorrinal. A continuación, se encuentra la capa granulosa (*stratum granulosum*), en esta capa se encuentran los somas de las células granulares agrupadas densamente en 4-8 filas. Por último, la polimórfica o *hilus*, envuelta por los dos estratos anteriores, constituye la tercera capa de esta estructura.



**Figura 2. El giro dentado.** Células granulares con sus ramificaciones axonales. clg: célula granular; sm: *stratum moleculare*; sg: *stratum granulosum*; h: *hilus*; sp: *stratum pyramidale*; clp: célula piramidal (Adaptado de Amaral *et al.*, 2007).

En el giro dentado se localizan distintos tipos celulares, las más importantes son las células granulares. Éstas se encuentran muy próximas entre sí, su soma tiene forma elíptica con una anchura aproximada de 10  $\mu\text{m}$  y una altura de 18  $\mu\text{m}$  (Claiborne *et al.*, 1990). Sus dendritas poseen una gran cantidad de espinas y se encuentran dirigidas hacia la capa molecular. Los axones de estas células, denominadas fibras musgosas (fibras mossy), abandonan el giro dentado hacia CA3, en concreto hacia el *stratum lucidum*, donde van a hacer sinapsis con las dendritas proximales de las

células piramidales formando los denominados terminales musgosos (botones sinápticos de gran tamaño) (Freund y Buzsáki, 1996).



**Figura 3. Tipos celulares en el giro dentado.** (a) Estructura de una célula granular, sus dendritas se encuentran dirigidas hacia la capa molecular. *sm*: *Stratum moleculare*; *sg*: *stratum granulosum*; *h*: *hilus* (Adaptado de Amaral *et al.*, 2007). (b) Estructura de una célula musgosa, su soma se localiza cerca del *stratum granulosum*. *sg*: *stratum granulosum*; *h*: *hilus* (Adaptado de Ribak *et al.*, 1985).

Otro tipo celular presente en el giro dentado son las células musgosas, que se localizan en la capa polimórfica. De sus somas (con forma triangular o multipolar) emergen al menos tres dendritas que se dispersan y bifurcan a lo largo de esta capa. Esporádicamente, alguna dendrita atraviesa la capa granular y pasa a la capa molecular. Una característica de estas células es que sus somas y sus dendritas proximales están cubiertas por un conjunto de grandes espinas, lugar donde se localizan las terminaciones de los axones de las fibras musgosas con las que van a hacer sinapsis. Los axones de las células musgosas se bifurcan y se dirigen hacia la fimbria y hacia la capa molecular del giro dentado. (Ribak *et al.*, 1985).

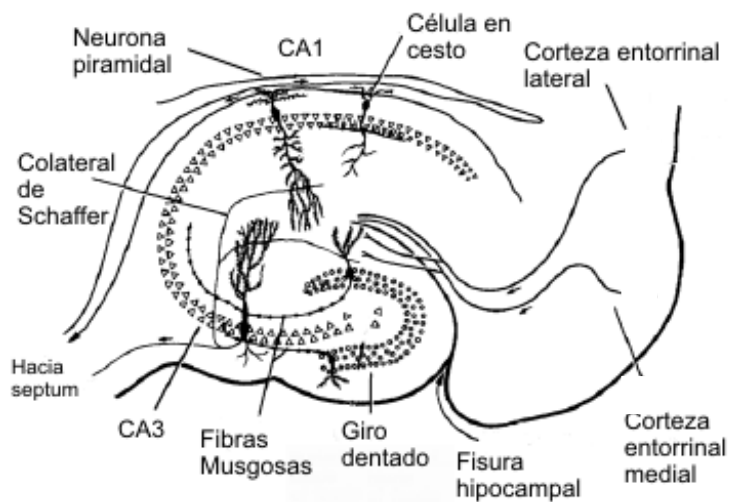
Se han identificado una gran variedad de interneuronas en el giro dentado, la mayoría de ellas GABAérgicas, cuyas características se describen exhaustivamente en el artículo publicado por Freund y Buzsaki en 1996. Entre ellas, unas de las más estudiadas son las células en cesto piramidales (pyramidal basket cells), las cuales poseen una dendrita apical desprovista de espinas dirigida hacia el *stratum moleculare*, que se divide en diversas ramificaciones y múltiples dendritas basales que se extienden a lo largo de capa polimórfica. Sus somas se encuentran en el *stratum granulosum* y sus axones se disponen rodeando y haciendo sinapsis con los somas de las células granulares (Freund y Buzsáki, 1996).

Otro tipo de interneuronas son las células axo-axónicas. Se encuentran en la misma capa granular o muy próximas a ella, con un árbol dendrítico que se extiende a lo largo de la capa molecular, la cantidad de dendritas dirigidas hacia el *hilus* es menor. Sus axones se disponen formando hileras de botones sinápticos y contactan con los segmentos iniciales de los axones de las neuronas granulares.

Las células dendríticas inhibitorias son interneuronas que contactan con las dendritas de las células principales y cuyos somas y árboles dendríticos tienen una localización variada.

### 1.1.2. El hipocampo

El hipocampo propiamente dicho se puede dividir en tres regiones: CA1, CA2 y CA3 (CA proviene de *cornu ammonis*). La región CA1 es la más cercana al subículo, la región CA3 es adyacente a la fimbria y la región CA2 se encuentra entre CA1 y CA3. Las fibras musgosas que provienen del giro dentado van a contactar con las células piramidales de CA3 y a su vez, éstas van a proyectar hacia la región CA1 a través de las llamadas colaterales de Schaffer.



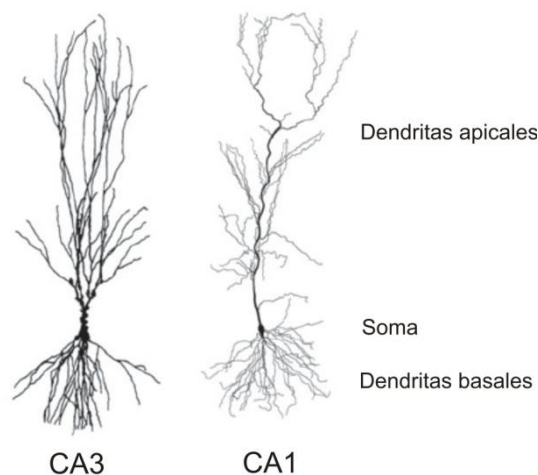
**Figura 4. Estructura hipocampal.** (a) Sección horizontal del hipocampo con indicación de las diferentes regiones y tipos celulares (Adaptado de O'Keefe y Nadel, 1978).



El hipocampo, por otro lado, se divide en capas cuya organización es similar para todas las regiones.

La principal capa celular en el hipocampo es la capa piramidal (*stratum pyramidale*), donde se localizan los somas de las células piramidales, esta zona se encuentra más densamente empaquetada en CA1 que en CA2 y CA3. La capa que contiene las dendritas basales de las neuronas piramidales es el *stratum oriens*, donde también se localizan distintos tipos de interneuronas. La capa más profunda del hipocampo, compuesta por los axones de las neuronas piramidales, se denomina *stratum alveus*. El *stratum lucidum*, presente en CA3 y no en CA2 ni CA1, se localiza superficial a la capa piramidal y es la zona donde se van a producir la sinapsis entre las fibras musgosas y las dendritas de las células piramidales. En la zona más distal, las fibras musgosas se doblan para viajar longitudinalmente y marcan el límite entre CA3 y CA2. El *stratum radiatum* se sitúa superficial al *stratum lucidum* en CA3 y a la capa piramidal en CA2 y CA1, contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales y en esta capa se van a producir las conexiones asociacionales de CA3 a CA3 y las conexiones con las colaterales de Schaffer en CA1. La capa más superficial del hipocampo es el *stratum lacunosum-moleculare* y es el lugar donde van a terminar las fibras que provienen de la corteza entorrinal. Tanto el *stratum lacunosum-moleculare* como el *stratum radiatum* van a contener diversos tipos de interneuronas. (Altman *et al.*, 1973; Amaral y Lavenex, 2007).

El principal tipo neuronal en el hipocampo es la célula piramidal. Todas las células piramidales tienen una estructura similar, con un axón único y diversas dendritas basales que descienden desde la base del soma. Las dendritas apicales de estas neuronas son largas y se originan en el ápice del soma. De las dendritas apicales surgen ramificaciones a diferentes distancias del soma. Estas neuronas están cubiertas por espinas, identificadas por primera vez por Ramón y Cajal en 1888 (Piskorowsky y Chevaleyre, 2012).



**Figura 5. Estructura de una neurona piramidal de CA3 y de CA1**  
(Adaptado de Spruston, 2008).

Las células piramidales de CA3 presentan somas grandes que se encuentran formando capas de entre 60 y 120  $\mu\text{m}$  de espesor. La organización y longitud del árbol dendrítico varía en función de su localización. Las dendritas apicales están orientadas hacia el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare*, donde se ramifican hasta alcanzar la fisura hipocampal o el *hilus*. Las dendritas basales son más numerosas y recorren el *stratum oriens* hacia el *stratum alveus*. Las dendritas cercanas al soma presentan las llamadas excrescencias espinosas, que van a formar complejos sinápticos con las terminales de las fibras musgosas dando lugar al *stratum lucidum*. Sus axones emergen desde el polo basal del soma o desde una dendrita primaria basal dando lugar a arborizaciones axonales en CA3 y proyectando hacia la región CA1, tal y como describió Schaffer en 1892 (Schaffer, 1892; Freund y Buzsáki, 1996; Amaral y Lavenex, 2007).

Los somas de las neuronas piramidales presentes en CA1 son más pequeños, se distribuyen dando lugar al *stratum pyramidale*, de un grosor aproximado de 50-100  $\mu\text{m}$ . Sus dendritas apicales ocupan el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare*. Sus dendritas basales se extienden por el *stratum oriens* y en ocasiones alcanzan el *stratum alveus*. Las neuronas de esta región se caracterizan por la ausencia de excrescencias espinosas. Los axones emergen desde la zona del soma próximo al tronco dendrítico apical o desde una dendrita basal hasta llegar al *stratum alveus* (Freund y Buzsáki, 1996, Amaral y Lavenex, 2007).

La región CA2 del hipocampo ha sido históricamente motivo de controversia. Sin embargo, las evidencias que diferencian morfológica y funcionalmente las neuronas de CA2 de las de CA1 y CA3 son cada vez mayores. Las diferencias más

evidentes con respecto a las neuronas piramidales de CA3 son la ausencia de excrescencias espinosas y de inervación por las fibras musgosas. Además, las ramificaciones de la dendrita apical primaria de las piramidales de CA3 se extienden en el plano longitudinal del hipocampo, mientras que las de la región CA2 lo hacen en el plano transversal (Ishizuka *et al.*, 1995). Las neuronas piramidales de CA3 proyectan sus axones únicamente hacia el *stratum radiatum* del hipocampo ipsilateral, mientras que las de CA2 lo hacen hacia las dendritas basales y apicales de las neuronas de CA1, presentes en el *stratum oriens* y *radiatum* respectivamente (Tamamaki *et al.*, 1988). Por otro lado, se ha demostrado la localización de determinadas proteínas en elevadas proporciones o únicamente en la región CA2. (Piskorowsky y Chevaleyre, 2012). En cuanto a las diferencias con las neuronas de CA1, éstas presentan una única dendrita apical, que en ocasiones no se bifurca o lo hace lejos del soma. En cambio, en las piramidales de CA2 se bifurcan cerca del soma dando lugar a dos o tres dendritas apicales. Respecto a las aferencias, las neuronas de CA1 reciben aferencias únicamente de la capa III de la corteza entorrinal mientras que las de CA2 reciben aferencias de las capas II y III (Niimi *et al.*, 2007; Nishimura-Akiyoshi *et al.*, 2007; Piskorowsky y Chevaleyre, 2012)

En cuanto a las interneuronas presentes en el hipocampo, es importante destacar que se trata de una población de células con características morfológicas, electrofisiológicas y neuroquímicas muy diversas (Ascoli *et al.*, 2008). En general, a diferencia de las células principales, las interneuronas presentan axones cortos que inervan diferentes partes de las neuronas piramidales (Griguoli y Cherubini, 2012). Algunas de ellas son interneuronas inhibitorias dendríticas y su disposición anatómica les permite ejercer un control inhibitorio selectivo de la transmisión excitatoria, además de modular la electrogénesis dendrítica o plasticidad sináptica (Gulyás *et al.*, 1993; Han *et al.*, 1993; Miles *et al.*, 1996; Vida *et al.*, 1998; Vida y Frotscher, 2000; Vogt *et al.*, 2000; Bartos *et al.*, 2010). Unas de las más estudiadas son las células presentes en el *stratum oriens* de CA1 cuyos axones proyectan hacia las dendritas apicales presentes en el *stratum lacunosum-moleculare* (células O-ML) (Maccaferri y McBain, 1995) o las interneuronas presentes en CA3 cuyos axones se encuentran alineados con las fibras musgosas en el *stratum lucidum* (Vida y Frotscher, 2000; Losonczy *et al.*, 2004).

El grupo de las interneuronas inhibitorias perisomáticas es menos heterogéneo e incluye las células en cesto y las células axo-axónicas (Bartos *et al.*, 2010). Su localización les permite ejercer un control de la integración final de las corrientes

sinápticas y determinar la probabilidad y el ritmo de la iniciación del potencial de acción en sus células diana (Miles *et al.*, 1996; Pouille y Scanziani, 2001).

Las células en cesto piramidales se encuentran en el *stratum pyramidale* o cercano a éste. Sus dendritas están desprovistas de espinas y se localizan a lo largo del *stratum oriens*, *stratum radiatum* y en ocasiones llegan al *stratum lacunosum-moleculare*. Los axones de estas células forman un plexo denso y hacen sinapsis con el soma y las dendritas proximales de las células piramidales. En función de su patrón de descarga y su marcador neuroquímico se pueden diferenciar dos tipos de células en cesto: las de disparo rápido, que expresan altos niveles de parvalbúmina (PV+) y las de disparo regular, que contienen y liberan colecistoquinina (CCK+) (Freund y Buzsáki, 1996; Bartos *et al.*, 2010).

Las células axo-axónicas poseen los somas en el *stratum pyramidale* o adyacente a éste y sus dendritas se expanden por todas las capas. Sus axones se originan en el soma o en una dendrita primaria y se localizan en el *stratum pyramidale* y en el *stratum oriens* proximal. Dan lugar a colaterales que viajan por el *stratum pyramidale* y que van a terminar en los axones proximales de las neuronas piramidales (Somogyi *et al.*, 1985; Buhl *et al.*, 1994; Freund y Buzsáki, 1996).

Existen otros tipos de interneuronas denominadas interneuronas selectivas (IS), especializadas en inervar otras interneuronas. Se pueden dividir en tres subtipos IS1, IS2 e IS3 en función de su conectividad y de sus características neuroquímicas. Todas ellas tienen en común que sus axones terminan en otra interneurona (Freund y Buzsáki, 1996, Amaral y Lavenex, 2007).

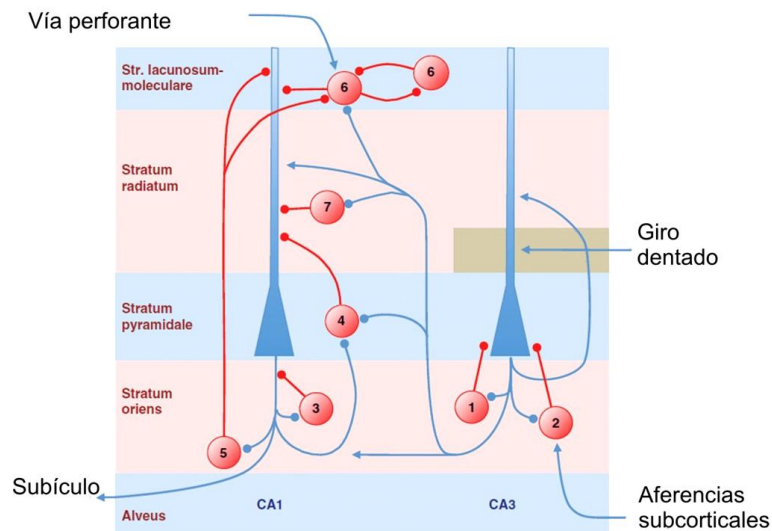
Estas diferencias anatómicas, fisiológicas y neuroquímicas sugieren que los diferentes tipos de interneuronas tienen diferentes funciones en el sistema. El patrón de inhibición dinámico ejercido por estas células GABAérgicas actúa regulando el flujo de la información (Bartos *et al.*, 2010). Las interneuronas reciben miles de sinapsis glutamatérgicas excitatorias a lo largo de sus somas y dendritas provenientes de diferentes vías aferentes y colaterales locales de las células principales (Freund y Buzsáki, 1996; Gulyás *et al.*, 1999; Mátyás *et al.*, 2004).

El reclutamiento de interneuronas por vías aferentes produce una inhibición (inhibición *feedforward*) que limita la excitación sináptica y aumenta la precisión temporal de descarga en las células principales (Pouille y Scanziani, 2001). Algunas de las células implicadas en este tipo de inhibición son, entre otras, las interneuronas

del *stratum radiatum* de CA1 asociadas a las colaterales de Schaffer, las interneuronas presentes en el *stratum lacunosum-moleculare* asociadas a la vía perforante o las interneuronas presentes en el *stratum lucidum* de CA3 (Klausberger, 2009; Kullmann, 2011).

El reclutamiento de interneuronas por las células principales (inhibición *feedback*), limita la duración de la activación y la propagación de la activación en la población de neuronas principales locales. Algunas interneuronas como las células O-ML, las células biestratificadas e Ivy (que inervan dendritas basales y apicales de las células piramidales locales en el *stratum oriens* y *stratum radiatum*) o las células trilaminares, entre otras, ejercen este tipo de inhibición (Kullmann, 2011). Algunas de estas células también están inervadas por axones de fibras aferentes, por lo que también ejercen una inhibición *feedforward*.

Aquellas interneuronas que se extienden por diferentes capas como las células en cesto o las axo-axónicas serán activadas por diferentes vías ejerciendo ambos tipos de inhibición (Bartos *et al.*, 2010).



**Figura 6. Diagrama de la red interneuronal en el hipocampo.** 1: Células en cesto PV+. 2: Células en cesto CCK+. 3: Células axo-axónicas. 4: Célula Ivy. 5: Célula O-ML. 6: Célula con forma de neuroglia. 7: Célula asociada a las colaterales de Schaffer. Las células en cesto se encuentran distribuidas también en otras áreas del hipocampo (Adaptado de Kullman, 2011).

### 1.1.3. El complejo subicular

El complejo subicular se localiza entre el área CA1 y la corteza entorrinal ventralmente, y entre CA1 y la corteza retrosplenial dorsalmente. Se puede dividir en tres regiones: subículo, presubículo y parasubículo.

El subículo posee tres capas: Una capa molecular (continua al *stratum lacunosum-moleculare* y al *stratum radiatum* de CA1), una capa piramidal con los somas de las neuronas principales y una capa polimórfica.

El presubículo contiene una capa de pequeñas células piramidales superficial a una región acelular. Las células más superficiales son las que se encuentran más densamente empaquetadas (capa II), mientras que las que se encuentran en la capa III se encuentran dispuestas de forma más laxa y son continuas a la capa IV de la corteza entorrinal.

En el caso del parasubículo, se encuentra adyacente al presubículo y sus capas II y III contienen una población relativamente densa de células piramidales grandes. Sus capas más profundas son continuas a la corteza entorrinal. Para una revisión exhaustiva, ver O'Mara *et al.*, 2001.

### 1.1.4. La corteza entorrinal

La corteza entorrinal constituye el principal punto de entrada de información sensorial que va a ser procesada por la formación hipocampal y a su vez, la vía principal a través de la cual la información procesada es transmitida al neocortex.

La corteza entorrinal se divide en seis capas, cuatro de ellas celulares (II, III, V, VI) y dos de ellas acelulares (I, IV).

La capa I es la más superficial, contiene pocas células y es rica en fibras. Contiene neuronas GABAérgicas tanto estrelladas como horizontales que van a terminar en las dendritas de la capa II.

Las capas II y III dan lugar a los principales componentes de la vía perforante, que va a proyectar hacia la formación hipocampal (Witter, 1993). La capa II contiene células estrelladas y pequeñas células piramidales, que van a proyectar hacia el giro dentado y CA3, y cuyas dendritas se localizan en la capa I y II. En la capa III

predominan las neuronas piramidales que van a proyectar hacia CA1 y el subículo y cuyos árboles dendríticos se extienden por las capas II y III. Además, esta capa contiene diversos tipos celulares que van a contribuir a la vía perforante.

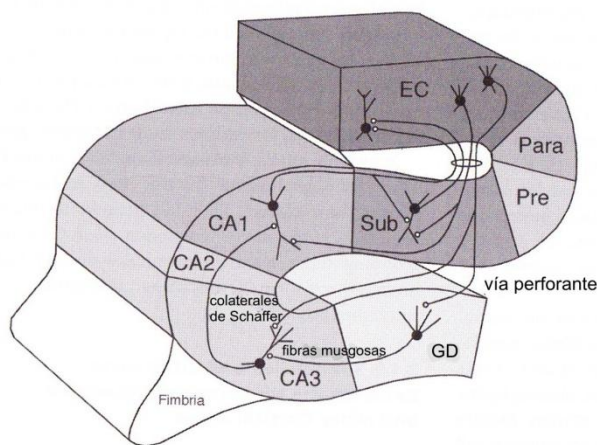
A pesar de que a la capa IV o *lamina disecans* se considera acelular, realmente contiene algunos somas neuronales dispersos. La capa V contiene principalmente neuronas piramidales, células horizontales y células polimórficas. Estas van a contribuir a la proyección hacia el giro dentado y el hipocampo.

Por último, la capa VI contiene una gran variedad de neuronas, algunas de las cuales también van a proyectar hacia el giro dentado y el hipocampo (Amaral y Lavenex, 2007).

Por otro lado, la corteza entorrinal también se puede dividir en dos áreas: área entorrinal lateral (LEA) y área entorrinal medial (MEA), que difieren en cuanto a la arquitectura de las capas II y III y en cuanto a sus proyecciones. Además los componentes medial y lateral de la vía perforante terminan en regiones diferentes en el giro dentado, hipocampo y subículo (Hamam *et al.*, 2002).

## 1.2. CONEXIONES HIPOCAMPALES

La formación hipocampal posee un patrón de conectividad característico, unidireccional, en el que la información fluye a través de un circuito trisináptico.



**Figura 7. Formación hipocampal.** Las fibras musgosas del giro dentado proyectan hacia las neuronas piramidales de CA3. Estas, a su vez, proyectan hacia la región CA1 a través de las colaterales de Schaffer. EC: corteza entorrinal. Para: parasubículo. Pre: presubículo. Sub: subículo. GD: giro dentado. (Adaptado de Amaral y Lavenex, 2007).

a) El giro dentado va a constituir la primera etapa de este circuito trisináptico hipocampal. La mayor parte de la información que recibe el giro dentado procede de la corteza entorrinal, que a su vez recibe información sensorial de zonas específicas de la corteza. Esta proyección hacia el giro dentado se produce a través de la llamada vía perforante que se origina fundamentalmente en la capa II de la corteza entorrinal, aunque también colaboran células de las capas V y VI (Steward y Scoville, 1976).

En la zona más superficial de la capa molecular, la mayoría de las terminaciones de la vía perforante van a contactar con las dendritas de las neuronas granulares del giro dentado. Una parte minoritaria hace sinapsis con interneuronas allí presentes. También hay fibras procedentes del presubiculo y parasubiculo que proyectan hacia la capa molecular del giro dentado (Kohler, 1985).

Por otro lado, el giro dentado recibe proyecciones que provienen del séptum (Mosko *et al.*, 1973; Swanson, 1978; Amaral y Kurz, 1985) y que inervan sobretodo células de la capa polimórfica. La mayoría de de las proyecciones septales son colinérgicas y van a inervar entre otras, a las células musgosas. Las fibras septales GABAérgicas contactan con otros tipos celulares como las células en cesto presentes en el giro dentado (Amaral *et al.*, 2007). El hipotálamo, en concreto células del área supramamilar, también va a proyectar hacia el giro dentado, especialmente hacia una zona de la capa molecular próxima a la capa granular.

En cuanto a las aferencias catecolaminérgicas procedentes del tronco encefálico, la inervación serotoninérgica en el hipocampo se origina en la región dorsal y medial del núcleo de rafe terminando en la zona subgranular de la capa polimórfica donde van a inervar fundamentalmente interneuronas GABAérgicas. Las fibras aferentes noradrenérgicas se originan en el *locus coeruleus* y van a terminar fundamentalmente en las áreas ocupadas por las fibras musgosas, como son el *hilus* o el *stratum lucidum* de CA3. La proyección dopaminérgica en el giro dentado es escasa y proviene del área tegmental ventral (Leranth y Hajszan, 2007).

b) A su vez, y continuando con el circuito trisináptico, las fibras musgosas pertenecientes a las células granulares del giro dentado, van a proyectar sobre la región CA3 del hipocampo, localizándose sus terminaciones en el *stratum lucidum*.

La región CA3, a su vez también es diana de proyecciones de diversas regiones como son: la vía perforante, fundamentalmente por células de la capa II de la corteza entorrinal (Witter, 1993); el complejo amigdalino (Pikkarainen *et al.*, 1999); el



séptum, sobretodo en *stratum oriens* y *radiatum*; y aferencias procedentes del tronco encefálico, especialmente fibras noradrenérgicas del *locus coeruleus*, que se distribuyen en el *stratum lucidum* y el *stratum lacunosum-moleculare*.

Las neuronas piramidales de CA3 emiten colaterales dirigidas hacia diversas regiones del hipocampo, entre ellas, la propia región CA3, tanto en el hipocampo ipsilateral (conexiones asociacionales) como hacia el hipocampo contra lateral (conexiones comisurales) (Amaral y Lavenex, 2007). De esta forma, las neuronas piramidales de CA3, proyectan hacia CA1 a través de las denominadas colaterales de Schaffer, en concreto hacia el *stratum radiatum* y *oriens* de esta región. La región CA1 también va a recibir proyecciones de la corteza entorrinal, que van a finalizar en el *stratum lacunosum-moleculare*, entre otras.

c) Las principales proyecciones de las neuronas de CA1 se dirigen hacia el subículo a través del *alveus* o del *stratum oriens*., concretamente hacia las capas más profundas de la corteza entorrinal, el séptum lateral, nucleus accumbens, y el bulbo olfativo (Freund y Buzsáki, 1996). También se originan colaterales que se distribuyen a lo largo del *stratum pyramidale* y *stratum oriens* y que van a contactar con interneuronas aquí presentes, así como en diversas regiones corticales y subcorticales.

d) La corteza entorrinal, además de dichas fibras procedentes de CA1 y del subículo, recibe proyecciones procedentes de diversas regiones corticales, como estructuras olfativas del telencéfalo y de la corteza perirrinal o límbicas y paralímbicas. Por otro lado, existen conexiones procedentes de zonas subcorticales como séptum, complejo amigdaloides, tálamo, hipotálamo y tronco del encéfalo (Amaral y Lavenex, 2007).

### 1.3. FUNCIÓN DEL HIPOCAMPO

Durante el siglo XIX y principios del siglo XX se creyó que el hipocampo estaba relacionado con el olfato. Hoy en día se sabe que la formación hipocampal está escasamente implicada en estos procesos. Por otro lado, James W Papez, en 1937, incluyó el hipocampo en el circuito que lleva su nombre y que constituiría la base de la elaboración de las emociones.

La implicación del lóbulo temporal en procesos de memoria quedó patente tras la descripción realizada por Scoville y Milner en 1957 del paciente amnésico H.M, al que se le extrajo el lóbulo temporal medial con el fin de paliar sus ataques de epilepsia. Tras la intervención, el paciente perdió la capacidad de formar memorias a largo plazo, conservaba recuerdos de su vida precedentes a la intervención y su memoria a corto plazo también se mantuvo intacta. Sin embargo, era incapaz de transferir la mayoría de los tipos de aprendizaje de la memoria a corto plazo (de segundos a minutos de duración) a memoria a largo plazo. Por otro lado, también mostró grandes dificultades para orientarse espacialmente. El tipo de memoria que se vio afectada tras la resección y en la que está implicada el hipocampo fue la memoria declarativa o explícita (aquella en la que media una experiencia consciente de evocación y a la cual puede accederse por introspección. Incluye aprendizaje sobre personas, lugares o acontecimientos, que pueden relatarse verbalmente, es decir, aprendizaje que requiere conocimiento consciente). Por el contrario, la región hipocampal no está implicada en la memoria inmediata ni en procesos de memoria implícita, es decir, aquella cuya formación y evocación no depende de la conciencia o los procesos cognitivos (Kandel *et al.*, 1997).

El hipocampo juega un papel esencial en la formación de la memoria, así como en su mantenimiento durante un periodo de tiempo tras el aprendizaje. Sin embargo, sólo es un depósito temporal de la memoria a largo plazo, ya que finalmente la información aprendida es transferida a otras zonas de la corteza cerebral (Squire, 2009).

Además de jugar un papel fundamental en la formación de memoria a largo plazo, el hipocampo está involucrado en procesos de integración y procesamiento de información espacial, existen numerosos estudios en los que se vincula el hipocampo con procesos de memoria espacial, que se basa en la formación de mapas cognitivos (O'Keefe y Nadel, 1978; Burgess *et al.*, 2002). La memoria de trabajo espacial consiste en el almacenamiento de información espacial por un corto periodo de

tiempo. La aplicación de nicotina modula la memoria de trabajo espacial, aunque los mecanismos por los que se produce esta modulación todavía no se conocen con exactitud. Varios estudios sugieren que el efecto de la aplicación de nicotina sobre el aprendizaje espacial, medido en el laberinto de agua de Morris, tiene su origen en el hipocampo, en concreto se ha postulado que los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  estarían implicados en esta función (Kenney y Gould, 2008).

El hipocampo también está implicado en el aprendizaje contextual, aunque también están involucradas otras regiones cerebrales en esta función. En concreto el papel del hipocampo está relacionado con la formación de asociaciones contextuales (Kenney y Gould, 2008). Además, varios trabajos postulan que el hipocampo también está implicado en procesos de adicción. Se ha descrito que algunas drogas son capaces de inhibir la actividad neurogénica hipocampal (Kenney y Gould, 2008, Chambers, 2013).

Por otro lado, existen evidencias que demuestran que la corteza cingulada anterior junto con ciertas porciones del hipocampo están involucradas en ciertas formas del control de la atención. (Andersen *et al.*, 2007).

#### 1.4. NEUROTRANSMISORES EN EL HIPOCAMPO

Tanto las células piramidales del hipocampo, las granulares del giro dentado y las presentes en la capa II de la corteza entorrinal son glutamatérgicas y por lo tanto excitatorias. Esto significa que el circuito trisináptico a través del cual fluye la información desde la corteza entorrinal es glutamatérgico. Sin embargo, las interneuronas son GABAérgicas, es decir, inhibitorias (Ribak y Seress, 1983; Amaral y Witter, 1989; Andersen *et al.*, 2000).

#### 1.4.1. Transmisión glutamatérgica

El principal neurotransmisor excitatorio en el hipocampo es el glutamato, que una vez liberado, va a actuar sobre dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos.

Existen tres tipos de receptores ionotrópicos (acoplados a un canal iónico): el receptor AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico), el kainato y el NMDA (ácido N-metil-D-aspartico). Se trata de receptores heteroméricos, formados por subunidades codificadas por genes distintos (Hollmann *et al.*, 1989; Keinanen *et al.*, 1990; Hollmann y Heinemann., 1994; Nakanishi *et al.*, 1998; Ozawa *et al.*, 1998). Todas las subunidades de los receptores de glutamato están constituidas por un extremo N- terminal extracelular, tres dominios transmembrana (M1, M3 y M4), un dominio transmembrana M2 con forma de horquilla, que delimita el poro iónico y un extremo C- terminal intracelular (Mayer, 2006).

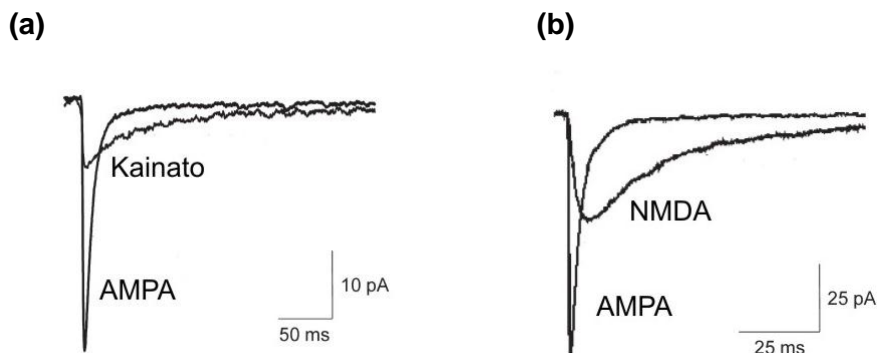
- **Receptores AMPA:** Son los responsables de la neurotransmisión rápida en la mayoría de las sinapsis del sistema nervioso central. Se trata de receptores tetraméricos, compuestos por la combinación de cuatro subunidades (GluR1-4). Son permeables al  $\text{Na}^+$ , al  $\text{K}^+$  y al  $\text{Ca}^{+2}$ , en concreto, la permeabilidad a este último ión viene determinada por la presencia de la subunidad GluR2, de manera que si no está presente, el receptor tiene una significativa permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$ . En los receptores AMPA nativos, la permeabilidad  $\text{Ca}^{+2}/\text{Na}^+$  oscila entre 0,07 y 2,8 en función de la presencia de esta subunidad. La distribución de las subunidades es variable entre los diferentes tipos celulares (Ozawa *et al.*, 1998; Sprengel, 2006). Las neuronas piramidales y granulares expresan sobretodo las subunidades GluR1 y GluR2, y en menor medida GluR3. En cuanto a las interneuronas, éstas van a expresar principalmente las subunidades GluR1 y GluR4.

El curso temporal del potencial postsináptico excitatorio (EPSP) mediado por estos receptores dependerá, por un lado, de la cantidad de glutamato liberado desde la terminal presináptica y de la velocidad con la que éste desaparece del espacio sináptico, así como de la afinidad del receptor y sus características de inactivación y desensibilización. Debido a que la desaparición del neurotransmisor por difusión es muy rápida, la inactivación del receptor tendría un papel importante en la declinación del EPSP (Ozawa *et al.*, 1998). Se trata

de receptores que se inactivan y desensibilizan rápidamente. El curso temporal de la desensibilización va a depender de las subunidades que lo conforman.

- Receptores kainato: Se trata de receptores formados por cinco subunidades: GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2, aunque la composición exacta de los receptores *in vivo* todavía no se conoce con exactitud. Son permeables al  $\text{Na}^+$ , al  $\text{K}^+$  y al  $\text{Ca}^{+2}$ . Su permeabilidad relativa  $\text{Ca}^{+2}$ /monovalente oscila entre 0,4-1,2 (Egebjerg y Heinemann, 1993). Los EPSP mediados por estos receptores presentan cinéticas lentas y, a pesar de que se encuentran ampliamente distribuidos en el hipocampo, generan respuestas sinápticas muy pequeñas, a excepción de las observadas en interneuronas y neuronas piramidales localizadas en CA3 (Cossart *et al.*, 2002)

Los receptores kainato localizados a nivel presináptico actúan modulando la liberación del neurotransmisor (aumentándola o disminuyéndola), la excitabilidad axonal y la plasticidad sináptica (Kullman, 2001; Lauri *et al.*, 2001; Kullman 2007).



**Figura 8. Contribución de los diferentes subtipos de receptores de glutamato a la actividad sináptica.** (a) Registro de un mEPSC espontáneo en una neurona piramidal de CA3 en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de D-APV (antagonista de los receptores NMDA), 100 $\mu\text{M}$  de bicuculina (bloqueante de los receptores GABA A) y 1 $\mu\text{M}$  de tetrodotoxina (bloqueante de los canales de  $\text{Na}^+$ ). Con el fin de aislar las corrientes de kainato se aplicó GYKI-52466 100 $\mu\text{M}$ . (b) EPSPs mediados por los receptores AMPA y NMDA. En presencia de CNQX (antagonista de los receptores AMPA) y ausencia de  $\text{Mg}^{+2}$ , se aisló la actividad del receptor NMDA. En estas sinapsis el componente kainato es insignificante (Adaptado de Traynelis *et al.*, 2010).

- Receptores NMDA: No se conoce con exactitud la estructura de estos receptores aunque se ha descrito que podrían dar lugar a tetrámeros o pentámeros (Michaelis, 1998; Flores-Soto, 2012). Están compuestos por la subunidad NR1 y las subunidades NR2A, NR2B, NR2C y NR2D. Existe una subunidad adicional, NR3, pero su papel en el hipocampo es insignificante. Se necesita la presencia de NR1 para que el receptor sea funcional. En el hipocampo son mayoritarios los subtipos que contienen las subunidades NR2A y NR2B, y se expresan en todas las capas celulares del hipocampo. La subunidad NR1 se expresa en las células granulares del giro dentado, en las neuronas piramidales y en algunas interneuronas.

Se caracterizan porque, a diferencia de los receptores AMPA, tienen una cinética muy lenta y la entrada de iones puede mantenerse durante un tiempo tras la finalización del pulso de glutamato (Kullman 2007).

Para que estos receptores se activen se necesita la unión tanto de glutamato como de glicina. Sin embargo, debido a la elevada concentración de éste último en el cerebro, se entiende que siempre se encuentra ocupando el receptor. En concreto, el sitio de unión para glicina se localiza en la subunidad NR1 y el sitio de unión de glutamato está en las subunidades NR2.

Por otro lado, el poro iónico de los receptores NMDA se encuentra bloqueado en condiciones de potencial de membrana en reposo por el ión  $Mg^{+2}$  y solo se va a permitir la entrada de iones a través del canal cuando la membrana está suficientemente despolarizada.

Poseen una elevada permeabilidad al  $Ca^{+2}$  y a otros cationes monovalentes. (Ascher y Nowak, 1988; Kullman 2007). Su permeabilidad relativa  $Ca^{+2}/Cs^{+}$  es de 4.2 (Spuston *et al.*, 1995).

Estas características hacen que el proceso de plasticidad sináptica, implicado en la formación de diversos tipos de aprendizaje y memoria, sea dependiente del receptor NMDA.

TIPO DE RECEPTOR	SUBUNIDAD	LOCALIZACIÓN	AGONISTAS SELECTIVOS	ANTAGONISTAS SELECTIVOS	FUNCIÓN
AMPA	GluR1 GluR2 GluR2 GluR4	Postsináptica predominantemente	-AMPA -5Fluorowillardiine -GYKI-52466	-NBQX -ATPO -LY293558	-EPSPs rápidos -Plasticidad sináptica -Excitotoxicidad
KAINATO	GluR5 GluR6 GluR7 KA1 KA2	Postsináptica y presináptica	-Ácido kaínico -ATPA -SYM2081 -Ácido domoico	-LY382884 -LY466195 -UBP 310 -UBP 302	-EPSPs -Inhibición presináptica -Excitotoxicidad
NMDA	NR1 NR2A NR2B NR2C NR2D NR3	Postsináptica	-Glutamato -Aspartato	-D-AP5 -CGP37849 -CGS19755	-EPSPs lentos -Plasticidad sináptica (LTP) -Excitotoxicidad

**Tabla 1. Receptores de glutamato ionotrópicos** (Adaptado de Alexander *et al.*, 2008).

En cuanto a los receptores de glutamato metabotrópicos, están formados por siete segmentos transmembrana y se encuentran acoplados a proteínas G, por lo tanto, promueven la activación de segundos mensajeros. Hasta la fecha se han identificado ocho subtipos de receptor (mGlu<sub>1-8</sub>). Se pueden dividir en tres grupos: I, II y III.

Los receptores del grupo I, que a su vez se dividen en los subtipos mGlu<sub>1</sub> y mGlu<sub>5</sub>, tienen una localización postsináptica y se encuentran acoplados a fosfolipasa C vía proteína G<sub>q</sub>. Por lo tanto, la activación de estos receptores conduce a un aumento del inositol trifosfato y diacil-glicerol (Fagni *et al.*, 2000; Kullman, 2007) produciendo un aumento de la concentración de Ca<sup>+2</sup> intracelular.

Los receptores de los grupos II (mGlu<sub>2</sub> y mGlu<sub>3</sub>) y III (mGlu<sub>4</sub>, mGlu<sub>6</sub>, mGlu<sub>7</sub> y mGlu<sub>8</sub>) se localizan principalmente a nivel presináptico y producen una inhibición de la adenilato ciclasa y una disminución de la producción de AMP<sub>C</sub> en un proceso mediado por proteína G<sub>i/o</sub>. La localización extrasináptica del grupo II sugiere que pueden actuar como autorreceptores que regulan la liberación de neurotransmisor. Los receptores del grupo III se encuentran localizados en la terminal sináptica y también se comportarían como autorreceptores mediante la inhibición de la transmisión excitatoria (Kullman, 2007). Es decir, la activación de estos receptores produce una reducción de la liberación de glutamato.

GRUPO	SUBTIPOS	ACOPLAMIENTO A PROTEÍNA G	LOCALIZACIÓN	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
I	mGlu <sub>1</sub> mGlu <sub>5</sub>	G <sub>q</sub> excitatoria	Postsináptica	-(S)-3,5-DHPG -Quisqualato	-LY 367385 -(S)-MCPG
II	mGlu <sub>2</sub>	G <sub>i/o</sub> inhibitoria	Presináptica Extrasináptica	-LY 354740 -LY 379268 -DCG IV -2R,4R-APDC	-LY 341495 -HYDIA71 -MSG0039
	mGlu <sub>3</sub>		Pre-postsináptica		
III	mGlu <sub>4</sub> mGlu <sub>6</sub> mGlu <sub>7</sub> mGlu <sub>8</sub>	G <sub>i/o</sub> inhibitoria	Pre-postsináptica	-AP4 -(RS)PPG	-MAP4 -MSOP

**Tabla 2. Receptores de glutamato metabotrópicos** (Adaptado de Alexander *et al.*, 2008).

#### 1.4.2. Transmisión GABAérgica

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. Los pulsos de GABA liberados por las interneuronas van a actuar modulando las corrientes excitatorias. Este neurotransmisor va a actuar sobre dos tipos de receptores: GABA A (ionotrópico) y GABA B (metabotrópico). Los dos tienen una localización tanto presináptica como postsináptica. También se localizan tanto a nivel sináptico como extrasináptico. (Kullmann *et al.*, 2005).

Los receptores GABA A están compuestos por cinco subunidades proteicas dispuestas alrededor de un poro central que constituye el canal iónico. Pueden estar formados por las siguientes subunidades:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  y  $\theta$ , dando lugar a diferentes subtipos de receptor. Éstos van a diferir en su afinidad por el neurotransmisor, velocidad de activación y desensibilización, afinidad por diferentes moduladores alostéricos, conductancias o localización en la neurona. Sin embargo, los principales subtipos en el hipocampo son:  $\alpha_1\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_4\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_5\beta\gamma_2$ , y  $\alpha\beta\delta$  (Korpi *et al.*, 2002; Möhler, 2006; Kullman *et al.*, 2007). Son permeables sobre todo al  $\text{Cl}^-$  y en menor medida al  $\text{HCO}_3^-$ . En las células, el  $\text{Cl}^-$  tiende a entrar produciendo una hiperpolarización y dando lugar a una inhibición de la transmisión nerviosa. Sin



embargo, en etapas tempranas del desarrollo, donde la concentración de  $Cl^-$  intracelular es relativamente alta, el gradiente electroquímico conlleva que los iones  $Cl^-$  salgan al exterior celular, por lo que dan lugar a corrientes despolarizantes. De manera que, estas señales GABAérgicas despolarizantes pueden hacer que las neuronas alcancen su umbral de disparo, lo cual juega un papel importante en etapas tempranas de la formación de los circuitos neuronales (Ben-Ari *et al.*, 1997; Rivera *et al.*, 1999). La expresión de estos receptores es dinámica, lo cual influye en la excitabilidad neuronal (Kittler y Moss, 2003).

En las células piramidales y granulares, los receptores GABA A se localizan principalmente a nivel somatodendrítico y en el segmento inicial del axón. Las interneuronas también expresan estos receptores, fundamentalmente a nivel perisomático y en las dendritas proximales, lo cual les permite ejercer una acción inhibitoria entre ellas (Möhler, 2006).

Los receptores GABA B son metabotrópicos y se encuentran acoplados a proteínas G. Están formados por dos subunidades GABA B<sub>1</sub> y GABA B<sub>2</sub>, compuestas por siete segmentos transmembrana. Tienen una localización tanto presináptica como post-sináptica, aunque también se pueden localizar a nivel extrasináptico (Chalifoux y Carter, 2011).

Los receptores GABA B que se encuentran a nivel presináptico están acoplados a canales de calcio dependientes de voltaje de los tipos N y P/Q. La activación de estos receptores produce una disminución de la entrada de calcio en la terminal presináptica y como consecuencia una disminución de la liberación de neurotransmisor. De esta forma actúan como autorreceptores inhibidores en las interneuronas.

A nivel post-sináptico, los receptores GABA B producen la apertura de canales de potasio dando lugar a una hiperpolarización prolongada. También inhiben o estimulan la adenilato ciclasa (Anwyl, 1991; Mintz y Bean 1993; Wu y Saggau, 1995; Dittman y Regehr, 1996; Bettler *et al.*, 2004; Chalifoux y Carter, 2011).

Los receptores GABA B se expresan en las células piramidales y granulares, fundamentalmente a nivel dendrítico. Algunas interneuronas también expresan este tipo de receptor (Kulik *et al.*, 2003). Los axones de las neuronas granulares, también llamados fibras musgosas, contactan con las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA3 en el *stratum lucidum*. Esta sinapsis es glutamatérgica y, por lo

tanto, excitadora. Sin embargo, se ha demostrado que en las terminales de las fibras musgosas también se produce una liberación de GABA, por lo que en las sinapsis de estas fibras van a coexistir los dos neurotransmisores (Taupin, 2007). En estas fibras se ha descrito la presencia de receptores GABA A, que se encontrarían activados de forma tónica, actuando como autorreceptores inhibidores, y receptores GABA B (Kullmann, 2007).

### 1.5. PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO

El término de plasticidad sináptica fue introducido por Jerzy Konorski en 1948, para describir los cambios persistentes en la eficacia sináptica que constituyen la base del almacenamiento de la información en el cerebro. Posteriormente, en 1973, Tim Bliss y Terje Lømo describieron cambios de larga duración en la eficacia sináptica de las sinapsis entre las fibras perforantes y las células granulares, como consecuencia de una estimulación tetánica breve. El descubrimiento de lo que se conoce como potenciación de larga duración surgió de los experimentos llevados a cabo por Andersen y Lømo en la Universidad de Oslo (Bliss y Lømo, 1973; Bliss *et al.*, 2007).

Existen dos tipos de plasticidad sináptica de larga duración, potenciación de larga duración (LTP) y depresión de larga duración (LTD) que se caracterizan por persistir durante horas.

Sin embargo, existe otro tipo de plasticidad, llamada de corta duración y que a su vez se puede dividir en función de si aumenta o disminuye la transmisión sináptica.

La aplicación de un estímulo en una vía hipocampal puede producir incremento o depresión en la transmisión sináptica.

- El proceso de facilitación se atribuye al aumento de calcio en la terminal sináptica que se produce cuando, tras un primer impulso, se produce un segundo, con el consecuente incremento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Wu y Saggau, 1994). Como consecuencia se produce un aumento de la respuesta post-sináptica, que vuelve a los valores basales tras unos milisegundos (Bliss *et al.*, 2007).

- La depresión de la eficacia sináptica se puede explicar por un proceso de depleción de las vesículas y por una desensibilización del receptor (Bliss *et al.*, 2007).

La aplicación de un tren de estímulos puede dar lugar a otro tipo de fenómeno de facilitación transitoria, denominada potenciación post-tetánica, en la cual se produce una respuesta sináptica de potenciación transitoria que persiste durante minutos (Bliss *et al.*, 2007).

La forma de plasticidad sináptica que más interés ha generado ha sido la potenciación de larga duración (LTP) ya que se considera la base del aprendizaje. Existen múltiples protocolos para la generación de LTP, uno de ellos es la aplicación de un tren de estímulos (tétano) en las terminales presinápticas. Tras la aplicación del tétano se obtiene una respuesta sináptica potenciada que se mantiene durante un periodo de tiempo considerable. En concreto, se entiende que en una LTP, la potenciación debe mantenerse durante 30-60 minutos. Este fenómeno depende de la activación de los receptores NMDA de glutamato. Para que se activen se requiere una liberación de glutamato desde la terminal presináptica y una despolarización importante postsináptica para liberar el canal del ión  $Mg^{+2}$ . Como consecuencia, se produce una elevación de la concentración de calcio a nivel postsináptico. La entrada de calcio conlleva la liberación de calcio de compartimentos intracelulares y la activación de segundos mensajeros con diferentes consecuencias como son la inserción de nuevos receptores en la membrana postsináptica o la activación de factores de transcripción. Se producen cambios morfológicos por la generación de nuevos contactos sinápticos y síntesis de nuevos receptores.

Al igual que LTP, también existe un fenómeno denominado depresión de larga duración (LTD) en el que se produce una depresión de la respuesta sináptica que perdura durante un periodo de tiempo considerable.

Existen estudios que relacionan los procesos de potenciación y depresión de larga duración con procesos de aprendizaje. La plasticidad sináptica posee las características de asociatividad, especificidad y cooperatividad que sugieren su implicación en procesos de almacenamiento de información (para revisión exhaustiva ver Bliss *et al.*, 2007). La hipótesis de “plasticidad sináptica y memoria” asegura que la plasticidad sináptica ocurre durante la actividad cerebral ordinaria y que es la responsable de la formación de la memoria (Martin *et al.*, 2000).

## 2. RECEPTORES NICOTÍNICOS EN EL HIPOCAMPO

### 2.1. EL RECEPTOR NICOTÍNICO

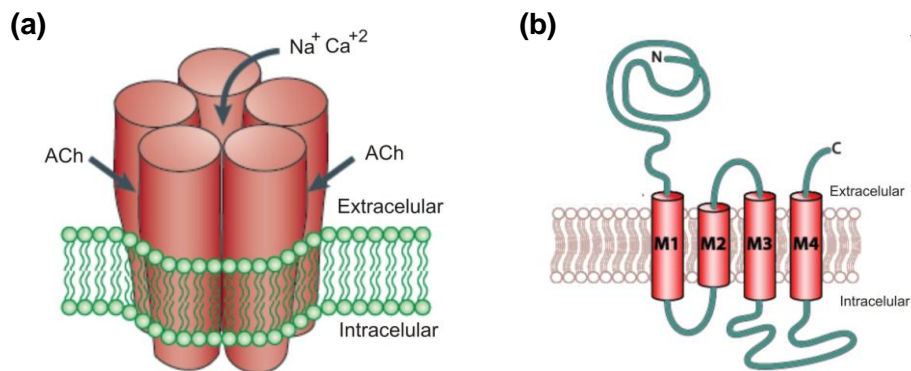
Las neuronas colinérgicas sintetizan, almacenan y liberan acetilcolina (ACh). Este neurotransmisor actúa sobre dos tipos de receptores: por un lado, sobre los receptores nicotínicos (ionotrópicos) y, por otro lado, sobre los receptores muscarínicos (metabotrópicos). Ambos se localizan tanto a nivel neuronal como en otros tipos celulares. (Gotti y Clementi, 2004; Albuquerque *et al.*, 2009).

El receptor nicotínico pertenece a la familia de los receptores iónicos activados por ligando. A su vez, se pueden dividir en dos grupos: los localizados a nivel de la placa motora, que median la transmisión neuromuscular, y los receptores nicotínicos neuronales, localizados en el sistema nervioso central y periférico. (McGehee y Role, 1995; Role y Berg, 1996; Albuquerque *et al.*, 1997; Wonnacott, 1997; Jones *et al.*, 1999; Dani, 2001; Hogg *et al.*, 2003).

#### 2.1.1. Estructura del receptor nicotínico neuronal

Los estudios de microscopía electrónica llevados a cabo en membranas postsinápticas del órgano eléctrico de *Torpedo californica* han constituido una fuente de información clave para el conocimiento de la estructura de los receptores nicotínicos.

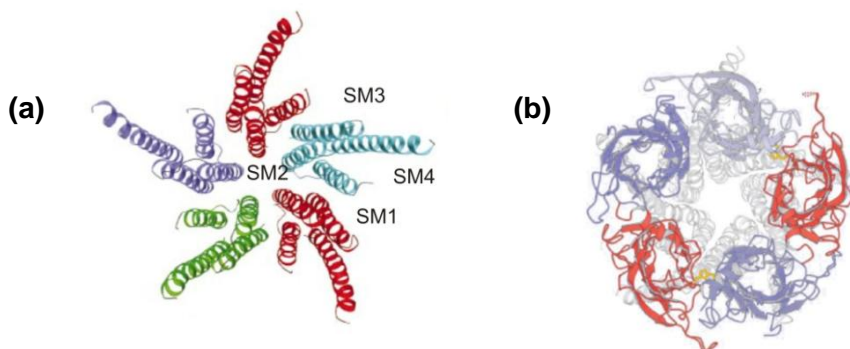
Los receptores nicotínicos son estructuras proteicas que están formadas por cinco subunidades transmembrana dispuestas alrededor de un poro acuoso central (McGehee y Role, 1995; Jones *et al.*, 1999; Karlin, 2002). Cada subunidad está compuesta por un extremo N-terminal extracelular, glicosilado, de aproximadamente unos 200 aminoácidos, tres segmentos transmembrana, un bucle citoplasmático y un cuarto segmento transmembrana con un extremo C-terminal extracelular. Además todas las subunidades contienen un lazo Cys en el extremo N-terminal compuesto por dos residuos de cisteína separados por trece aminoácidos y unidos por un puente disulfuro (Hogg *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2009).



**Figura 9. Estructura del receptor nicotínico.** (a) Los receptores nicotínicos se disponen formando un poro central que permite la entrada de iones (Adaptado de Karlin, 2002). (b) Cada subunidad está compuesta por cuatro segmentos transmembrana, un extremo amino terminal, un bucle citoplasmático y un extremo C-terminal extracelular.

Los cuatro segmentos transmembrana (SM) son  $\alpha$ -hélices que se disponen simétricamente rodeando el poro hidrófilo. Los SM2 de las diferentes subunidades se sitúan en el interior, dando lugar a un anillo interno que da forma y constituye la compuerta del poro, mientras que los SM1, 3 y 4 se localizan en el exterior y separan el anillo interno de la membrana lipídica (Miyazawa *et al.*, 2003; Unwin, 2005).

Las subunidades  $\alpha$ , contienen en el extremo N-terminal, cerca del SM1 dos residuos de cisteína contiguos, en la posición 191-192, que son necesarios para la unión con el agonista. Las subunidades  $\beta$  carecen de ellos (Kao *et al.*, 1984; Karlin *et al.*, 1986; Sargent, 1993; Lukas *et al.*, 1999; Albuquerque *et al.*, 2009).

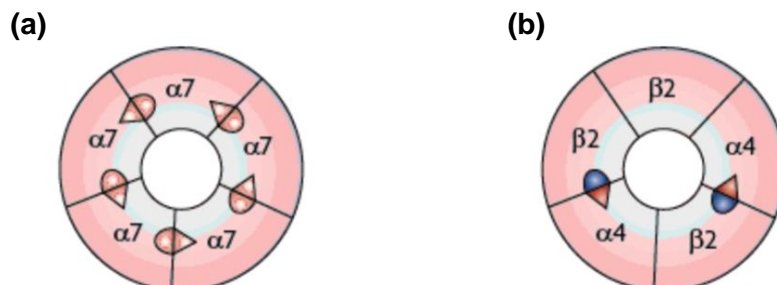


**Figura 10. Estructura pentamérica del receptor.** (a) Disposición de los segmentos transmembrana (Adaptado de Miyazawa *et al.*, 2003). (b) Estructura del receptor nicotínico desde la hendidura sináptica (subunidades  $\alpha$  en rojo, subunidades  $\beta$  en violeta, sitio de unión al agonista en amarillo) (Adaptado de Unwin, 2005).

El lugar de unión del ligando al receptor se sitúa en la interfase entre la subunidad  $\alpha$  y la subunidad adyacente. En el caso de que el receptor sea heteromérico, el sitio de unión se sitúa entre una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Debido a que los receptores nicotínicos neuronales están constituidos por dos subunidades  $\alpha$  y tres  $\beta$ , éstos poseen dos sitios de unión para la ACh. Sin embargo, si el receptor es homomérico, se encuentra entre las subunidades  $\alpha$  adyacentes, y por lo tanto van a tener cinco sitios de unión, uno por cada subunidad (Gotti y Clementi, 2004; Dani y Bertrand, 2007).

En el sitio de unión se pueden diferenciar dos zonas, una principal y una complementaria. En los receptores heteroméricos la zona principal se encuentra en las subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ) y la zona complementaria se localiza en las subunidades  $\beta_2$  o  $\beta_4$ . Las subunidades  $\alpha_5$  y  $\beta_3$  no contribuyen a ninguno de los dos componentes del sitio de unión. En el caso de los receptores homoméricos todas las subunidades constituyen la zona principal y la complementaria (Changeux y Edelstein, 1998; Corringer *et al.*, 2000).

El sitio de unión del agonista al receptor se encuentra en el extremo N-terminal de la subunidad  $\alpha$ , cerca de los dos residuos de cisteína contiguos. En el proceso de unión participan residuos de aminoácidos específicos (Tyr 93, Trp149, Tyr 190 y Tyr 198) (Karlin, 2002; Celie *et al.*, 2005). Estos aminoácidos se encuentran en los bucles A-C de la zona principal y son capaces de interactuar con el ligando. La zona complementaria contiene los bucles D-F.



**Figura 11.** Los dos subtipos de receptor nicotínico más importantes en el sistema nervioso central son el homomérico  $\alpha_7$  (a) y el heteromérico  $\alpha_4\beta_2$  (b) (Adaptado de Changeux, 2010).

La unión del ligando al receptor conlleva la apertura del canal en milisegundos. Se producen una serie de cambios conformacionales que finalizan con la rotación de los SM2, haciendo que el canal pase de una configuración cerrada a un canal hidrófilo abierto que permite la entrada de iones (Dani y Bertrand, 2007; Albuquerque, 2009).

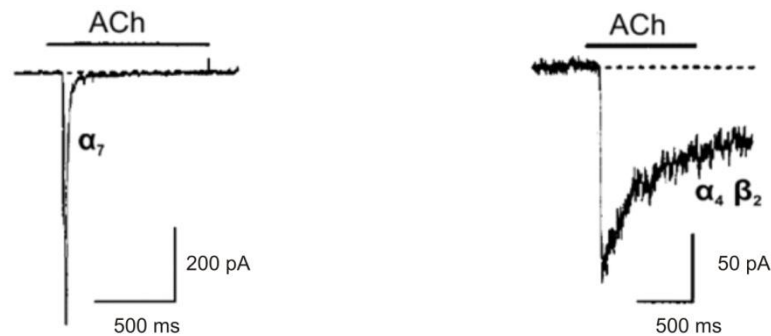
Estos receptores son permeables a cationes monovalentes y divalentes. En condiciones normales, la apertura del canal permite la entrada de  $\text{Na}^+$  y en menor medida de  $\text{Ca}^{+2}$ , así como la salida de  $\text{K}^+$  al exterior celular. Como consecuencia se produce una despolarización de la membrana plasmática. El ratio de permeabilidad del  $\text{Ca}^{+2}$  con respecto al  $\text{Na}^+$  varía en función del subtipo de receptor. La permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  de los receptores nicotínicos homoméricos  $\alpha_7$  es mucho más elevada que la de los receptores heteroméricos neuronales (Dani y Bertrand, 2007).

La despolarización de la membrana plasmática y la entrada de  $\text{Na}^+$  puede activar canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) e incrementar la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al interior celular. Por lo tanto, la activación del receptor nicotínico y su localización están implicados en la regulación de procesos mediados por  $\text{Ca}^{+2}$ , como son la liberación de neurotransmisor, cascadas de transducción de señales, procesos de plasticidad, supervivencia celular, apoptosis, excitabilidad celular, expresión génica, entre otros (Berger *et al.*, 1998; Chang y Berg, 2001; Sharma y Vijayaraghavan, 2001; Shimohama y Kihara, 2001; Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Gotti y Clementi, 2004).

Los receptores nicotínicos poseen tres conformaciones principales (Dani y Bertrand, 2007):

- Cerrado en reposo.
- Abierto: La exposición a un neurotransmisor produce la apertura del canal dando lugar a una configuración abierta y se produce la entrada de iones durante un par de milisegundos.
- Desensibilizado: La exposición prolongada a un agonista, produce una desensibilización en la que el receptor se estabiliza en una conformación cerrada y que no responde a la presencia del agonista.

Las cinéticas de cada subtipo de receptor dependen de las subunidades que lo conforman. Los receptores  $\alpha_4\beta_2$  poseen una elevada afinidad por el agonista y tienen una cinética de desensibilización más lenta (Dani y Bertrand, 2007). Sin embargo, los receptores  $\alpha_7$  tienen una afinidad por el agonista baja, se activan y desensibilizan rápidamente.



**Figura 12. Corrientes activadas por la aplicación de ACh (3 mM) en neuronas hipocámpales en cultivo, mediante la técnica de *patch clamp* en configuración de célula entera (Adaptado de Albuquerque *et al.*, 1995).**

### 2.1.2. Clasificación de los receptores nicotínicos neuronales

Existe una gran variedad de subtipos de receptor nicotínico en función de las subunidades que lo componen. Éstos difieren en sus propiedades farmacológicas, fisiológicas y en su localización anatómica (Gotti y Clementi, 2004).

Los receptores nicotínicos neuronales pueden ser homopentámeros (formados únicamente por subunidades  $\alpha$ ), o heteropentámeros (formados por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ). Se han descrito doce subunidades para los receptores nicotínicos neuronales:  $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$  y  $\beta_2$ - $\beta_4$ , que se unen con diferentes estequiometrias. Las subunidades  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ , pueden combinarse con las subunidades  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$  para dar lugar a receptores nicotínicos funcionales. Las subunidades capaces de formar receptores homoméricos son  $\alpha_7$ - $\alpha_9$ . La subunidad  $\alpha_{10}$  forma heterómeros con la subunidad  $\alpha_9$ . La subunidad  $\alpha_8$  se ha encontrado en tejidos de ave pero no en mamíferos (Hogg *et al.*, 2003; Dani y Bertrand, 2007).

Los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  son los principales receptores homoméricos en el cerebro del mamífero. En cuanto a los receptores heteroméricos, los subtipos más abundantes en el sistema nervioso central son los formados por las subunidades  $\alpha_4\beta_2$ , con una estequiometria  $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$  y con una gran afinidad a la nicotina. En estos receptores, una de las subunidades  $\beta_2$  puede ser reemplazada por una subunidad  $\alpha_5$  o  $\beta_3$ . En el sistema nervioso autónomo predominan los receptores del subtipo  $\alpha_3\beta_4$  (Lindstrom, 2003) aunque también se pueden encontrar asociadas las subunidades  $\alpha_5$  y  $\beta_2$  (Lukas *et al.*, 1999).



También pueden encontrarse receptores nicotínicos en localizaciones no neuronales como en linfocitos (Kawashima y Fujii, 2003), macrófagos (Pavlov y Tracey, 2005), pulmones (Conti-Fine *et al.*, 2000), queratinocitos (Grando, 1997), o endotelio vascular (Macklin *et al.*, 1998).

SUBTIPO	LOCALIZACIÓN PRINCIPAL	CINÉTICA	FUNCIÓNES FISIOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS	AFINIDAD ACh K <sub>i</sub> (nM)	POTENCIA ACh EC <sub>50</sub> (μM)
$\alpha_3 \beta_4^*$	-SNA -Hipocampo -Habénula medial -Núcleo interpeduncular - <i>Locus coeruleus</i>	Activación e inactivación lenta	Neurotransmisión en los ganglios periféricos	620-850	35-203
$\alpha_7$	-Hipocampo -Corteza	Activación e inactivación rápida	-Neuroprotección -Regulación de la liberación de neurotransmisores -Potenciación de la LTP -Atención y memoria -Alzheimer -Esquizofrenia	4000-180000	28-180
$\alpha_4 \beta_2^*$	-Tálamo -Corteza -Hipocampo	Activación e inactivación lenta	-Cognición -Atención -Analgesia -Dependencia a la nicotina y otras drogas -Epilepsia	33-44	0,5-68

**Tabla 3. Características de los principales receptores nicotínicos neuronales.** K<sub>i</sub>: constante de inhibición. EC<sub>50</sub>: Concentración efectiva que produce un 50% de la activación máxima (Wonnacott y Barik, 2007).

### 2.1.3. El receptor nicotínico alfa 7

Los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  son receptores homoméricos que se localizan de forma predominante en el hipocampo. En cuanto a sus características biofísicas, poseen un tiempo de apertura breve ( $\sim 100 \mu\text{s}$ ), gran conductancia (oscila entre 71 a 105 pS), baja afinidad por los agonistas (Albuquerque *et al.*, 2009) y alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  con respecto al  $\text{Na}^{+2}$ . En concreto, el ratio de permeabilidad  $\text{Ca}^{+2} : \text{Na}^{+}$  de estos receptores en las neuronas hipocampales de rata es de 6.1 (Castro y Albuquerque, 1995; Fucile, 2004).

La selectividad del poro a determinados iones se debe, en parte, a aminoácidos que bordean el extremo del SM2 y que dan lugar a un anillo intra y/o extracelular. En el caso de los receptores  $\alpha_7$ , este anillo está formado por residuos de ácido glutámico que le confieren esta elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  (Albuquerque *et al.*, 2009). Al tratarse de receptores altamente permeables al  $\text{Ca}^{+2}$ , su activación está implicada en múltiples procesos celulares mediados por este catión, como la liberación de neurotransmisor (MacDermott *et al.*, 1999), plasticidad sináptica (Broide y Leslie, 1999), crecimiento, migración y supervivencia celular (Belluardo *et al.*, 2000; Kihara *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2002; Utsugisawa *et al.*, 2002).

Tanto acetilcolina como colina son capaces de activar estos receptores, sin embargo, colina se disocia del receptor más rápidamente y, por lo tanto, induce un estado de desensibilización menos estable que acetilcolina (Mike *et al.*, 2000). La aplicación de colina a las interneuronas del *stratum radiatum* presentes en CA1, genera una despolarización suficiente para reclutar canales de  $\text{Na}^{+}$  e iniciar el potencial de acción (Alkondon *et al.*, 1999).

Estos receptores se encuentran asociados a procesos de cognición y memoria (Dani y Bertrand, 2007) y se ha demostrado su implicación en diferentes patologías. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, el fragmento beta-amiloide se une a los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , bloqueando las corrientes nicotínicas (Liu *et al.*, 2001; Pettit *et al.*, 2001). También está relacionado con patologías como esquizofrenia o trastorno bipolar (Gotti y Clementi, 2004).

#### 2.1.4. Papel del receptor nicotínico neuronal

El papel que desempeñan los receptores nicotínicos viene determinado por su localización anatómica. Aquellos que tienen una localización somática o dendrítica están implicados en la transmisión sináptica rápida, participando en la generación de potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) (Hogg *et al.*, 2003).

La localización que tiene más relevancia es la de aquellos que se encuentran a nivel de la terminal presináptica y que actúan regulando la liberación de neurotransmisores en diversas zonas del sistema nervioso central (Wonnacott *et al.*, 1995; Wonnacott, 1997). Se ha descrito que los receptores a nivel presináptico están implicados en la liberación de ACh (Wilkie *et al.*, 1993), glutamato (McGehee y Role, 1995; Alkondon *et al.*, 1997), dopamina (Rapier *et al.*, 1990; Wonnacott *et al.*, 1990; Grady *et al.*, 1992), noradrenalina (Clarke y Reuben, 1996) y GABA (Yang *et al.*, 1996).

Debido a la permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  de algunos de los subtipos, la activación de estos receptores está implicada en numerosos procesos celulares mediados por este catión (Broide y Leslie, 1999; Belluardo *et al.*, 2000, Utsugisawa *et al.*, 2002). Se ha demostrado que los receptores nicotínicos están implicados en procesos de atención y memoria. La aplicación de agonistas nicotínicos mejora ciertas formas de memoria, mientras que los antagonistas nicotínicos o lesiones colinérgicas las perjudican (Picciotto *et al.*, 1995; Newhouse *et al.*, 1997; Levin y Simon, 1998; Levin *et al.*, 2006). Determinados subtipos de receptor nicotínico también están implicados en procesos de neuroprotección (Kihara *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2002).

En diversos estudios se ha demostrado que la activación de los receptores nicotínicos facilita la inducción de la LTP, donde pueden influir de modo que una potenciación de corta duración pase a una potenciación de larga duración (LTP). Esta facilitación se ha observado en tratamiento agudo de rodajas cerebrales, en rodajas tratadas de forma crónica con nicotina e incluso en rodajas de animales de avanzada edad en los que la inducción de la LTP es difícil. Del mismo modo, también se ha observado que, una vez establecida la máxima potenciación a través de una estimulación de elevada frecuencia, la subsecuente aplicación de nicotina puede conseguir un incremento de este máximo (McKay *et al.*, 2007).

La influencia de los receptores nicotínicos en la plasticidad sináptica se debe, por un lado, al aumento de la liberación de glutamato a nivel presináptico. Por otro lado, contribuyendo a la despolarización a nivel postsináptico con un aumento de la señal de  $\text{Ca}^{+2}$  a nivel intracelular, contribuyendo a la retirada del ión  $\text{Mg}^{+2}$  que se encuentra bloqueando el receptor NMDA. Del mismo modo, el aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  conlleva procesos de transcripción de genes (McKay *et al.*, 2007) que se traducen en un aumento de la probabilidad de la inducción de la potenciación de larga duración. La coordinación en el tiempo de la activación de los receptores va a determinar su influencia en la plasticidad sináptica (Dani y Bertrand, 2007).

Por otro lado, también se ha descrito su relación con multitud de patologías como son el síndrome de Tourette (Gotti y Clementi, 2004), autismo (Perry *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Martin-Ruiz *et al.*, 2004), esquizofrenia (Court *et al.*, 2000; Martin-Ruiz *et al.*, 2003), ansiedad y depresión (Shytle *et al.*, 2002a,b), enfermedad de Alzheimer (Court *et al.*, 2000; Clementi *et al.*, 2000; Zamani y Allen, 2001; Wang *et al.*, 2002a,b), epilepsia (Steinlein *et al.*, 1995; Steinlein, 2004; Dani y Bertrand, 2007), procesos de adicción o enfermedad de Parkinson (Hogg *et al.*, 2003).

## 2.2. TRANSMISIÓN COLINÉRGICA EN EL HIPOCAMPO

Las fibras colinérgicas que inervan el hipocampo proceden fundamentalmente del complejo séptum medial y banda diagonal de Broca (Woolf, 1991; Dutar *et al.*, 1995) a través de la vía precomisural de la fimbria y fórnix, penetrando en el hipocampo a través del *stratum oriens* (Gu y Yakel, 2011). Modulan tanto la transmisión GABAérgica como la glutamatérgica inervando neuronas piramidales, granulares, interneuronas y las neuronas presentes en el *hilus* (Frotscher y Leranthe, 1985).

Estas fibras colinérgicas contienen varicosidades, que, en pocos casos están encarados hacia terminaciones postsinápticas, por lo que la señalización colinérgica podría darse a través de una transmisión no sináptica (Umbriaco *et al.* 1994), activando receptores nicotínicos presentes a nivel extrasináptico. Se ha descrito que la acetilcolina liberada es capaz de modular los procesos de aprendizaje y memoria como consecuencia de la modulación de los ritmos que resultan de la interacción de diferentes regiones hipocampales. (Kenney y Gould, 2008).

También se ha descrito la presencia de interneuronas colinérgicas en el hipocampo, localizadas sobre todo en el *stratum lacunosum-moleculare* de CA1, aunque también se localizan en el *stratum pyramidale* y *radiatum* de esta región, y en el *stratum granulosum* y *moleculare* del giro dentado (Frotscher y Léránth, 1985; Freund y Buzsáki, 1996). Éstas proyectan específicamente a interneuronas GABAérgicas, de manera que a través de la activación de los receptores nicotínicos presentes en estas células GABAérgicas se regularía la actividad generada en la región CA3 del hipocampo (Griguoli y Cherubini, 2012).

### 2.2.1. Receptores nicotínicos en el hipocampo

En el hipocampo se expresan una gran cantidad de receptores nicotínicos (Martin y Aceto 1981). Los subtipos predominantes son los  $\alpha_4\beta_2$  y los  $\alpha_7$ , sin embargo también se ha descrito la presencia de otras subunidades como  $\alpha_5$  y subtipos como el  $\alpha_3\beta_4$  (Alkondon y Albuquerque, 1993; Sargent, 1993; Jones y Yakel, 1997; Sudweeks y Yakel, 2000; Khiroug y col., 2002; Alkondon y Albuquerque, 2004).

Su expresión es mucho mayor en interneuronas que en neuronas glutamatérgicas (Frazier *et al.*, 1998; McQuiston y Madison, 1999; Ji *et al.*, 2001).

- En las interneuronas hipocámpales se han identificado los subtipos  $\alpha_4\beta_2$  y  $\alpha_7$  en diferentes regiones celulares como en el soma, dendritas y en las terminales presinápticas.
  - La activación de receptores  $\alpha_7$  y  $\alpha_4\beta_2$  presentes a nivel somatodendrítico en las interneuronas tiene un efecto excitatorio, y conduce a la generación de potenciales de acción (Jones y Yakel, 1997; Alkondon *et al.*, 1998; Frazier *et al.*, 1998a,b; McQuiston y Madison, 1999; Sudweeks y Yakel, 2000; Alkondon y Albuquerque, 2004). Debido al elevado número de interneuronas presentes en el hipocampo, su activación puede derivar en una inhibición o desinhibición de las neuronas piramidales en función de la proyección de la interneurona. La actuación directa de una interneurona sobre una neurona piramidal producirá una inhibición de la misma, sin embargo, la actuación de una interneurona sobre otra interneurona va a resultar en una desinhibición de la neurona piramidal (Ji y Dani, 2000).

- Los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  con localización extrasináptica participan en la regulación de la actividad GABAérgica, ya que se encuentran activados de forma tónica por la presencia de agonista endógeno en el medio (Alkondon *et al.*, 1999).
- Por otro lado, los receptores nicotínicos a nivel presináptico en las interneuronas, actúan potenciando la liberación de GABA (Alkondon *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 1996; Radcliffe y Dani 1998; Radcliffe *et al.*, 1999).

La activación GABAérgica, es capaz, por lo tanto, de modular la plasticidad sináptica glutamatérgica de forma indirecta, inhibiendo las neuronas piramidales y evitando la inducción de una potenciación de corta o larga duración (Ji y Dani, 2000; Ji *et al.*, 2001). Se ha propuesto que la inervación colinérgica en el hipocampo mediada por ACh conlleva una activación de las interneuronas que coordina la actividad de las células principales y otras interneuronas, controlando determinadas oscilaciones hipocámpales como el ritmo theta (Jones *et al.*, 1999).

- Respecto a la localización de los receptores nicotínicos en neuronas glutamatérgicas:
  - En 1996, Gray *et al.*, observaron que la aplicación de nicotina aumentaba la frecuencia de las corrientes miniatura glutamatérgicas en las sinapsis entre las fibras musgosas y las neuronas piramidales de CA3 en un proceso mediado por receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , demostrando que los receptores nicotínicos presentes en las terminales presinápticas producían un incremento de la transmisión sináptica. En las neuronas de CA1 y CA3 la activación de estos receptores a nivel presináptico produce una potenciación de la transmisión glutamatérgica, demostrando su implicación en procesos de plasticidad sináptica (Albuquerque *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 1999). También se ha descrito la existencia de receptores  $\alpha_3\beta_4\beta_2$  en axones de neuronas glutamatérgicas que se encuentran inervando las interneuronas presentes en CA1 (Albuquerque *et al.*, 2009).
  - Estudios llevados a cabo en cultivo de neuronas hipocámpales, han demostrado que tanto las neuronas piramidales como las interneuronas

son sensibles a la aplicación de nicotina (Alkondon *et al.*, 1996). En cambio, los estudios realizados en rodajas de hipocampo muestran diferentes resultados. Algunos grupos concluyen que las neuronas excitadoras no responden a la aplicación de ACh, (Jones y Yakel, 1997; Frazier *et al.*, 1998; McQuiston y Madison, 1999). Otros han postulado que las neuronas piramidales tienen una pequeña respuesta a la aplicación de acetilcolina (Alkondon *et al.*, 1997). Por último, otros autores han descrito la existencia de receptores  $\alpha_7$  a nivel postsináptico (Hefft *et al.*, 1999; Fabian-Fine *et al.*, 2001; Ji *et al.*, 2001).

### 2.3. FARMACOLOGÍA DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS

Las propiedades farmacológicas de cada subtipo varían en función de las subunidades que lo conforman. Los diferentes subtipos de receptor nicotínico difieren en su comportamiento farmacológico frente a agonistas, antagonistas y moduladores (Jensen *et al.*, 2005).

Los receptores nicotínicos fluctúan entre tres principales estados en ausencia del agonista: un estado de cerrado, un estado activado y un estado desensibilizado. El equilibrio entre dos estados viene determinado por las diferencias de energía libre de los estados. La unión de una molécula al receptor lo estabiliza preferentemente en una conformación determinada (Monod *et al.*, 1965). En reposo, el equilibrio entre las diferentes conformaciones favorece al estado cerrado. Los agonistas son ligandos que estabilizan preferentemente el receptor en un estado abierto activo. Sin embargo, los antagonistas competitivos son ligandos que estabilizan el receptor en un estado conformacional cerrado (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007).

Los moduladores alostéricos son ligandos que se unen al receptor en lugares distintos al sitio de unión del agonista, siendo capaces de modular sus transiciones conformacionales y su función. Aquellos que potencian la función del receptor se denominan moduladores alostéricos positivos y los que la inhiben, negativos (Dani y Bertrand, 2007).

En los últimos años se ha incrementado el número de estudios en busca de nuevos ligandos nicotínicos debido a que se ha demostrado la relación entre disfunciones del sistema colinérgico y determinadas patologías como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, esquizofrenia y determinados tipos de epilepsia (Pereira *et al.*, 2002).

Agonistas no selectivos de receptores nicotínicos	Antagonistas no selectivos de receptores nicotínicos	Moduladores alostéricos de receptores nicotínicos
Acetilcolina	$\alpha$ -conotoxina MII	Galantamina
Nicotina	Mecamilamina	Fisostigmina
Anatoxina	Hexametonio	Codeína
Epibatidina	D-Tubocurarina	
Anabaseína	Dihidro- $\beta$ -eritroidina	
Carbacol	Clorisondamina	
Lobelina		
Dimetilfenilpiperazinio(DMPP)		

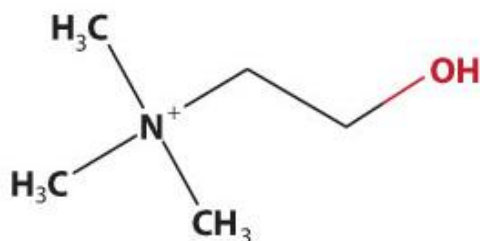
Agonistas selectivos de receptores $\alpha_7$	Antagonistas selectivos de receptores $\alpha_7$	Modulador alostérico selectivo $\alpha_7$
Colina	$\alpha$ -bungarotoxina	PNU 120596
GTS-21	$\alpha$ -conotoxina Iml	5-OH-indol
PNU 282987	Metilicacnitina (MLA)	
AR-R17779		

**Tabla 4. Ligandos de receptores nicotínicos neuronales.**



### 2.3.1. COLINA

La colina fue descubierta en 1864 por Adolph Strecker y obtenida por primera vez mediante síntesis química en 1866. Se trata de una amina cuaternaria, cuya concentración en plasma oscila entre 10-50  $\mu\text{M}$  (Sweet *et al.*, 2001, Michel *et al.*, 2006). La barrera hematoencefálica no protege al cerebro de las fluctuaciones de colina en plasma ya que el transporte se encuentra altamente insaturado a las concentraciones fisiológicas de colina (Löffelholz *et al.*, 1993)



**Figura 13. Estructura química de colina.** Se trata de una amina cuaternaria cargada positivamente (Zeisel y Busztajn, 1994).

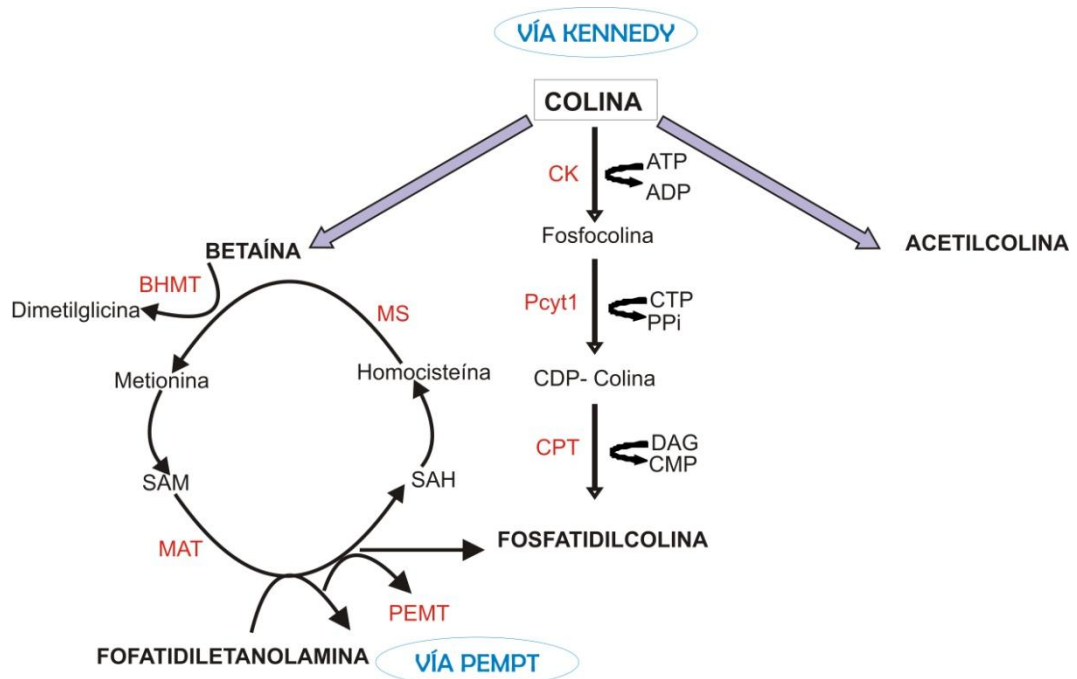
El aporte suplementario de colina en las primeras etapas de la vida es esencial. En 1980, el grupo de Zeisel *et al.*, observaron que las concentraciones en sangre de colina en el neonato eran mucho mayores que en la edad adulta (Zeisel *et al.*, 1980). Posteriormente, describieron, en roedores neonatos, un aumento de la síntesis endógena de fosfatidilcolina en cerebro e hígado (Blusztajn *et al.*, 1979). Además, la leche materna contiene elevadas cantidades de colina (Zeisel *et al.*, 1986; Rohlf *et al.*, 1993).

A pesar de que la ingesta de este compuesto a través de la dieta es fundamental, también es posible su obtención por síntesis endógena, proceso que se da en el hígado (Zeisel, 2000; Zeisel, 2006; Buchman, 2009). A través de esta vía, el organismo asegura la presencia de este compuesto esencial en situaciones de déficit o mayor demanda, como en procesos de inanición, durante el desarrollo del feto, lactancia. En este caso, la colina se obtiene a través de fosfatidiletanolamina, que va a dar lugar a fosfatidilcolina por una reacción en tres pasos catalizada por el enzima fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMPT).

La síntesis de fosfatidilcolina a través de la colina ingerida en la dieta se produce a través de la vía Kennedy, proceso que se da en todas las células provistas de núcleo. La mayor parte de la colina celular es fosforilada por la colina quinasa para dar lugar a fosfocolina, que reacciona con citidintrifosfato para dar lugar a CDP-colina

o citidina difosfocolina. La formación de fosfatidilcolina se produce como consecuencia de la reacción de CDP- colina con diacilglicerol (DAG).

La oxidación de colina se produce principalmente en hígado y riñón, en concreto, en las mitocondrias de estos órganos, obteniendo como resultado betaína (Michel *et al.*, 2006).



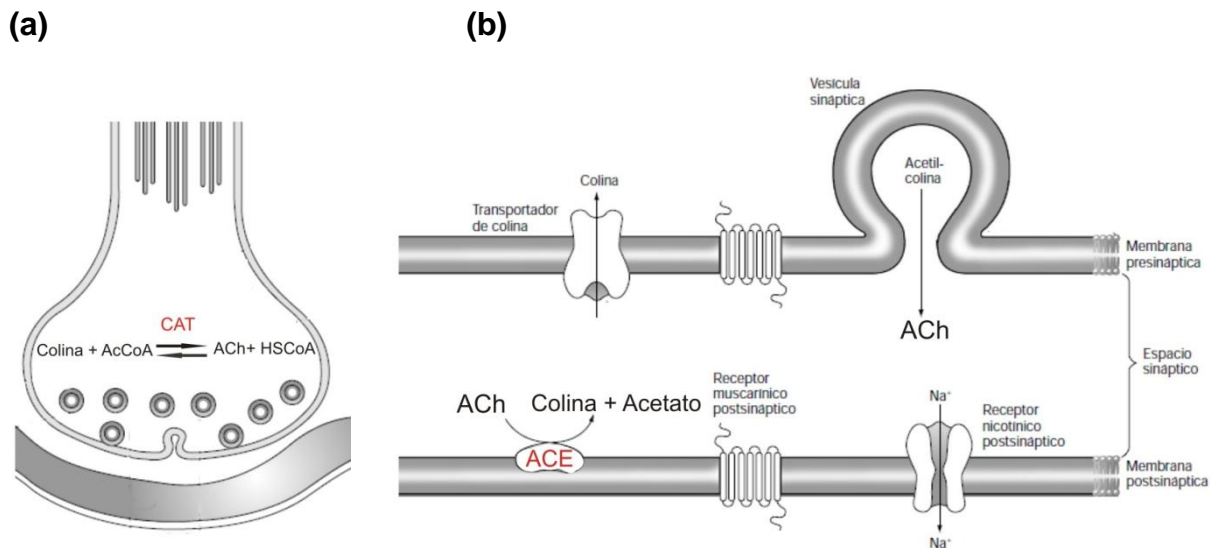
**Figura 14. Vías metabólicas de colina.** ATP, Adenosina trifosfato; ADP, Adenosina difosfato; CK, colina quinasa; CTP, Citidina trifosfato; PPi, Pirofosfato; Pcyt1, fosfocolina citidil transferasa; DAG, Diacilglicerol; CMP, Citidina monofosfato; CPT, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa; PEMT, fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa; SAH, S-adenosilhomocisteína; MS, Metionina sintasa; SAM, S-adenosilmetionina; MAT, Metionina adenosiltransferasa; BHMT, Betaína-homocisteína metiltransferasa (Adaptado de Michel *et al.*, 2006).

Las funciones bioquímicas de colina son diversas. Por un lado, es un precursor de fosfatidilcolina y de esfingomielina, por lo que se trata de un componente necesario para la síntesis de fosfolípidos de membrana y de otros mensajeros intracelulares como diacilglicerol o ceramida. También está implicada en la síntesis de mediadores lipídicos como el factor activador de plaquetas y lisofosfatidilcolina. Por lo tanto, su papel es fundamental para el mantenimiento de la integridad y la función celular

(Zeisel y Busztajn, 1994; Biasi, 2011). Además, como precursor de fosfatidilcolina, también tiene un papel fundamental en el transporte de lípidos.

En el citoplasma de las neuronas colinérgicas, colina da lugar al neurotransmisor acetilcolina (ACh), a través de una reacción catalizada por el enzima acetilcolintransferasa (ChAT), en la que también se requiere acetilcoenzima A. La ACh liberada en las sinapsis es degradada por las colinesterasas en el espacio sináptico dando lugar a colina y ácido acético. Colina vuelve al interior celular por un sistema de recaptación de alta afinidad (SRCAA) presente en la membrana de la neurona presináptica.

Por otro lado, se ha demostrado que colina es un agonista de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  y que activa parcialmente los receptores  $\alpha_3\beta_4$ , sin embargo, no es agonista de los receptores  $\alpha_4\beta_2$  (Mandelzys *et al.*, 1995; Papke *et al.*, 1996; Alkondon *et al.*, 1997, Alkondon *et al.*, 1999; González-Rubio *et al.*, 2006). Por lo tanto, a través de la activación de los receptores  $\alpha_7$ , colina modula la liberación de neurotransmisores (Alkondon *et al.*, 2000), regula la excitabilidad neuronal (Frazier *et al.*, 1998), disminuye el umbral para la LTP (Meck y Williams, 1997a,b,c) y también ha demostrado tener efectos neuroprotectores (Levin y Rezvani, 2002).



**Figura 15. Esquema de la sinapsis colinérgica.** (a) Síntesis de acetilcolina (ACh) en la terminal presináptica. (b) Degradación de ACh en el espacio sináptico (Adaptado de Flórez, 1998).

La concentración de colina en el espacio extracelular en condiciones normales es de 3-5  $\mu\text{M}$  aproximadamente, mientras que en el interior celular la concentración es diez veces mayor (Klein *et al.*, 2002). Sin embargo, procesos despolarizantes o determinadas patologías hacen que la concentración de colina sea mayor alcanzando una concentración en el medio extracelular de 9 a 20  $\mu\text{M}$  (Alkondon y Albuquerque, 2006). Por otro lado, cuando se produce la liberación de ACh en las sinapsis colinérgicas, se estima que se alcanzan concentraciones milimolares en los microdominios cercanos a la sinapsis colinérgica, por lo que se puede suponer que la concentración de colina que se puede llegar a alcanzar tras la degradación de la ACh es similar. Por último, un incremento en la ingesta de colina puede producir una elevación de su concentración a nivel cerebral (Klein *et al.*, 1998; Zeisel, 2000; Alkondon y Albuquerque, 2006).

Se trata de un compuesto capaz de producir una modulación de la expresión génica resultando en un aumento en la neurogénesis en el hipocampo (Albright *et al.*, 1999). Las respuestas observadas en la memoria espacial tras la administración de suplementos de colina se asocian con cambios en neuronas del hipocampo implicadas en procesos de aprendizaje y memoria (Biasi, 2011).

En estudios en epilepsia, Parkinson o Alzheimer parece que colina mejora problemas de déficit de memoria, déficit de atención, trastornos de hiperactividad, neuromusculares y maníacos (Mizumori, 1985; Bjelland *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2009; Zeisel y da Costa, 2009).

La deficiencia de colina y la consecuente incapacidad para producir fosfatidilcolina, produce como resultado una disfunción hepática debido a la acumulación de triacilglicerol en el hepatocito (Lombardi *et al.*, 1968; Lombardi, 1971; Yao y Vance, 1988; Blusztajn y Zeisel, 1989; Yao y Vance, 1989) dando lugar a hígado graso o esteatosis hepática. Por lo que, en 1998, colina fue reconocida como un nutriente esencial por el "Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine" (Zeisel y da Costa, 2009).

# **OBJETIVOS**

La activación de receptores  $\alpha_7$  a nivel hipocampal está implicada en múltiples procesos celulares, como consecuencia de su permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$ . Entre ellos se encuentra la liberación de neurotransmisores (MacDermott *et al.*, 1999), procesos de plasticidad sináptica (Broide y Leslie, 1999) crecimiento, migración y supervivencia celular (Belluardo *et al.*, 2000, Utsugisawa *et al.*, 2002).

El objetivo principal del trabajo es el estudio de la modulación de la transmisión sináptica ejercida por los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  en el hipocampo. Para ello se han desarrollado los siguientes objetivos

- Estudio del efecto de colina sobre los fEPSP obtenidos en diferentes regiones de la estructura hipocampal, así como el estudio de las espigas poblacionales obtenidas como consecuencia de la estimulación en *stratum radiatum* y *stratum alveus*.
- Utilización de diversos agonistas y antagonistas nicotínicos, así como de moduladores alostéricos, con el fin de estudiar la modulación que estos ejercen sobre los fEPSP y las espigas poblacionales
- Aplicación de protocolos de facilitación por pares de pulsos y de potenciación de larga duración para evaluar cambios en la plasticidad sináptica.
- Estudiar la modulación de la transmisión sináptica en ratones *wild type* y ratones *knock out* para el receptor nicotínico  $\alpha_7$ .
- Estudio del efecto de colina sobre la inhibición recurrente.
- Evaluación de la influencia de la edad del animal en la modulación de la transmisión sináptica.
- Estudiar los efectos de colina sobre el potencial de membrana celular.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

Uno de los avances más importantes para el estudio de la funcionalidad de la formación hipocampal fue el desarrollo de las preparaciones de rodajas de hipocampo *in vitro*. En los años setenta, Per Andersen, Knut Skede y Rolf Westgaard empezaron a utilizar rodajas de hipocampo, obtenidas de secciones transversales del hipocampo de cobaya y observaron la activación de vías intrínsecas (Skede y Westgaard, 1971).

Este tipo de preparación posee ventajas importantes, entre ellas destacan (Teyler, 1980):

- Capacidad para sobrevivir *in vitro* durante largos periodos de tiempo
- La conservación de las conexiones sinápticas.
- El control sobre los componentes químicos del medio así como de diferentes parámetros como la temperatura, pH etc.
- La facilidad y la precisión con la que los electrodos pueden ser colocados.

## **1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS RODAJAS DE HIPOCAMPO**

Los experimentos se realizaron en rodajas de hipocampo de ratas macho Sprague-Dawley de (200-250g) de peso, y de ratones C57BL/6J macho, de 2-4 meses de edad.

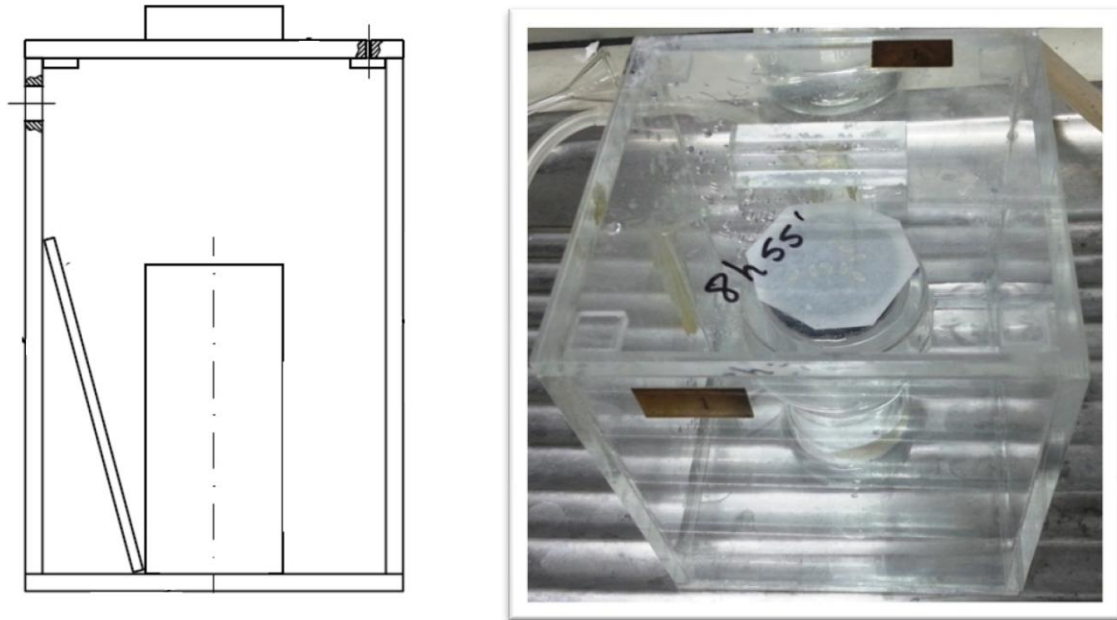
El cuidado y la utilización de los animales se llevó a cabo de acuerdo a las normas para la manipulación de animales establecidas por el Comité Ético Nacional para el manejo de animales de experimentación y se aprobó por el Comité Local de protección de animales de la Universidad Autónoma de Madrid y del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Los animales se sacrificaron por decapitación tras ser anestesiados con isofluorano. El cerebro fue rápidamente extraído e introducido en una solución de Krebs-Ringer bicarbonato (KRB). La solución se burbujeó con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) y se utilizó a una temperatura aproximada de 2 °C. Es importante que la obtención de las rodajas se lleve a cabo en el menor tiempo posible y a temperaturas inferiores a 4°C para minimizar el metabolismo celular y evitar cambios celulares irreversibles (Sajikumar *et al.*, 2005).

Los hipocampos se extrajeron de ambos hemisferios y se seccionaron transversalmente con un *chopper* manual, obteniendo rodajas de hipocampo de 400 µm de espesor que se colocaron en una placa Petri con KRB frío y burbujeado con

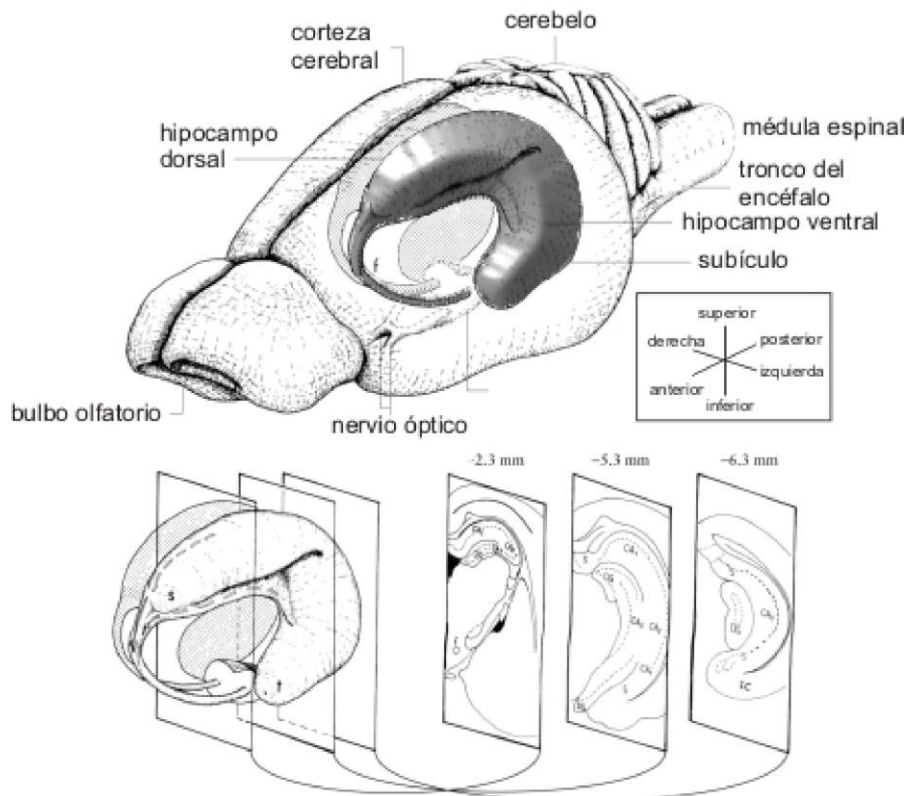


carbógeno. De la placa Petri se transfirieron a una cámara de mantenimiento, donde permanecieron, a temperatura ambiente (20-25°), aproximadamente dos horas antes de ser utilizadas. Es necesario esperar 2-4 horas desde la obtención de las rodajas hasta que son utilizadas, para que éstas sean estables a nivel metabólico (Sajikumar *et al.*, 2005).



**Figura 16. Cámara de mantenimiento**

La cámara de mantenimiento es un recipiente de metacrilato con forma de cubo. A través de un pequeño orificio en una de las caras se permite la entrada del tubo de oxigenación. En el interior de la cámara, situada en el centro, se encuentra una columna del mismo material, en cuyo extremo se coloca una placa Petri (llena de KRB) sobre la que se coloca papel Whatman. Las rodajas de hipocampo se depositaron sobre este papel de filtro, permitiendo el paso de los componentes del KRB a las rodajas. Para conseguir un ambiente saturado de vapor de agua y de oxígeno, el interior de la cámara se burbujeó continuamente con gas carbógeno y se añadió una pequeña cantidad de agua en el fondo del recipiente.



**Figura 17. Representación tridimensional del hipocampo de rata.** En la parte inferior derecha, tres secciones coronales hipocampales. DG: giro dentado; EC: corteza entorrinal; f: fórnix; s: polo septal del hipocampo; S: subículo; t: polo temporal del hipocampo (adaptado de Amaral y Witter, 1995).

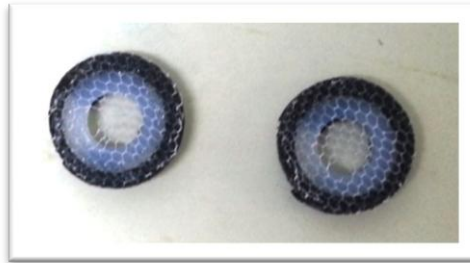
## 2. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

### 2.1. CÁMARA DE REGISTRO

Una vez transcurrido el periodo de estabilización, transferimos una de las rodajas a una cámara de registro con la ayuda de una pipeta de vidrio repleta de KRB, burbujeado y a 23°C.

La cámara de registro es una placa de metacrilato con dos pocillos, uno delantero y otro trasero, conectados entre sí. En el pocillo delantero se colocaron las rodajas con la ayuda de dos estructuras, cada una de ellas, formada por una red de nylon adherida a un aro de plástico, con el tamaño necesario para que encajaran perfectamente en el pocillo. El líquido de perfusión llegó a la cámara de registro a una velocidad constante de 2 ml/minuto, por la acción de una bomba peristáltica (Masterflex L/S Digital Economy Driver). Ambos pocillos fueron continuamente

perfundidos con KRB. La cantidad de líquido se reguló mediante un tubo de metal, móvil y conectado a un sistema de vacío situado en el pocillo trasero.



**Figura 18. Red de nylon adherida a un aro de plástico.** Estructura utilizada para fijar las rodajas en la cámara de registro.

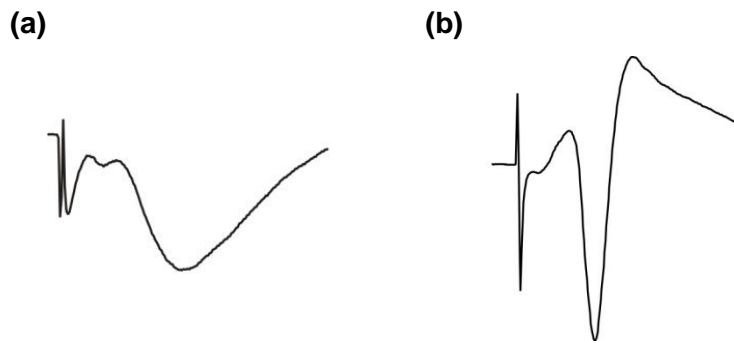
Los experimentos se realizaron a una temperatura de 32°C. Con el fin de mantener esta temperatura, la cámara se calentó directamente mediante el contacto con una placa metálica Peltier acoplada a un termorregulador (Cibertec S.A, España). Con el fin de minimizar el efecto de las vibraciones y otras influencias externas, los experimentos se realizaron sobre una mesa antivibratoria (BenchTop, Newport Corporation, USA).

## 2.2. REGISTRO DE POTENCIALES EXTRACELULARES PROVOCADOS

La disposición histológica de la formación hipocámpal, con los somas de las células principales densamente empaquetados y la localización paralela de sus dendritas apicales, además de la facilidad con la que se activan de forma sincrónica, ha permitido el registro de potenciales de campo. Se trata de una herramienta sensible y cuantitativa de la intensidad de las respuestas sinápticas excitatorias.

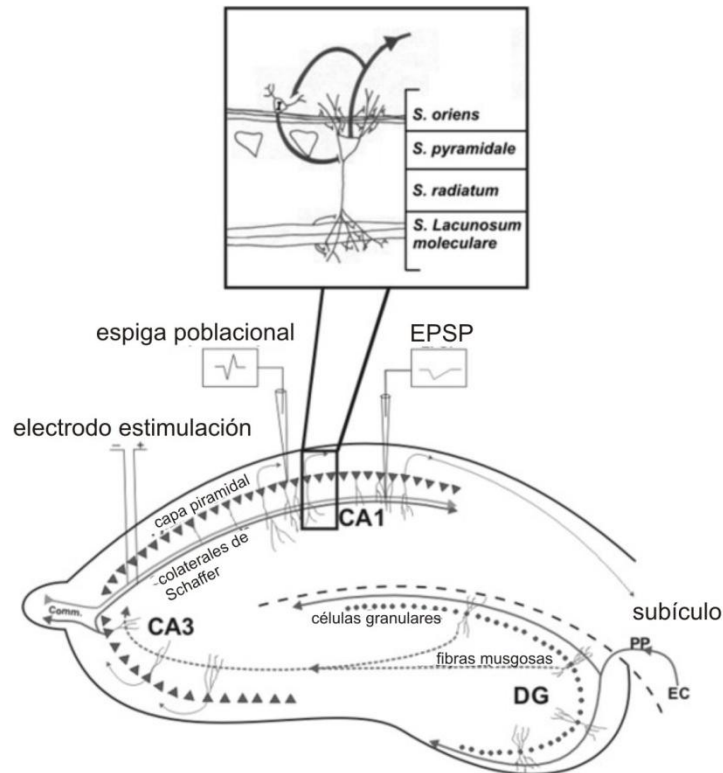
Durante los años cincuenta, diversos grupos empezaron a utilizar este tipo de registros con el fin estudiar el patrón de activación o inactivación de los sistemas hipocámpales. Brian Cragg y Lionel Hamlyn fueron los primeros en registrar potenciales de campo significativos (Cragg y Hamlyn, 1957). Posteriormente, en 1960, Andersen describió como las fibras comisurales de CA1 y CA3 daban lugar a un potencial de campo negativo, al que se denominó potencial postsináptico excitatorio de campo (fEPSP) (Andersen *et al.*, 2007).

Los potenciales de campo son potenciales generados por un grupo de neuronas y que se registran extracelularmente como respuesta a una estimulación, ya sea ortodrómica o antidrómica. La despolarización intracelular que se produce a nivel postsináptico es registrada extracelularmente como una onda negativa, si es en esa zona donde se produce la entrada de corriente.



**Figura 19. Trazos originales de registros extracelulares.** (a) Potencial postsináptico excitatorio de campo (fEPSP). (b) Espiga poblacional

Cuando se estimulan eléctricamente los axones de las neuronas piramidales de CA3 (colaterales de Schaffer) en el *stratum radiatum* de CA1, se produce una activación de sinapsis excitadoras. En concreto, estas fibras liberan glutamato, que actúa sobre los receptores de glutamato localizados en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA1. Como consecuencia se produce la apertura del canal iónico por el que fluirán fundamentalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, generando corrientes a través de las membranas postsinápticas en las zonas activadas sinápticamente. En el interior celular, estas corrientes fluyen proximal y distalmente a la región sináptica, produciéndose una corriente de salida en otras áreas de la membrana, especialmente en el soma. El registro extracelular de estas corrientes sincrónicas da lugar a los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSPs), que serán negativos en las zonas sinápticamente activas y positivos en las zonas donde se producen las corrientes de salida.



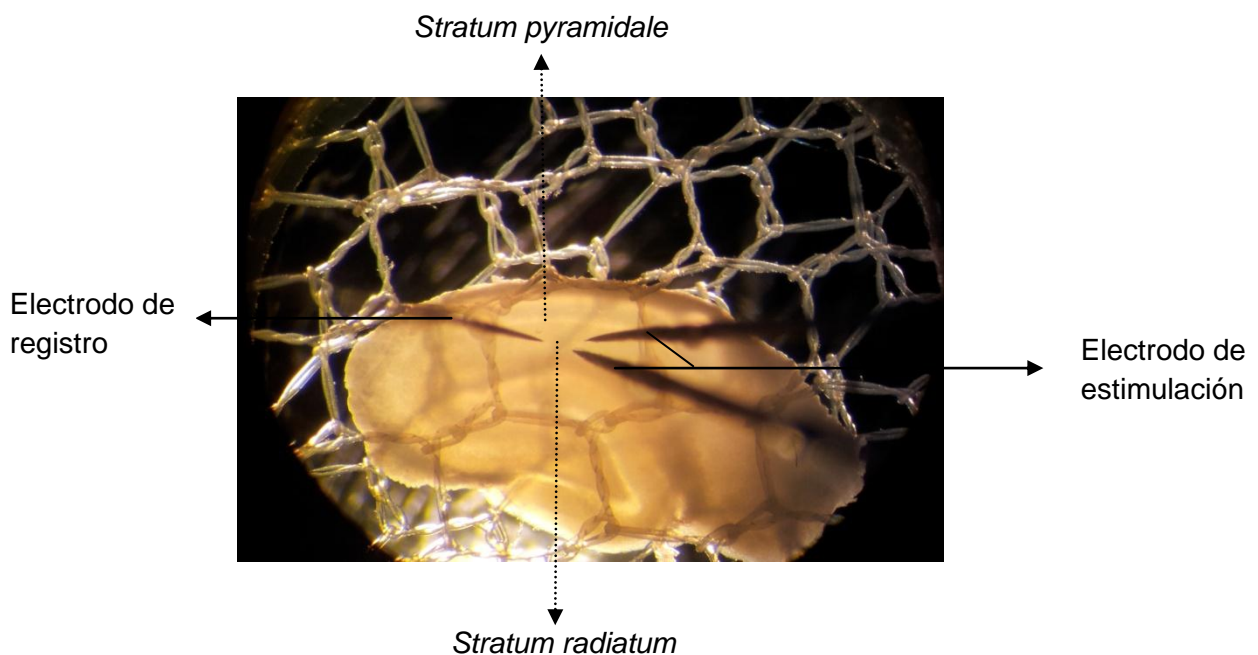
**Figura 20. Vías hipocámpicas y su estimulación.** Las fibras procedentes de la corteza entorrinal (EC) entran en el giro dentado (DG) a través de la vía perforante (PP). Desde el giro dentado, la información viaja hacia las neuronas piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas. Las neuronas de CA3 van a conectar con CA1 a través de las colaterales de Schaffer, junto con las fibras comisurales provenientes del CA3 contra lateral. Si se coloca el electrodo de registro en *stratum radiatum*, donde se encuentran las dendritas de las neuronas piramidales, se obtienen potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP). En cambio, si el electrodo de registro se coloca en la capa piramidal, se obtienen espigas poblacionales.

En estos registros, se puede observar una pequeña onda que precede al fEPSP, que recibe el nombre de *fiber volley* (FV). Representa un potencial de acción compuesto de las fibras aferentes activadas sincrónicamente como consecuencia a una estimulación y su tamaño está relacionado con el número de fibras reclutadas (Andersen *et al.*, 1978).

En el caso del registro extracelular de la espiga poblacional, que corresponde al disparo sincrónico de potenciales de acción en una población de neuronas, el sumidero activo de corriente se localiza en el soma de las neuronas y la fuente pasiva de corriente se encuentra en las dendritas más distales (Andersen *et al.*, 1971).

Para la estimulación y el registro de las señales se utilizaron microelectrodos de tungsteno, de 0.1 (M $\Omega$ ) y de 1 (M $\Omega$ ) respectivamente. Éstos se colocaron en el *stratum radiatum* de CA1 con la ayuda de micromanipuladores (Märzhäuser, Alemania). Los micromanipuladores, a su vez, se anclaron a la mesa antivibratoria mediante bases magnéticas. El electrodo de referencia, formado por una bolita de plata clorurada se colocó en el pocillo trasero de la cámara de registro.

Los electrodos de estimulación, bipolares, se elaboraron manualmente, dejando una separación en sus puntas de 0,5 mm aproximadamente. La intensidad de la estimulación fue de 20 a 50  $\mu$ A y de 0,1 ms de duración, obtenidos mediante una unidad aisladora del estímulo (ISU 200 BIP, Cibertec S.A, España) controlada por un ordenador mediante el programa Clampex 10. Los pulsos fueron aplicados a intervalos de 15 segundos y la frecuencia de la estimulación fue de 0.05-0.066 Hz. La intensidad de la estimulación se ajustó con el fin de obtener registros correspondientes a un 40-50% de la respuesta máxima. El electrodo de registro se acopló directamente, a un preamplificador, que a su vez estaba conectado a un amplificador, con la finalidad de acondicionar la señal de forma conveniente para el proceso de digitalización. El sistema de adquisición permitió el almacenamiento, procesamiento y análisis de las señales provenientes del amplificador. La placa de adquisición analógico-digital utilizada fue Digidata 1440A (Axon Instruments). Las respuestas obtenidas fueron filtradas con un filtro de pasa bajos a 3 Hz y se digitalizaron a 25 kHz.



**Figura 21.** Fotografía de una rodaja de hipocampo en la cámara de registro. Estimulación y registro en el *stratum radiatum*.

### 2.3. REGISTRO DE POTENCIALES INTRACELULARES

Los registros intracelulares se llevaron a cabo mediante micropipetas de vidrio, rellenas con metilsulfato potásico 2 M. Las micropipetas de vidrio fueron obtenidas a partir de capilares de borosilicato (1,5 mm \* 86 mm 4" A-M Systems), estiradas con un estirador de pipetas (Sutter model P-87).

Las micropipetas se acoplaron a un amplificador (Axoclamp-2B, Axon Instruments, Foster City, CA). Los registros se obtuvieron de los somas de las células piramidales situados en el *stratum pyramidale* de CA1.

Sólo se consideraron aquellas células con un potencial de membrana en reposo estable ( $V_m$ ) y más negativo que -65mV. Además la resistencia interna mínima para ser consideradas en el estudio fue de (30 M $\Omega$ ).

### 2.4. ANÁLISIS DE DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS

La amplitud de la FV se midió desde la línea de base hasta el pico máximo negativo. La pendiente inicial del fEPSP se considera un buen indicador de la transmisión sináptica glutamatérgica. Ésta se calculó a partir de la fase inicial, en una ventana de 0,3 ms, con el fin de evitar contaminaciones de las respuestas con espigas poblacionales.

En el caso de la espiga poblacional, la amplitud se midió desde la línea basal hasta el pico máximo negativo.

Se consideró como línea basal de los fEPSP y de la espiga poblacional, los valores de la línea de base obtenidos entre 2 y 5 ms previos al artefacto de estimulación. Los trazos originales representados en las figuras de esta tesis corresponden a la media de 8 respuestas de pulsos consecutivos. Con el fin de comparar las variaciones en los potenciales, se obtuvo la media de los potenciales registrados durante el periodo control (previos a la utilización de los diferentes compuestos) durante 15-20 minutos, de manera que este promedio fue considerado el 100% y los resultados obtenidos en el resto del experimento fueron normalizados con respecto a este valor.

### 3. SOLUCIONES Y COMPUESTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

La composición de la solución KRB utilizada en la obtención y mantenimiento de las rodajas de hipocampo, así como en su perfusión durante los distintos experimentos fue (en mM): 119 NaCl; 26,2 NaHCO<sub>3</sub>; 2,5 KCl; 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,3 MgSO<sub>4</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub> y 11 glucosa. La solución fue burbujeada continuamente con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>), de manera que el pH se mantuvo en 7,4. La osmolaridad de la solución se midió diariamente, obteniendo valores entre 323-324 mOsm/L (Advanced Instruments Mod.3MO, Norwood, MA, USA). En aquellos experimentos en los que se utilizó colina, la osmolaridad de las soluciones que no contuvieron colina se compensaron añadiendo sacarosa con el fin de compensar las condiciones hipertónicas del medio. La osmolaridad de las distintas soluciones fue medida con un osmómetro.

En los registros en los que se añadió picrotoxina 100 µM, se utilizó un KRB modificado (4mM CaCl<sub>2</sub> y 4mM MgSO<sub>4</sub>). En estos experimentos, se realizó un corte con la ayuda de un bisturí entre CA3 y CA1 con el fin de romper la comunicación entre ambas áreas, y evitar las descargas espontáneas de tipo epiléptico producidas por la ausencia de inhibición.

En cuanto a los compuestos químicos utilizados en este trabajo: cloruro de colina, 5-hidroxi-indol (5-OH indol), hemicolinio-3, ((-)-Nicotina sal tartrato) nicotina, atropina, citicolina, picrotoxina y atropina se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los compuestos α-bungarotoxina, mecamilamina, *N*-(5-cloro-2,4-dimetoxifenil)-*N*-(5-metil-3-isoxazolil)-urea (PNU 120596), CGP 55845 y *N*-(3*R*)-1 Azabicyclo [2.2.2] oct-3-il- 4-clorobenzamida (PNU 282987) se obtuvieron de Tocris Bioscience (Bristol, UK). Metillicaconitina (MLA) y GTS-21 se adquirieron de Abcam Biochemicals (Madrid, España).

Todos los compuestos, excepto colina, que se disolvió directamente en la solución de perfusión, se prepararon en soluciones madre, que posteriormente se alicuotaron y congelaron para su almacenamiento. En el momento de su utilización se disolvieron en la solución de perfusión hasta alcanzar la concentración final.

Las soluciones madre de MLA, α-bungarotoxina, atropina, mecamilamina, nicotina, citicolina, GTS-21, atropina y picrotoxina se prepararon con agua destilada. Las soluciones madre de CGP 55845, PNU 282987, H89, 5-OH-indol y PNU 120596 se prepararon en dimetilsulfoxido (DMSO).



#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó el valor medio de los resultados individuales, con el fin de obtener la media y su error estándar en un número de rodajas (n), para cada condición experimental (media  $\pm$  EEM). Las medias se calcularon para cada minuto de experimento. Para cada condición experimental se utilizaron, al menos, tres animales.

Los trazos originales mostrados en este trabajo son la media de 8 respuestas correspondientes a estímulos consecutivos.

Para la obtención de las gráficas se utilizó el programa Sigma Plot 10.0 (Sytat Software, Illinois, EE.UU.). Las diferencias estadísticas entre las condiciones control y las diferentes condiciones experimentales se determinaron mediante una *t de Student*. Las diferencias se consideraron significativas con valores de  $p < 0,05$ .

El cálculo de la  $CI_{50}$  se realizó mediante un ajuste de los datos a una regresión no lineal mediante el programa Origin 7.0 (OriginLab).

# **RESULTADOS**

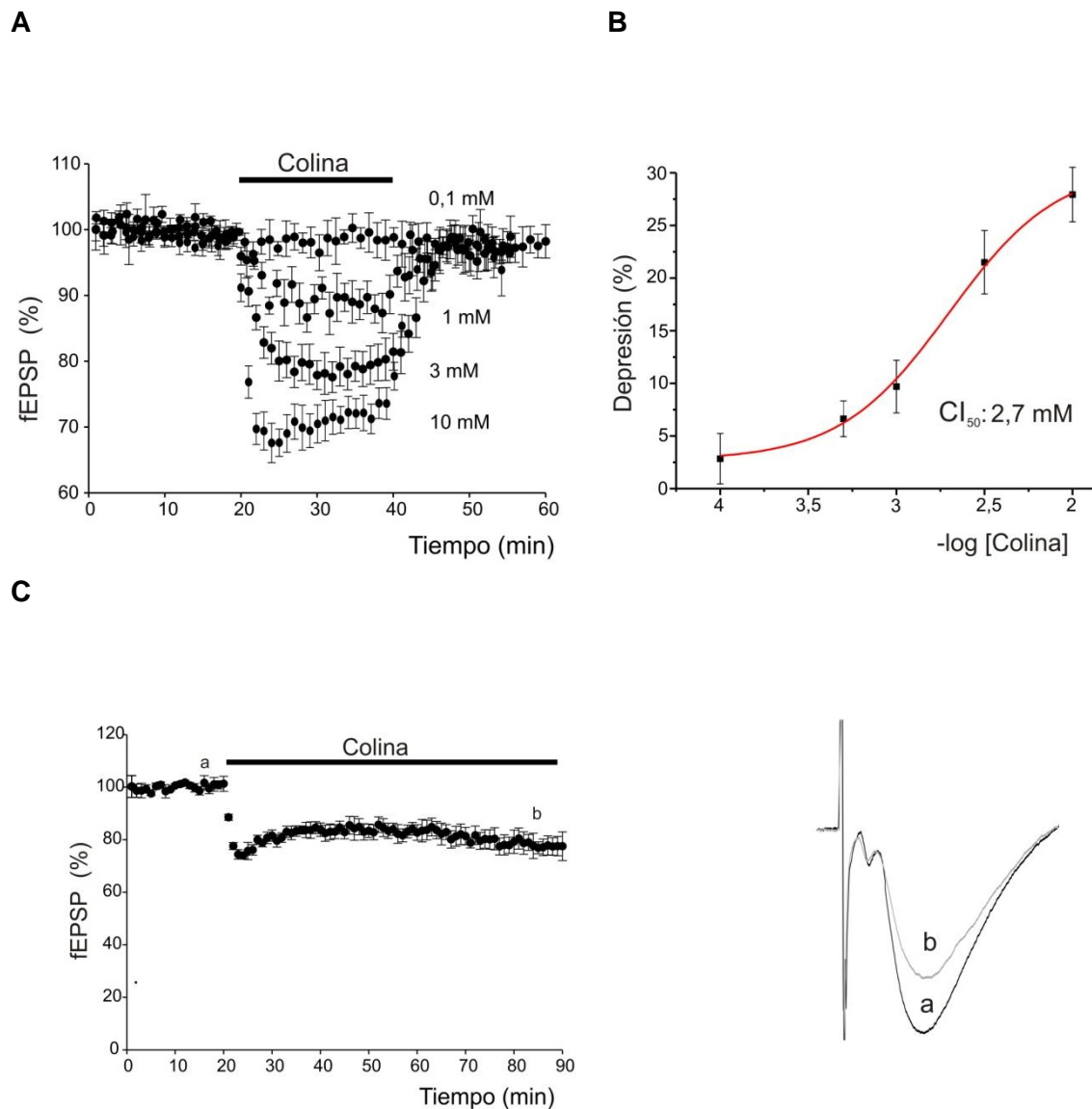
## 1. COLINA REDUCE LA EFICACIA DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

Como se ha descrito anteriormente, la existencia en el hipocampo de diferentes subtipos de receptores nicotínicos, tanto a nivel pre como postsináptico, da lugar a una modulación de la transmisión sináptica que va a venir determinada por su localización anatómica. Con el fin de estudiar la modulación ejercida por los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  sobre la transmisión sináptica glutamatérgica, utilizamos colina, un agonista selectivo de estos receptores.

Tras un periodo de estabilización de la señal de 20 minutos, añadimos colina (0,1; 0,5; 1; 3 y 10 mM) al líquido de perfusión, obteniendo como resultado una reducción dosis-dependiente del fEPSP. A cada rodaja se le aplicó una única concentración de colina. La reducción de la señal se caracterizó por producirse inmediatamente a la aplicación de colina, dando lugar a un pico inicial de bloqueo cuyo valor fue ligeramente menor al final de la aplicación (figura 22A). Cuando colina fue retirada del medio, el fEPSP volvió a los valores basales en aproximadamente 2-3 minutos. La reducción del fEPSP en los últimos 5 minutos de la aplicación de colina fue de  $3,8 \pm 2,4$  %;  $6,6 \pm 1,7$  %;  $9,7 \pm 2,5$  %;  $21,4 \pm 3,0$  % y  $28,3 \pm 2,6$  % en presencia de 0,1; 0,5; 1; 3; 10 mM de colina respectivamente. Con estos datos obtuvimos una curva concentración-respuesta y el ajuste de estos valores a una función sigmoidea mostró una concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) de 2,7 mM (figura 22B). En los experimentos llevados a cabo con colina 10 mM, la osmolaridad de la solución KRB se compensó añadiendo sacarosa 20 mM.

Con el fin de valorar si la aplicación prolongada de colina modifica el grado de bloqueo alcanzado, realizamos experimentos en los cuales las rodajas hipocampales fueron perfundidas en una solución con colina 10 mM durante 70 minutos.

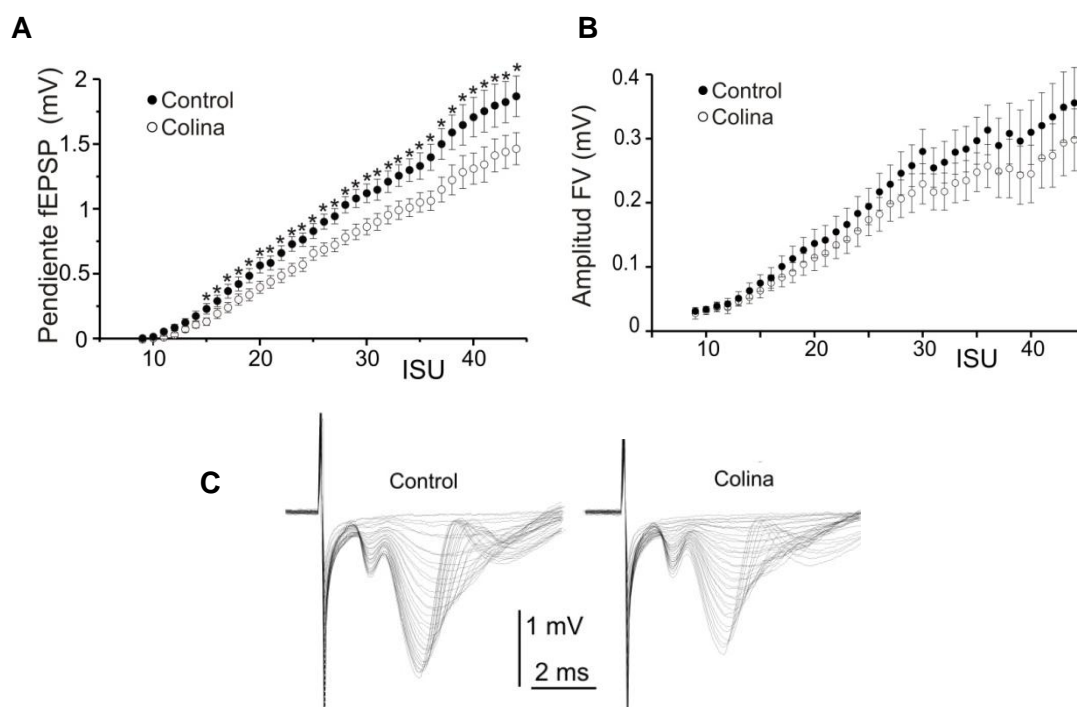
En presencia de colina se produjo una reducción de la señal que alcanzó un pico máximo en 1-2 minutos y que decreció en los siguientes 3-4 minutos. La reducción de la señal producida se mantuvo estable durante los siguientes 70 minutos, la reducción de la señal en el minuto 90 fue de  $23,5 \pm 3,3$  % (figura 22C).



**Figura 22. Colina deprime reversiblemente la transmisión sináptica en rodajas de hipocampo de rata.** La aplicación de varias concentraciones de colina produce una reducción del fEPSP. **(A)** Curso temporal en el que se representa la reducción en la pendiente del fEPSP ejercido por 20 minutos de aplicación de colina a diferentes concentraciones. El periodo entre dos estímulos fue de 15 segundos y cada uno de los puntos del curso temporal representa la media de las pendientes de los fEPSP obtenidos durante un minuto. **(B)** Curva concentración-respuesta en la que se representa la reducción de la pendiente del fEPSP obtenida tras la aplicación de diferentes concentraciones de colina. Los datos representan la media  $\pm$  EEM ( $n=4-8$ ). **(C)** Curso temporal de la pendiente del fEPSP en presencia de colina (10 mM) aplicada durante 70 minutos. Los datos representados en las gráficas A y C se obtuvieron tras la normalización con el valor medio obtenido en el periodo control y están expresados como media  $\pm$  EEM/ minuto en 6-9 experimentos.

La FV representa un potencial de acción sincrónico compuesto de las fibras aferentes como consecuencia a una estimulación y su tamaño está relacionado con el número de fibras reclutadas (Andersen *et al.*, 1978). Un cambio en el número de axones reclutados tras la aplicación de un estímulo puede provocar cambios en la misma dirección del número terminales que liberan glutamato y, por lo tanto, modificar el tamaño de los potenciales post-sinápticos.

Con el fin de comprobar si la reducción del fEPSP que se observa con colina está relacionada con una reducción en el número de fibras reclutadas, medimos la pendiente del fEPSP y la amplitud de la FV en un rango de intensidades de estimulación, tanto en condiciones control como en presencia de colina (figura 23). Los valores de estimulación oscilaron entre 20 y 50  $\mu$ A. La aplicación de colina 10 mM redujo la pendiente del fEPSP a todas las intensidades evaluadas (figura 23A) y, sin embargo, no modificó la amplitud de la FV, tal y como se puede observar en la figura 23B, donde no hay diferencias significativas en los valores obtenidos en condiciones control y en presencia de colina. Estos resultados sugieren que la reducción del fEPSP producido por colina no es consecuencia de una disminución en el número de axones reclutados.



**Figura 23. Colina produce una depresión del fEPSP que no afecta a la FV. (A)** Efecto de colina sobre el fEPSP a diferentes intensidades de estimulación. **(B)** Efecto de colina sobre la FV a diferentes intensidades de estimulación. **(C)** Trazos originales obtenidos a un intervalo de intensidades de estimulación (en la izquierda, condiciones control; en la derecha, trazos obtenidos tras 20 minutos de aplicación de colina 10 mM (n=20). \* $p < 0,05$ ,

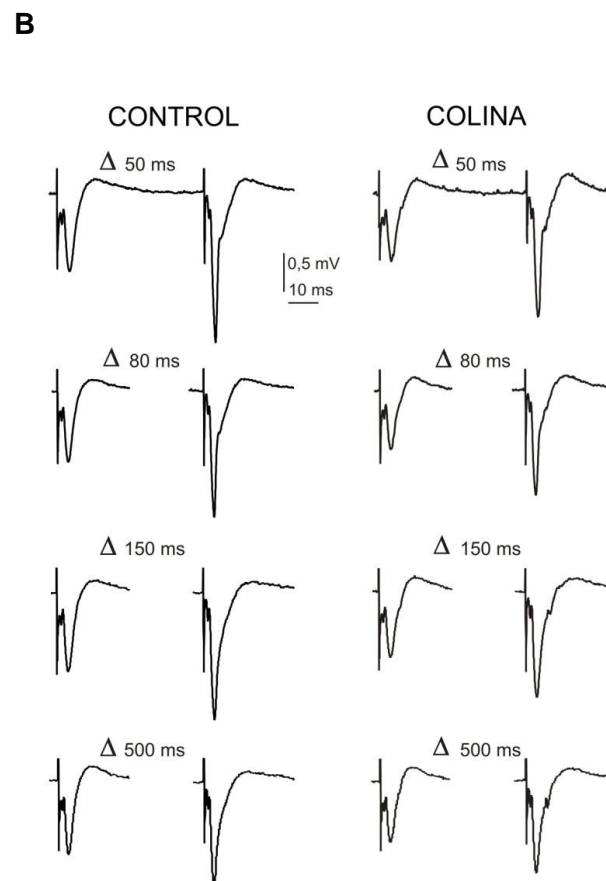
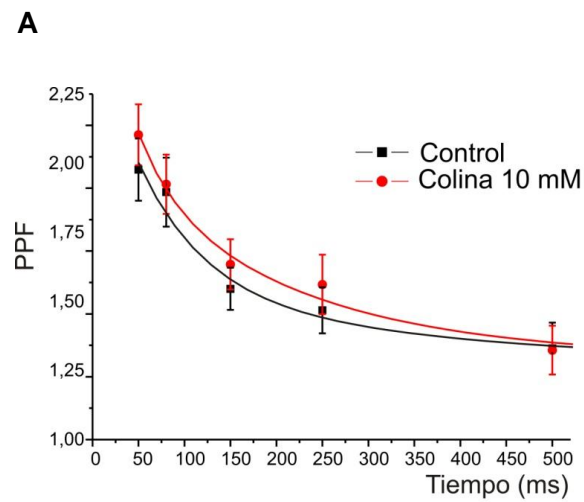
## **2. LA APLICACIÓN DE COLINA NO MODIFICA LA FACILITACIÓN INDUCIDA POR PARES DE PULSOS**

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo con el fin de averiguar si el efecto producido por colina sobre el fEPSP implicaba algún mecanismo presináptico capaz de ser detectado con un protocolo de facilitación por pares de pulsos (PPF) (Manabe *et al.*, 1993).

La facilitación por pares de pulsos (*paired pulse facilitation* (PPF)) se da como consecuencia de una modulación en la liberación de neurotransmisor, ya que los niveles de calcio que quedan residuales en la terminal sináptica tras el primer estímulo no ha desaparecido cuando llega el segundo, provocando un aumento de la probabilidad de liberación del neurotransmisor y, por lo tanto, una respuesta postsináptica mayor (Zucker y Regehr, 2002) (figura 24).

El protocolo consiste en la aplicación, cada 15 segundos, de dos estímulos idénticos separados por un intervalo de 50-500 ms. El cociente de la amplitud de la segunda respuesta partido por la primera (ratio de facilitación) es un reflejo del incremento en la probabilidad de liberación de neurotransmisor. Si el cociente es igual o cercano a 1, significa que no ha habido facilitación (Bliss *et al.*, 2007).

Como se puede observar en la figura 24B, la aplicación de colina produce una reducción del fEPSP tanto en el estímulo 1 como en el estímulo 2 y ambos son proporcionales, de aproximadamente un 25% en todos los intervalos. Por lo tanto, el ratio de facilitación no se ve modificado por la aplicación de colina (10 mM), respecto a las condiciones control ( $p > 0,05$ ). Estos datos sugieren que el mecanismo por el que colina ejerce una depresión de la respuesta sináptica no estaría relacionado con los mecanismos presinápticos.



**Figura 24. Efecto de colina sobre la facilitación por pares de pulsos (PPF).** (A) Representación de la PPF frente al intervalo de estimulación, donde la línea negra representa el ajuste a una exponencial decreciente de la facilitación en condiciones control y la línea roja la obtenida tras la aplicación de colina 10 mM. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 10 rodajas. (B) Trazos originales de los fEPSPs obtenidos tras el par de estímulos tanto en condiciones control como en presencia de colina (10 mM, 20 minutos), con indicación del intervalo de estimulación aplicado.

### **3. COLINA PRODUCE UN INCREMENTO DE LA ESPIGA POBLACIONAL**

La estimulación eléctrica de las fibras colaterales de Schaffer produce una activación de sinapsis excitadoras, capaces de generar potenciales de acción en las células piramidales de la región CA1, cuyos disparos sincrónicos dan lugar a una espiga poblacional. A diferencia de lo que ocurre con los potenciales generados por una única neurona, la espiga poblacional no responde a la ley del “todo o nada”, sino que se trata de una respuesta graduada, de manera que a medida que aumenta el estímulo, el número de neuronas que descargan es mayor y, como consecuencia, la espiga poblacional aumenta su tamaño.

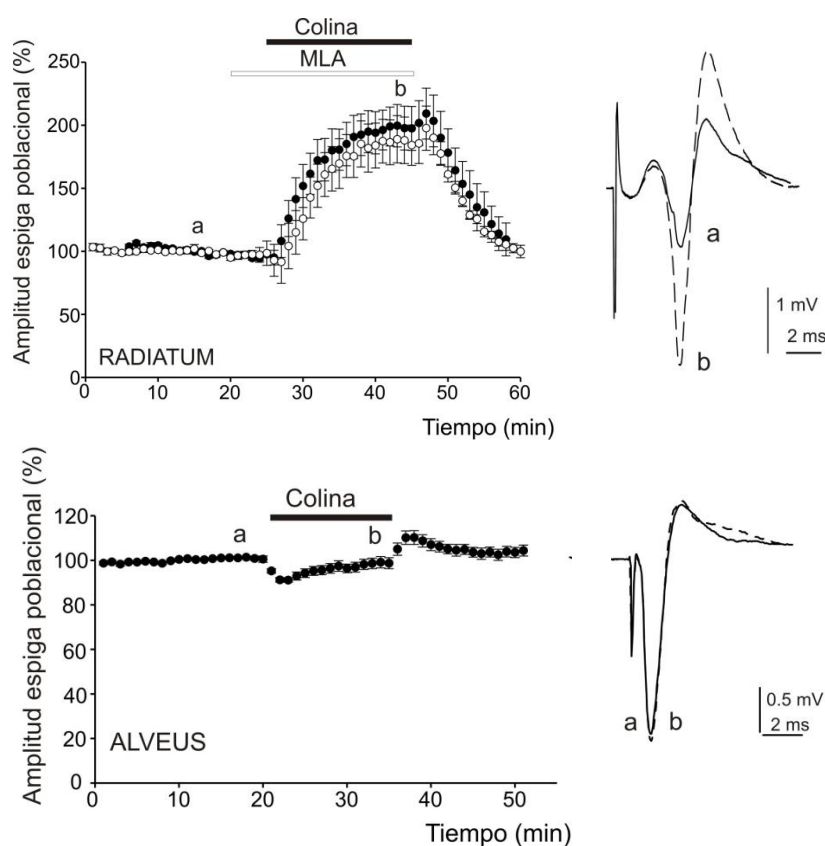
La liberación de glutamato actúa sobre los receptores presentes en las dendritas de las neuronas piramidales de CA1. Como consecuencia se generan corrientes, a través de las membranas postsinápticas, que fluyen proximal y distalmente a la región sináptica y que pasan a ser corrientes de salida en regiones como el soma. En el caso de la espiga poblacional la situación es la inversa, ya que la corriente de entrada se encuentra en el soma neuronal y, sin embargo, la corriente de salida se localiza en las dendritas.

Puesto que el efecto de colina no parece ser presináptico, nos planteamos si su acción postsináptica conlleva una disfunción de la excitabilidad neuronal. Para ello, valoramos el efecto de colina sobre las espigas poblacionales registradas en el *stratum pyramidale* y provocadas tanto por estimulación ortodrómica, del *stratum radiatum*, como por estimulación antidrómica, del *stratum alveus* (figura 25). Tal y como se puede observar en los trazos originales de la figura, en la espiga poblacional obtenida por estimulación ortodrómica aparece un periodo de latencia previo como consecuencia de la sinapsis que se da entre las fibras de las colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales de la región CA1. Sin embargo, en la espiga obtenida por estimulación antidrómica no se observa este periodo de latencia ya que en su obtención no media un proceso sináptico.

Tras un periodo basal de estabilización de 20 minutos, la aplicación de colina 10 mM provocó un incremento progresivo en la amplitud de la espiga poblacional generada por estimulación ortodrómica, alcanzando un valor de  $190,4 \pm 16,4$  % respecto al valor basal, tras 20 minutos. La amplitud media de las espigas en condiciones control fue de  $2,3 \pm 0,2$  mV y alcanzaron los  $4,4 \pm 0,3$  mV en presencia de colina (figura 25A). Una vez la colina fue retirada del medio, las espigas poblacionales volvieron a sus valores control tras 15-20 minutos de lavado. La intensidad utilizada para el registro fue un 20% de la intensidad a la que se obtuvo la respuesta máxima.

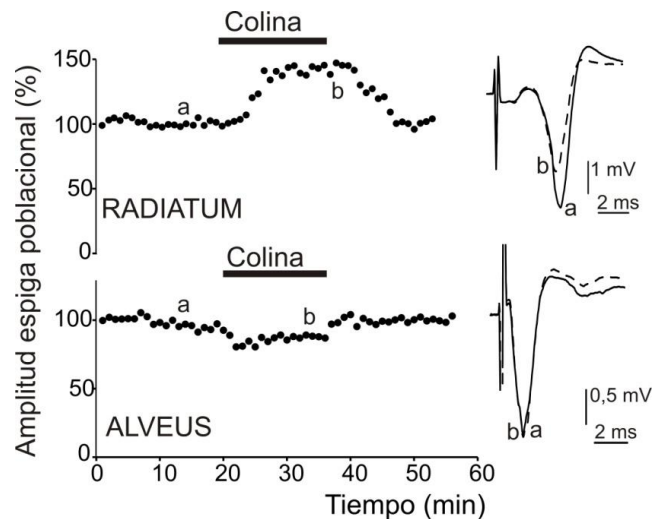


Con el fin de evitar la activación de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , se llevaron a cabo experimentos en los que las rodajas fueron tratadas con MLA 100 nM, previamente a la perfusión de colina. Sorprendentemente, la presencia de MLA no modificó la potenciación ejercida por colina. En presencia de colina y MLA la potenciación obtenida fue un  $186,4 \pm 18,1$  % respecto al valor obtenido en el periodo basal (figura 25A). Sin embargo, cuando la espiga poblacional fue provocada antidrómicamente mediante la estimulación del *stratum alveus*, donde se localizan los axones de las neuronas piramidales, la aplicación de colina 10 mM durante 15 minutos apenas modificó la amplitud de la espiga poblacional. La amplitud media de las espigas fue de  $2,0 \pm 0,2$  mV y de  $1,9 \pm 0,2$  mV en condiciones control y en presencia de colina respectivamente (figura 25B).



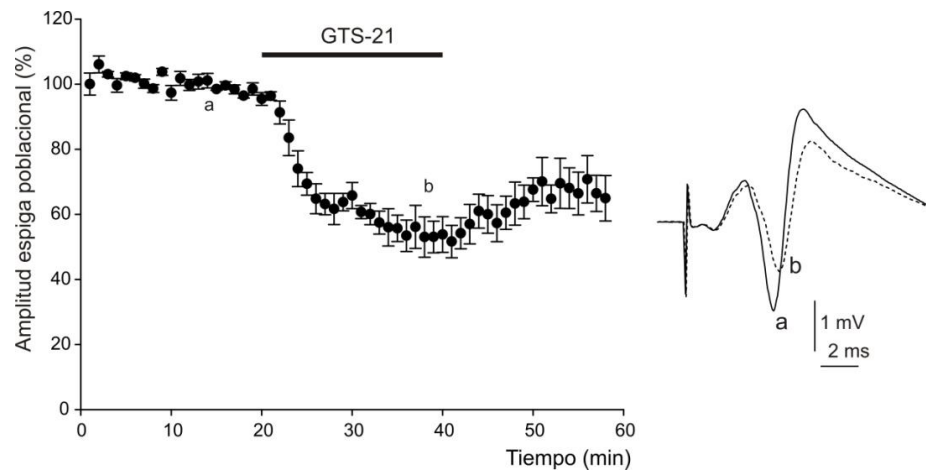
**Figura 25. Efecto de colina sobre la espiga poblacional. (A)** Cursos temporales donde se muestran las amplitudes medias de la espiga poblacional provocadas por la estimulación en el *stratum radiatum*. La aplicación de colina produce una potenciación de la amplitud, que revierte tras su eliminación del medio de perfusión. La presencia de MLA 100 nM (círculos blancos) no revierte la potenciación ejercida por colina. El trazo original representativo muestra la espiga poblacional en condiciones control (a) y en presencia de colina (b). **(B)** Curso temporal que representa las amplitudes medias de la espiga poblacional provocada antidrómicamente por la estimulación en el *stratum alveus*. La aplicación de colina no modifica la amplitud de la espiga (n=6-11).

A continuación se puede observar un ejemplo de los cursos temporales obtenidos en una rodaja donde simultáneamente se estimuló de forma alterna en *stratum radiatum* y en *stratum alveus*, con registro en el *stratum pyramidale*. La perfusión de colina 10 mM produce una potenciación de la espiga poblacional tras la estimulación del *stratum radiatum* que, en cambio, tras la estimulación del *stratum alveus* no se observa (figura 26).



**Figura 26. Estimulación simultánea en el *stratum radiatum* y en el *stratum alveus* con registro en el *stratum pyramidale*.** La aplicación de colina 10 mM durante el tiempo indicado en la barra horizontal, produjo una potenciación de la espiga poblacional obtenida como consecuencia de la estimulación en el *stratum radiatum* y, sin embargo, la espiga poblacional obtenida antidrómicamente por la estimulación en el *stratum alveus* no se vio modificada.

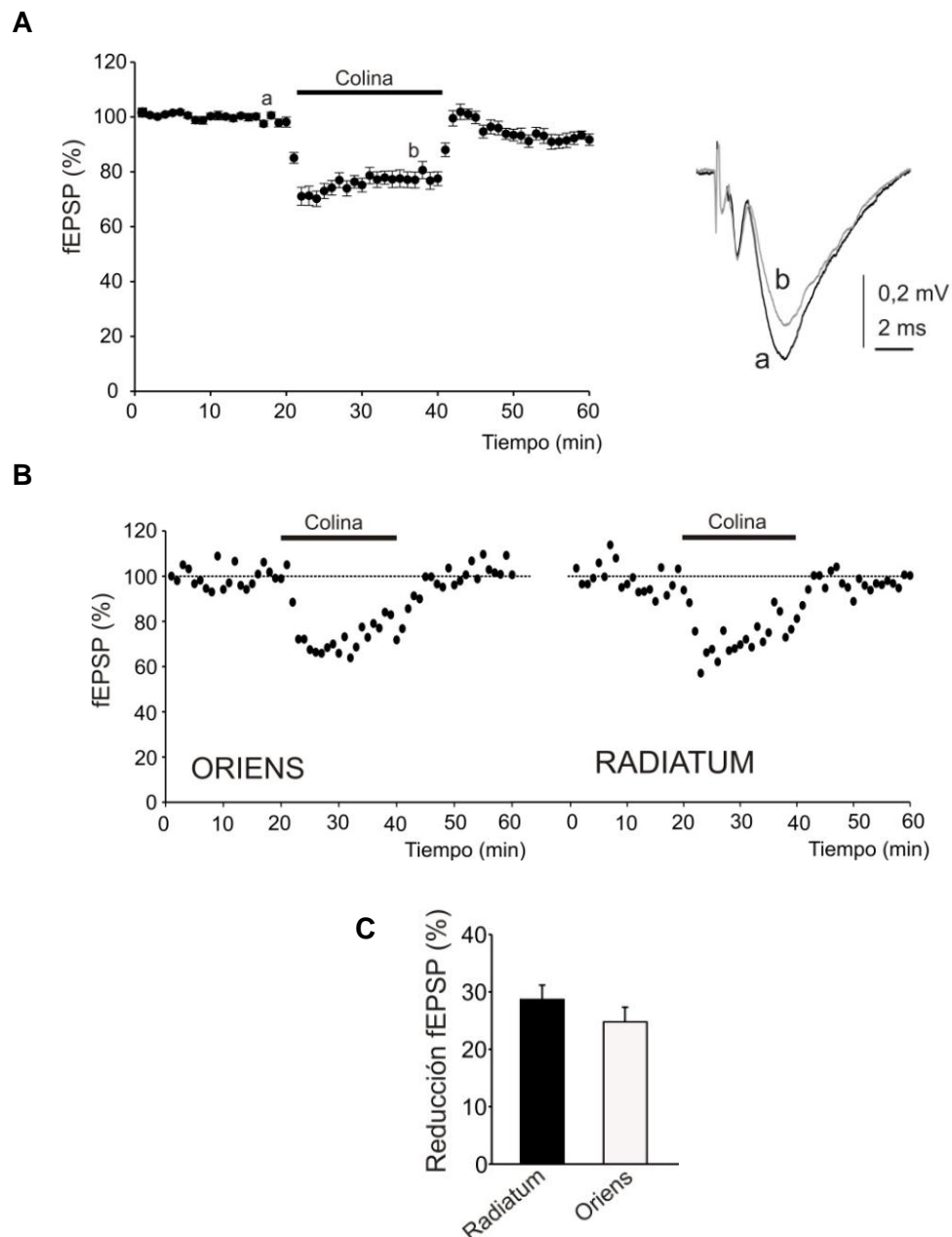
A la vista del efecto dual ejercido por colina sobre la espiga poblacional provocada por una estimulación ortodrómica, se estudió si la aplicación de GTS-21 (30  $\mu$ M), un agonista selectivo de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  (Briggs *et al.*, 1997), producía el mismo efecto. La espiga poblacional se obtuvo por la estimulación en el *stratum radiatum* y el registro en el *stratum pyramidale*. Los experimentos llevados a cabo mostraron que, sorprendentemente, tras un periodo basal de estabilización, la aplicación de GTS-21 durante 20 minutos produce una reducción de la amplitud media de la espiga poblacional de un  $45,7 \pm 5,1$  %, que no retornó a sus valores control una vez el compuesto fue retirado del medio. Los experimentos fueron realizados a un 30-40 % de la intensidad máxima (figura 27).



**Figura 27. Efecto de GTS-21 sobre la espiga poblacional.** Curso temporal en el que se representa la amplitud media de la espiga poblacional provocada por la estimulación en el *stratum radiatum*. La aplicación de GTS-21 produce una reducción de la amplitud de la espiga poblacional que no revierte tras su eliminación del medio. El trazo original representativo muestra la espiga poblacional en condiciones control (a) y en presencia de GTS-21 (30  $\mu$ M) (b) (n=4).

#### **4. EFECTO DE COLINA SOBRE EL fEPSP REGISTRADO EN EL STRATUM ORIENS**

Como se ha mostrado anteriormente, la aplicación de colina produce una depresión de las respuestas sinápticas a nivel de las dendritas apicales de las neuronas piramidales localizadas en CA1 (*stratum radiatum*). Con el fin de determinar si este efecto también se produce tras la estimulación de las dendritas basales de las neuronas piramidales, se llevaron a cabo experimentos en los que se registró el fEPSP obtenido en el *stratum oriens* como consecuencia de la estimulación eléctrica de las colaterales de Schaffer (figura 28). Como se puede observar en la figura 28, tras 20 minutos de estabilización, la aplicación de colina 10 mM produjo una reducción del fEPSP de  $25,0 \pm 2,5$  % en el *stratum oriens*. La cinética con la que colina ejerce este efecto sobre la transmisión sináptica es similar a la obtenida en el *stratum radiatum*. Tras 20 minutos de aplicación de colina, ésta fue retirada del medio de perfusión de manera que el fEPSP volvió a sus valores control tras 20 minutos de lavado. Por otro lado, también se realizaron experimentos en los que se registraron fEPSP obtenidos simultáneamente en el *stratum oriens* y el *stratum radiatum* mediante la doble estimulación en ambas capas, de un modo similar al descrito en el apartado anterior, de forma que se obtuvo registros en ambas zonas mediante una estimulación alterna.



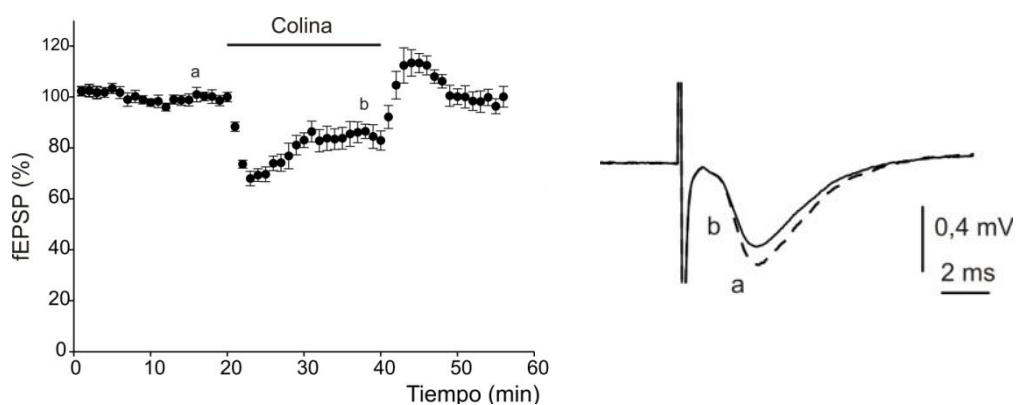
**Figura 28. Colina produce una depresión de la transmisión sináptica en *stratum oriens*.** (A) Tras un periodo de estabilización, la aplicación de colina 10 mM, durante el tiempo indicado en la barra horizontal, produce una depresión de la transmisión sináptica en el *stratum oriens* de la región CA1. El trazo original representa los periodos indicados con las letras (a) y (b) (12 experimentos). (B) Cursos temporales obtenidos tras una doble estimulación en el *stratum oriens* (izquierda) y *stratum radiatum* (derecha) de forma simultánea, en una misma rodaja. La aplicación de colina 10 mM durante el tiempo indicado en las barras superiores produjo una reducción del fEPSP sin diferencias significativas entre ambas regiones. (C) El histograma muestra la reducción producida tras la aplicación de colina en ambas regiones.

## 5. COLINA MODULA LA NEUROTRANSMISIÓN EN EL GIRO DENTADO

En la capa molecular del giro dentado se sitúan tanto las dendritas proximales de las células granulares como las fibras de la vía perforante procedente de la corteza entorrinal. Estas fibras son las encargadas de transmitir la información sensorial procedente de la corteza al giro dentado, constituyendo la primera etapa del circuito trisináptico.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la distribución de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  en las células glutamatérgicas hipocampales todavía no se conoce con exactitud y los diferentes trabajos publicados hasta la fecha muestran resultados contradictorios. Es posible que el efecto de colina sobre la transmisión sináptica sea distinto en las células granulares presentes en el giro dentado, por lo que se estudió el efecto de colina sobre el fEPSP, obtenido como consecuencia de la estimulación y registro en el *stratum moleculare* del giro dentado, donde tienen lugar las sinapsis entre fibras de la vía perforante y las dendritas de las células granulares.

Tras un periodo de estabilización de la señal de 20 minutos, se añadió colina 10 mM al medio, obteniéndose como consecuencia una reducción del fEPSP de un  $15,2 \pm 4,0$  %, valor inferior al obtenido en el *stratum radiatum*, donde la reducción del fEPSP fue de un  $28,3 \pm 2,6$  %. Una vez colina fue retirada del líquido de perfusión, el fEPSP volvió rápidamente a sus valores basales tras 15 minutos de lavado (figura 29).



**Figura 29. Reducción del fEPSP en el giro dentado como consecuencia de la aplicación de colina.** La aplicación de colina 10 mM durante 20 minutos produce una reducción en la pendiente del fEPSP, obtenido como consecuencia de la estimulación y el registro en *stratum moleculare* del giro dentado (n=6). El trazo original representa los periodos indicados con las letras a (control) y b (colina).

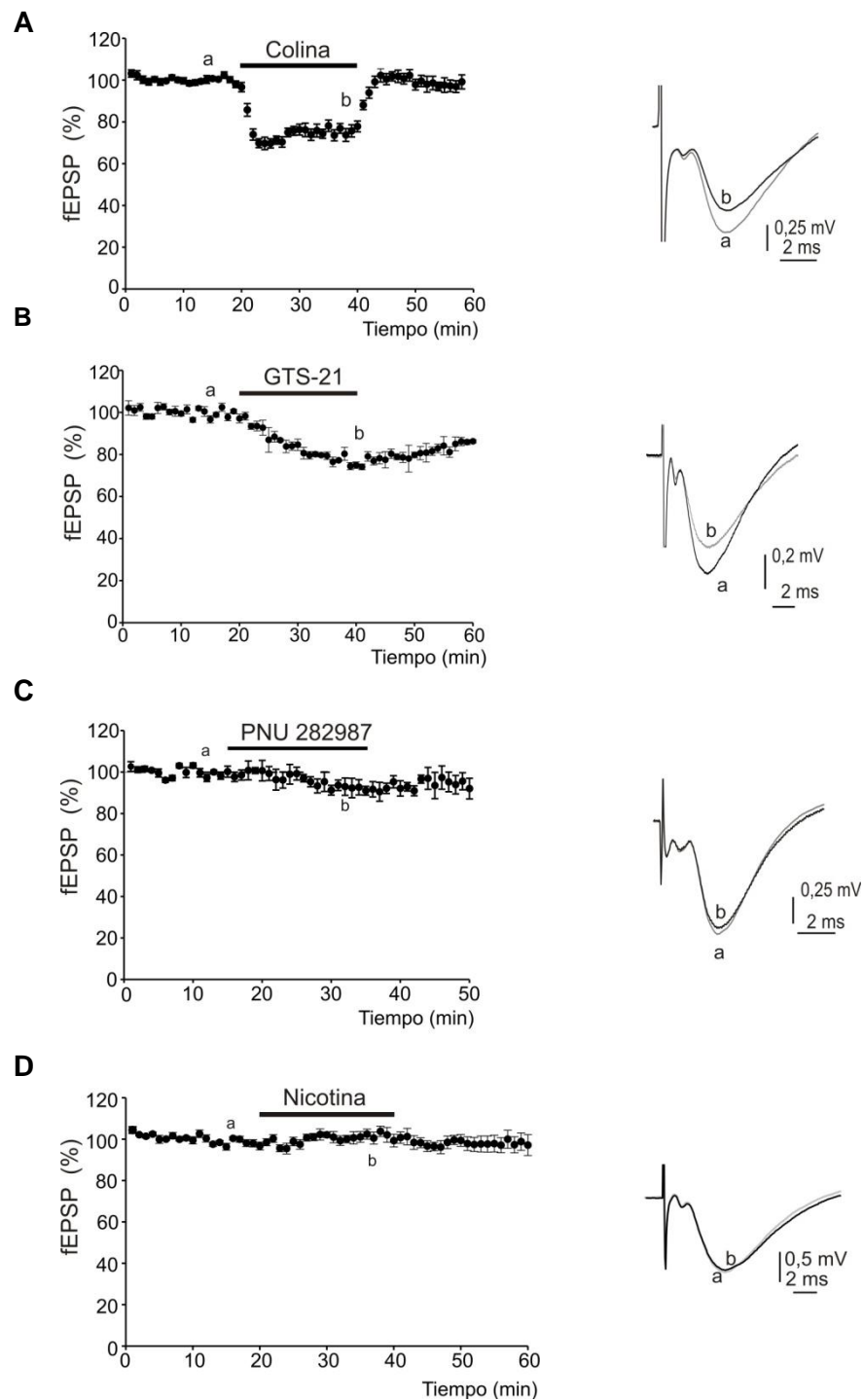
## 6. EFECTO DE AGONISTAS NICOTÍNICOS SOBRE EL fEPSP

Ante las dudas suscitadas por los resultados obtenidos en los experimentos con GTS-21 y la espiga poblacional y con el fin de confirmar que el efecto de colina está mediado por el receptor nicotínico  $\alpha_7$ , decidimos tratar las rodajas con diversos agonistas de este subtipo de receptor. Los fEPSP fueron obtenidos por estimulación y registro en el *stratum radiatum*.

La aplicación de colina 10 mM durante 20 minutos produjo una inhibición del fEPSP de un  $24,7 \pm 2,4$  %, que se estabilizó aproximadamente a los 3 minutos de perfusión y permaneció constante durante todo el tiempo que colina estuvo presente en el medio (figura 30A). El fEPSP volvió rápidamente a los valores basales cuando colina se retiró del medio.

En otro grupo de rodajas, la aplicación de GTS-21 (30  $\mu$ M), agonista selectivo de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  (Briggs *et al.*, 1997), también produjo una reducción del fEPSP de un  $23,3 \pm 1,2$  %. En este caso observamos que la reducción del fEPSP se produjo de forma más lenta, la señal tardó más en estabilizarse y la reversión del efecto tras la retirada del compuesto fue muy lenta e incompleta (figura 30B). Sorprendentemente, el tratamiento de las rodajas con otro agonista selectivo  $\alpha_7$  como PNU 282987 (30  $\mu$ M) (Hajós *et al.*, 2004; Bodnar *et al.*, 2005) no modificó el fEPSP durante los 20 minutos que fue añadido al medio (figura 30C).

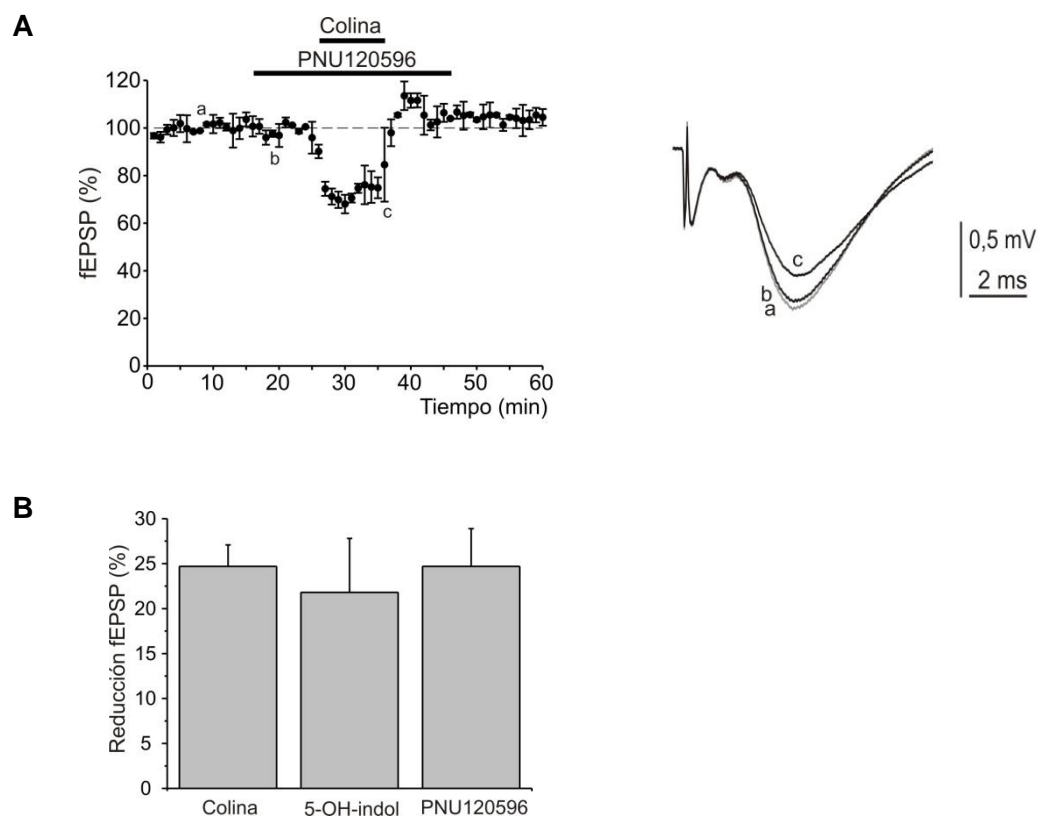
En vista a este último resultado, se decidió utilizar nicotina (100  $\mu$ M), por tratarse de un agonista no selectivo de los receptores nicotínicos. En este caso tampoco produjo ningún efecto sobre el fEPSP (figura 30D).



**Figura 30. Acción de agonistas nicotínicos sobre el fEPSP registrado en el *stratum radiatum*.** Cursos temporales medios en los que se pueden observar los cambios sobre los fEPSP inducidos por la aplicación de **(A)** Colina 10 mM, **(B)** GTS-21 30  $\mu$ M, **(C)** PNU 282987 30  $\mu$ M y **(D)** Nicotina 100  $\mu$ M. Tras un periodo basal de estabilización, se aplicaron los agonistas durante el tiempo indicado en la barra negra superior. Los trazos originales representativos mostrados están tomados de los tiempos indicados como a (control) y b (colina) en los cursos temporales (6-9 experimentos).

## 7. LA APLICACIÓN DE MODULADORES ALOSTÉRICOS DEL RECEPTOR NICOTÍNICO NO MODIFICA EL EFECTO PRODUCIDO POR COLINA

Estudiamos el efecto producido por colina en presencia de distintos moduladores alostéricos con el fin de obtener más información acerca del mecanismo por el cual colina produce una reducción del fEPSP. Tras un periodo basal de estabilización, las rodajas se trataron con los moduladores alostéricos durante los 10 minutos previos a la aplicación de colina. El pretratamiento con PNU120596 (10  $\mu$ M) (figura 31A), modulador alostérico selectivo de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  (Hurst *et al.*, 2005) no modificó el efecto producido por colina sobre el fEPSP ( $24,7 \pm 2,4$  % y  $24,7 \pm 4,2$  % en ausencia y en presencia de PNU120596, respectivamente). Además, el pretratamiento con otro modulador alostérico selectivo de los receptores  $\alpha_7$  como es el 5-OH-indol (500  $\mu$ M) (Zwart *et al.*, 2002) no produjo una potenciación del efecto de colina sobre el fEPSP ( $21,81 \pm 6,1$  %) (Figura 31B).



**Figura 31. El pretratamiento con moduladores alostéricos no modifica el efecto ejercido por colina sobre el fEPSP. (A)** Curso temporal medio del efecto de colina en presencia de PNU120596 (10  $\mu$ M) durante el tiempo indicado por la barra horizontal. **(B)** Histograma que muestra la reducción del fEPSP en presencia de 5-OH-indol (500  $\mu$ M) y PNU120596. En el histograma, las barras representan la media  $\pm$  EEM de los fEPSP registrados en los 5 últimos minutos de aplicación del compuesto. (n=7-10).



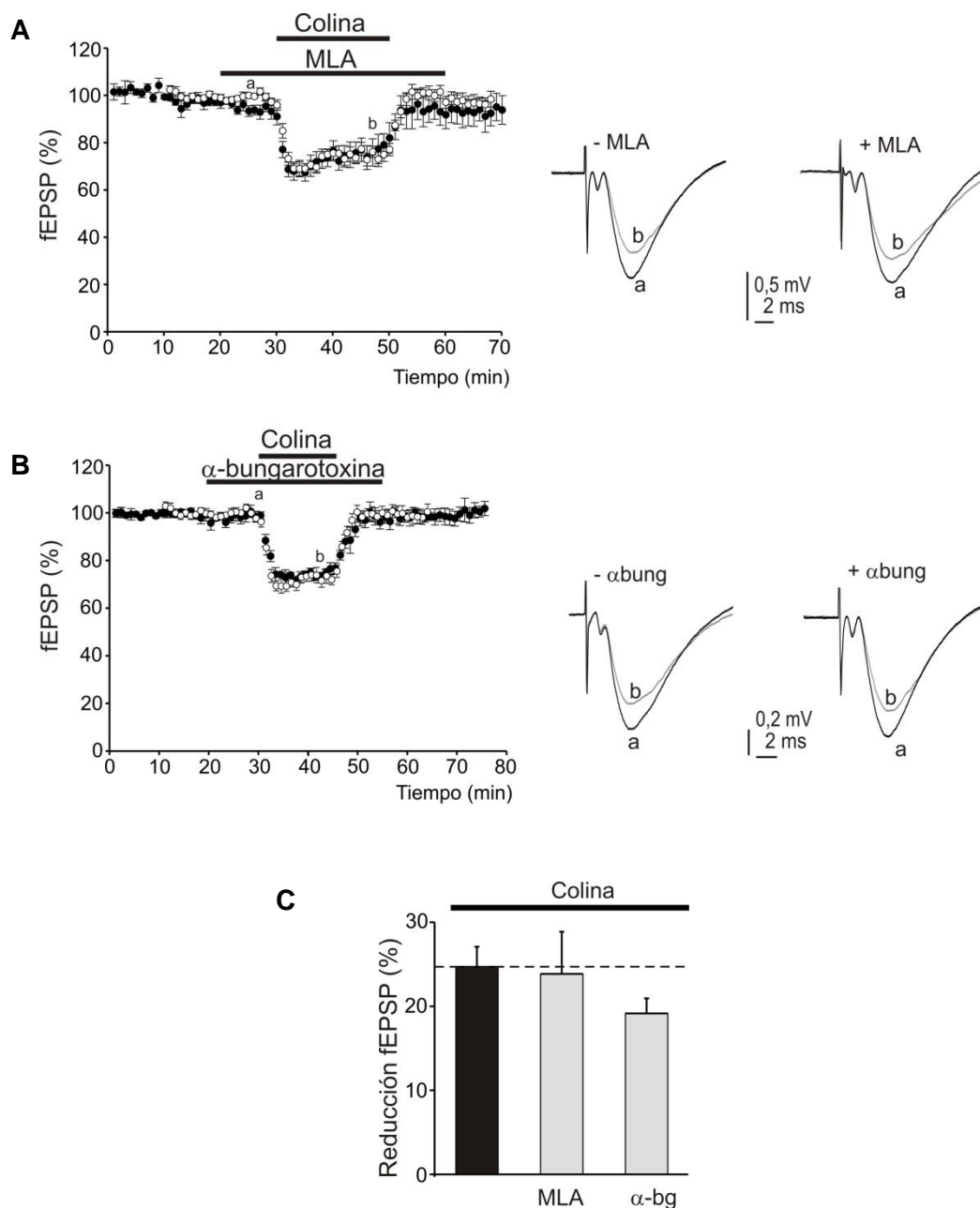
## **8. EL EFECTO PRODUCIDO POR COLINA NO SE PREVIENE CON ANTAGONISTAS NICOTÍNICOS**

En vista a los resultados anteriores, en los que colina produce una reducción del fEPSP que no parece reproducirse con otros agonistas nicotínicos, decidimos llevar a cabo un estudio farmacológico de mayor profundidad, utilizando diferentes antagonistas de los receptores nicotínicos.

Éstos fueron incluidos en el líquido de perfusión 10 minutos antes del tratamiento con colina 10 mM y se mantuvieron en presencia del agonista  $\alpha_7$ . Los antagonistas selectivos de los receptores  $\alpha_7$ , metilcaconitina (MLA 100 nM) y  $\alpha$ -bungarotoxina (100 nM), no modificaron los fEPSP por sí mismos, en ausencia de colina, lo que indica una ausencia de efecto tónico colinérgico que module la transmisión sináptica, pero tampoco revirtieron la inhibición producida por colina durante el tiempo que estuvo presente en el medio (figuras 32A y 32B). El porcentaje de reducción de los fEPSP producidos por colina en presencia de MLA y bungarotoxina fue de  $23,8 \pm 5,0 \%$  y  $19,1 \pm 1,8 \%$  respectivamente ( $p > 0,05\%$  si se compara con la reducción obtenida por colina sola ( $24,7 \pm 2,4\%$ ) (Figura 32C).

Dado que los antagonistas selectivos del receptor nicotínico  $\alpha_7$  no consiguieron revertir la depresión del fEPSP observada con colina, decidimos utilizar otros compuestos. Un grupo de rodajas fueron pretratadas con mecamilamina (30  $\mu$ M), un antagonista no selectivo de los receptores nicotínicos. La presencia del antagonista no selectivo no consiguió revertir el efecto de colina.

A la vista de los resultados obtenidos con los diferentes antagonistas nicotínicos, los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  no parecen estar implicados en el efecto de colina, por lo que decidimos utilizar otras herramientas farmacológicas.

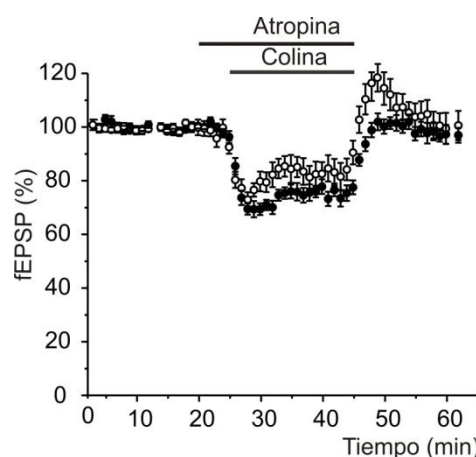


**Figura 32. Descripción farmacológica del efecto de colina sobre el fEPSP.** Tras un periodo de estabilización, se aplicaron los distintos compuestos durante el tiempo representado en las barras horizontales. **(A)** Cursos temporales de fEPSP a los que se aplicó colina y pertenecientes a rodajas a las que previamente a la aplicación de colina se les sometió a un pretratamiento con MLA (100 nM). **(B)** Mismas condiciones que (A) pero con pretratamiento de  $\alpha$ -bungarotoxina (100 nM). El trazo original se obtuvo en los periodos representados con las distintas letras a (control), b (compuesto), c (lavado). **(C)** Histograma en el que se representa la depresión media de la pendiente del fEPSP producida por el tratamiento con colina (10 mM), sola o tras el pretratamiento con MLA (100 nM) o con  $\alpha$ -bungarotoxina (100 nM) (n=7-9). Las barras representan la media  $\pm$  EEM de los fEPSP registrados en los 5 últimos minutos de aplicación de los compuestos.

## 9. LA APLICACIÓN DE ATROPINA NO MODULA EL EFECTO EJERCIDO POR COLINA

Algunos autores han descrito que colina activa los receptores muscarínicos de tipo  $M_3$ . Este subtipo de receptor se encuentra acoplado a un canal de  $K^+$  a través de una proteína  $G_q$ , por lo que su activación da lugar a una corriente de  $K^+$  (Shi et al., 1999; Shi et al., 2004). En estos trabajos se describe cómo colina activa este subtipo de receptor en células cardíacas de mamífero, de forma similar a la que lo hace la pilocarpina. En el hipocampo este subtipo de receptor se encuentra fundamentalmente en neuronas piramidales, con menor expresión en las células granulares del giro dentado (Levey et al., 1995; Tayebati et al., 2002; Andersen et al., 2007).

En vista a estas observaciones, decidimos estudiar si el efecto de colina se debe a una activación de este subtipo de receptor muscarínico. Para ello utilizamos un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos, atropina ( $50 \mu\text{M}$ ), previamente y durante la aplicación de colina  $10 \text{ mM}$ . Tras un periodo de estabilización de la señal, la aplicación de atropina por sí sola no varió la pendiente del fEPSP. Sin embargo, cuando se añadió colina al medio, esta provocó una reducción de la señal, de  $20,2 \pm 2,7 \%$ . Tras 20 minutos de aplicación, ambos compuestos fueron retirados del medio y la señal volvió a sus valores basales. La reducción de la señal que observamos en presencia de colina y atropina no muestra diferencias significativas respecto a los valores obtenidos tras la aplicación de colina ( $24,29 \pm 0,9 \%$ ). Estos resultados nos indican que el efecto de colina no está relacionado con la activación de receptores muscarínicos  $M_3$ .



**Figura 33. Efecto de la aplicación de atropina sobre la reducción del fEPSP ejercida por colina.** Curso temporal en el que se puede observar el efecto producido por la aplicación de colina sobre el fEPSP en presencia de atropina durante el tiempo indicado por las barras horizontales (n=5).

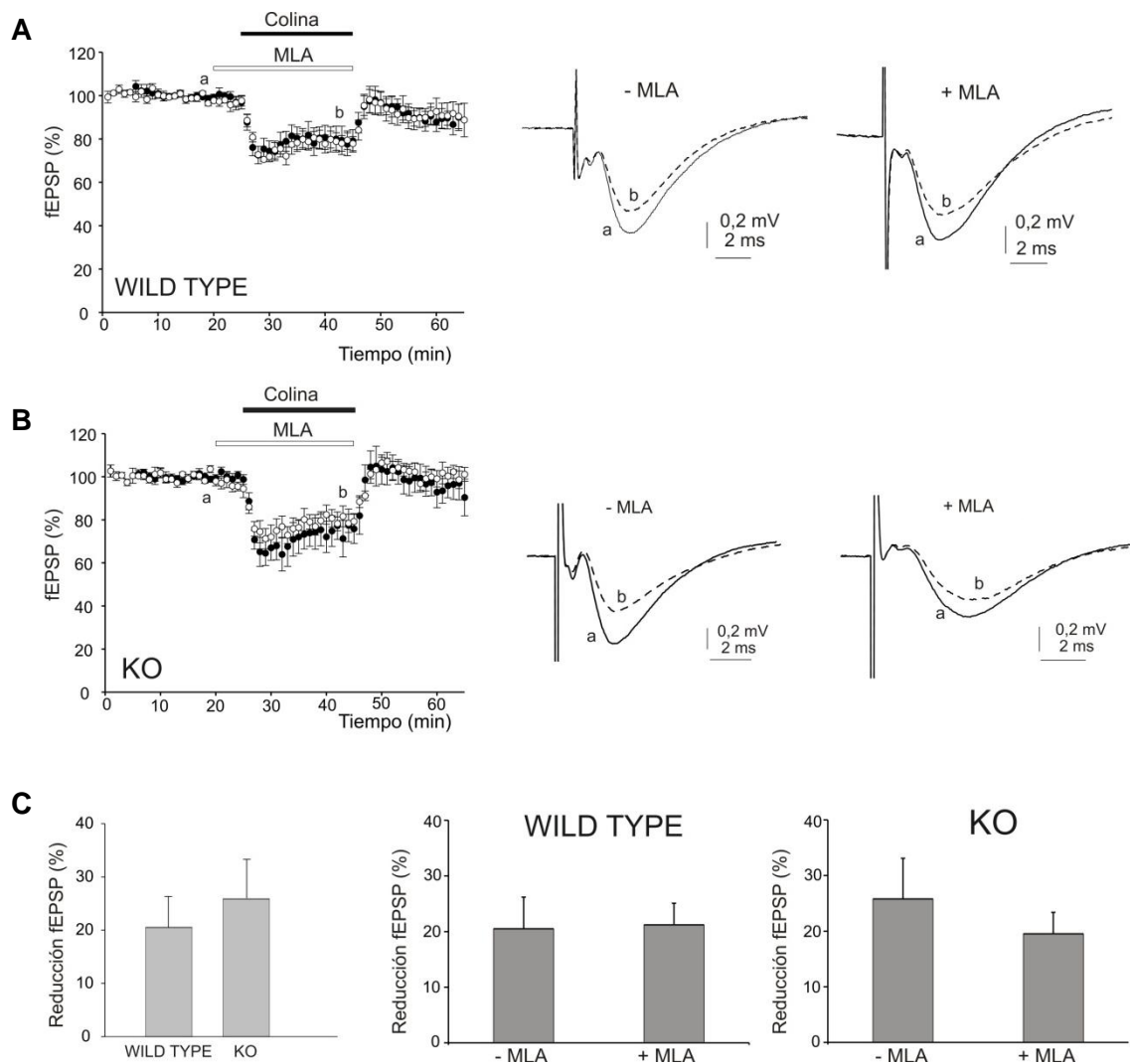
## **10. EFECTO DE COLINA EN RODAJAS HIPOCAMPALES DE RATONES *KNOCK-OUT* PARA EL RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha_7$**

Basándonos en los resultados obtenidos, en los cuales parece que colina produce una reducción de la respuesta sináptica a través de un mecanismo independiente de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , y con el fin de corroborar esta hipótesis, decidimos estudiar un modelo experimental distinto: ratón *knock-out* para la subunidad  $\alpha_7$  del receptor nicotínico.

El ratón mutante que carece de este tipo de subunidad no presenta sitios de unión para  $\alpha$ -bungarotoxina ni las corrientes nicotínicas rápidas atribuibles a los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ . Sin embargo, se considera que, en general, manifiesta un comportamiento normal (Orr-Urtreger *et al.*, 1997; Morley y Rodríguez-Sierra, 2004).

Inicialmente se determinó el efecto de colina 10 mM en la transmisión sináptica glutamatérgica de ratón *wild type*. En un primer grupo de experimentos, tras un periodo de estabilización en la que se consiguió una basal de fEPSP estables durante 20 minutos, la aplicación de colina 10 mM provocó una rápida reducción de la pendiente de los fEPSP, que llegó a un máximo a los 2-3 minutos de aplicación, seguida de un periodo de lenta recuperación, que culmina con una estabilización de la señal con un valor de bloqueo de  $20,5 \pm 5,7$  % tras 20 minutos de aplicación de colina (figura 34A). Una vez colina fue retirada del medio de perfusión, las respuestas volvieron rápidamente a los valores basales (2-3 minutos). Con la intención de comprobar el papel del receptor nicotínico  $\alpha_7$  en el efecto observado por la aplicación de colina, se utilizó un antagonista selectivo para estos receptores, MLA 100 nM, el cual, por sí solo, no tiene ningún efecto sobre la transmisión sináptica. Como se puede observar en la figura 34A, tras 5 minutos de perfusión de MLA, la inclusión de colina al medio de perfusión indujo una reducción del fEPSP de  $21,2 \pm 3,9$  %, valor similar al observado en ausencia del compuesto. Estos datos reproducen los resultados obtenidos en rata *wild type*, donde la aplicación de MLA tampoco logró revertir el efecto de colina.

Por otro lado, en rodajas hipocampales de ratón *knock-out*, sorprendentemente, la aplicación de colina también produjo una reducción de la señal ( $25,8 \pm 7,3$  %) (Figura 34B), valor similar al obtenido en ratones *wild type* (figura 34C;  $p > 0,05$ ). Tal y como era de esperar, en el caso de los ratones *knock-out*, el efecto de colina no se vio modificado por el pretratamiento con MLA 100 nM ( $19,52 \pm 3,87$  % reducción fEPSP) (figura 34B).

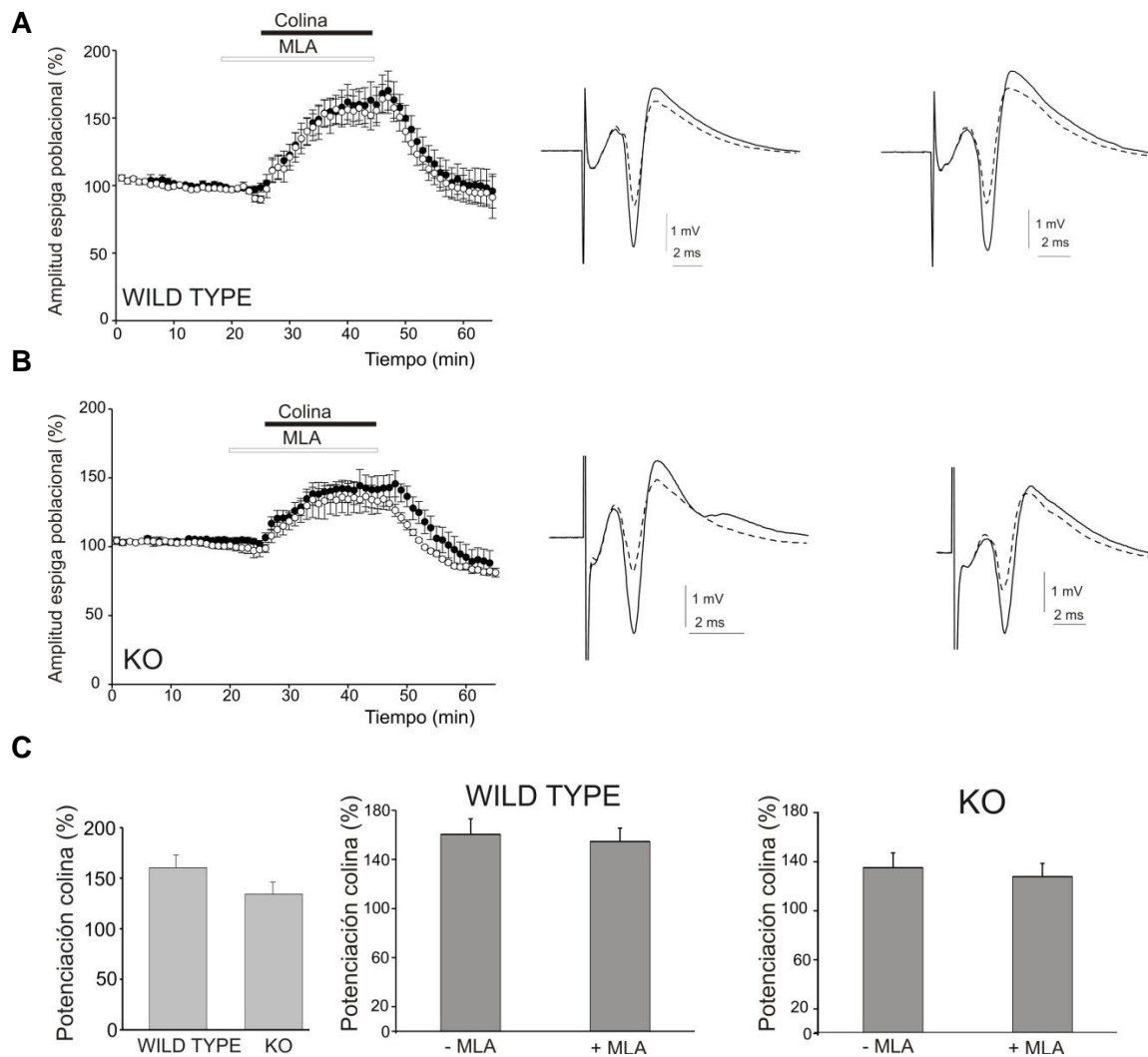


**Figura 34. Colina produce una depresión de los fEPSP en rodajas hipocámpales de ratón knock-out para el receptor nicotínico  $\alpha_7$ .** (A) Curso temporal medio en el que se observa la depresión del fEPSP ejercida por colina 10 mM sola (círculos negros) y en presencia de MLA 100 nM (círculos blancos) en rodajas de hipocampo de ratón *wild type*, durante el tiempo indicado por las barras correspondientes. (B) Mismo experimento que A, en este caso llevado a cabo en rodajas hipocámpales de ratón *knock-out* para el receptor nicotínico  $\alpha_7$ . (C) Depresión media de las pendientes de los fEPSP calculada durante los últimos cinco minutos de la exposición a colina, en presencia y en ausencia de MLA, tanto en ratón *wild type* como en ratón *knock-out* (n=6-9).

En otro grupo de experimentos, empleamos rodajas hipocampales, tanto de ratón *wild type* como de ratón *knock-out*, con el fin de determinar el efecto de colina sobre la espiga poblacional. Las espigas poblacionales se obtuvieron, tras estimulación ortodrómica, mediante la colocación del electrodo de estimulación en el *stratum radiatum* y el de registro en el *stratum pyramidale*. La intensidad utilizada para el registro fue un 20% de la intensidad a la que se obtuvo la respuesta máxima, durante 0,1 ms y con un intervalo de 15 segundos entre pulso y pulso. En presencia de colina, la amplitud de la espiga poblacional comenzó a aumentar rápidamente (2-3 minutos) en ambos modelos experimentales, de forma que, tras un incremento progresivo, se alcanzó un periodo de estabilización en el que se registró la máxima potenciación. En el caso del ratón *wild type*, la espiga poblacional aumentó su amplitud media en un  $160,4 \pm 12,6$  % respecto al valor basal (figura 35). Es decir, en condiciones control la amplitud media fue de  $3,0 \pm 0,3$  mV, pasando a  $4,80 \pm 0,5$  mV tras 20 minutos en presencia de colina. Del mismo modo, en ratones *knock-out*, la aplicación de colina provocó un incremento de la amplitud de la espiga poblacional de un  $134,2 \pm 11,9$  % respecto al valor basal (figura 35B), de forma que la respuesta, que en condiciones control tuvo una amplitud media de  $2,9 \pm 0,3$  mV, pasó a un valor medio de  $4,1 \pm 0,3$  mV en presencia de colina. Las diferencias observadas en los valores de los dos grupos experimentales resultaron no ser estadísticamente significativos ( $p=0,17$ ) y, una vez el compuesto fue retirado del medio, la amplitud de la espiga volvió a sus valores basales.

Del mismo modo que en el caso anterior, el pretratamiento de las rodajas con el antagonista de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  MLA 100 nM, no consiguió revertir la potenciación de la señal observada con colina en ninguno de los dos modelos experimentales utilizados. En los ratones *wild type*, colina provocó una potenciación de la señal de un  $154,6 \pm 11,0$  % en presencia de MLA. De forma similar, cuando los experimentos se realizaron en rodajas hipocampales de ratón *knock-out* para el receptor nicotínico  $\alpha_7$ , a pesar de la presencia de MLA, colina produjo una potenciación media de la señal de un  $126,9 \pm 10,7$  % respecto a los valores basales. La presencia de MLA no modificó de forma significativa el efecto mediado por colina en ratones *wild type* y *knock-out*, de manera que, al igual que en el caso anterior, se produjo una potenciación de la espiga poblacional con una cinética rápida y alcanzando su máxima potenciación a los 20 minutos de la aplicación de colina. La espiga poblacional volvió a sus valores basales tras 15 minutos de lavado.

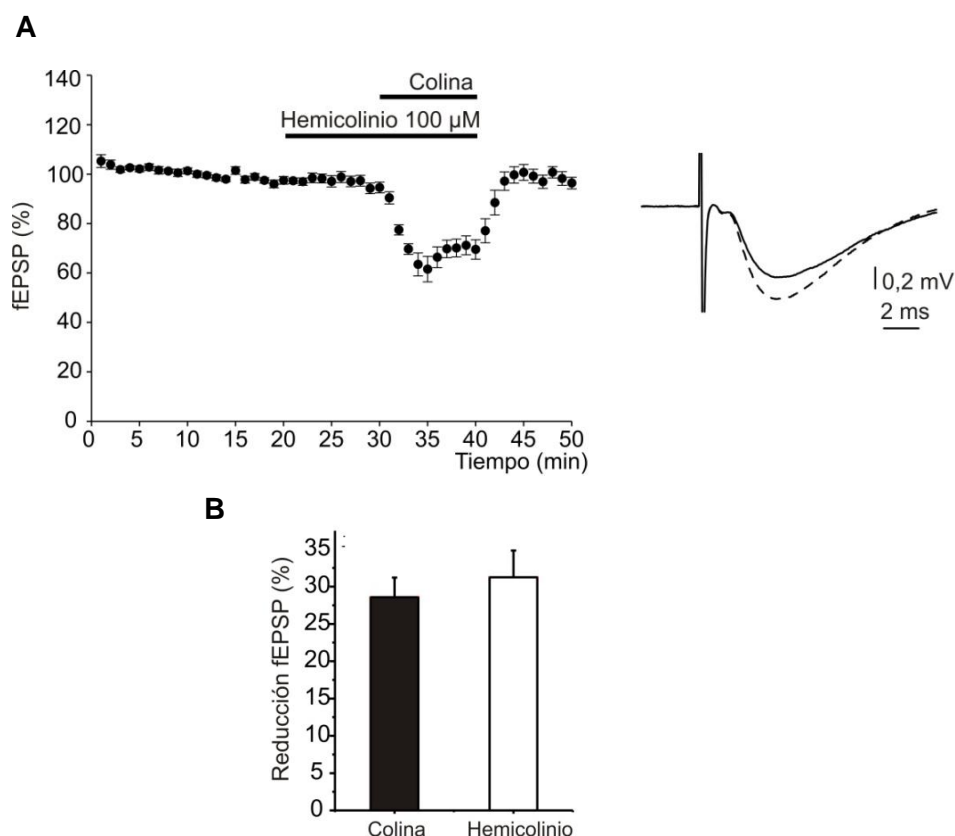
A la vista de estos datos, parece que el efecto mediado por colina sobre la transmisión sináptica no está mediado por receptores nicotínicos  $\alpha_7$ .



**Figura 35.** La aplicación de colina produce una potenciación de la espiga poblacional en ratones *knock-out* para el receptor nicotínico  $\alpha_7$ . **(A)** Curso temporal medio en el que se puede observar la amplitud de la espiga poblacional en ratón *wild type*. Colina 10 mM en ausencia (círculos negros) y en presencia de MLA (círculos blancos) se aplicó durante el tiempo indicado por la barra horizontal. **(B)** Mismo experimento que A, llevado a cabo en ratones *knock-out* para el receptor nicotínico  $\alpha_7$  **(C)** Histograma en el que se representa la potenciación de la amplitud media de la espiga poblacional ejercida por colina, en presencia y en ausencia de MLA, en ratón *wild type* y *knock-out* (n=6-9).

## 11. LA INHIBICIÓN DE LA RECAPTACIÓN DE COLINA NO INFLUYE EN EL EFECTO SOBRE LOS fEPSP

Dado que los resultados anteriores parecen apuntar a que colina ejerce su efecto a través de un mecanismo independiente a los receptores  $\alpha_7$  y para estudiar si en la modulación de la transmisión sináptica ejercida por colina podía estar implicado algún mecanismo a nivel intracelular, llevamos a cabo experimentos en los que utilizamos hemicolinio, un inhibidor selectivo del sistema de recaptación de colina (Pascual *et al.*, 1990). La aplicación de hemicolinio (100  $\mu$ M) durante 10 minutos previos a la aplicación de colina no produjo ninguna alteración en el fEPSP (figura 36). Sin embargo, cuando se añadió colina (10 mM) al medio, en presencia de hemicolinio, se produjo una reducción del  $31,2 \pm 3,6$  % en el fEPSP, similar a la obtenida en ausencia de dicho compuesto. Una vez colina fue retirada del medio, el fEPSP volvió al valor basal tras 2-3 minutos.



**Figura 36. Hemicolinio no revierte la reducción del fEPSP ejercida por colina.** (A) Curso temporal en el que se representa la depresión ejercida por colina (10 mM), aplicada durante 10 minutos, en presencia de hemicolinio, 100  $\mu$ M. (B) En el histograma se compara la reducción de la pendiente del fEPSP ejercida por colina en ausencia (barra negra) y en presencia de hemicolinio (barra blanca) (n=12).



## **12. CITICOLINA Y ESTABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA**

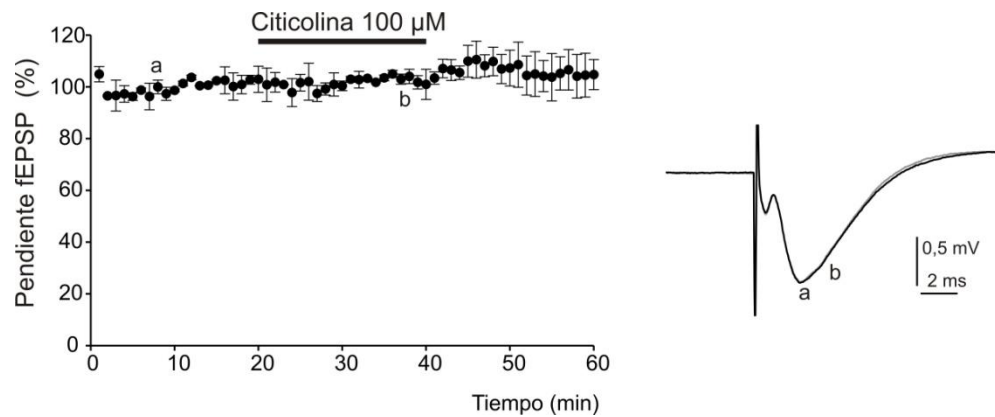
Otra opción que podría explicar los resultados obtenidos por la aplicación de colina podría estar relacionada con los lípidos localizados a nivel de la membrana plasmática, compuestos por colina y donde la perfusión aguda de este compuesto podría alterar la excitabilidad neuronal.

El principal lípido compuesto por colina es la fosfatidilcolina, que constituye el fosfolípido más abundante en membranas eucariotas (Fagone y Jackowski, 2012). Su proporción es elevada en el lado externo de la membrana y es el principal fosfolípido circulante en plasma (Wood *et al.*, 1969; Kuksis *et al.*, 1968; Marai y Kuksis, 1969).

Una vez llega al interior celular, colina se incorpora a los fosfolípidos de membrana a través de la vía Kennedy o vía de la CDP-colina. (Blusztajn, 1998). En primer lugar, es fosforilada por una colina quinasa en el citoplasma celular para dar lugar a fosfocolina que, a su vez, reacciona con citidintrifosfato para producir citidina difosfocolina (CDP-colina). El enzima 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa cataliza en el retículo endoplasmático la reacción para dar lugar a fosfatidilcolina

Citicolina o citidina difosfocolina es un mononucleótido constituido por ribosa, citosina pirofosfato y colina que actúa como intermediario esencial en la síntesis de fosfolípidos estructurales de las membranas celulares. La administración de citicolina provoca una activación de la síntesis de los fosfolípidos estructurales de las membranas neuronales y se ha descrito que incrementa el metabolismo cerebral, a la vez que modula los niveles de diferentes neurontransmisores (Secades, 2011).

Con el fin de estudiar si el efecto de colina está asociado con procesos de estabilización de la membrana plasmática, donde posibles alteraciones en la liberación de glutamato puedan afectar al registro de fEPSP, llevamos a cabo experimentos en los que las rodajas de hipocampo fueron perfundidas con citicolina (100  $\mu$ M) durante un periodo de tiempo de 20 minutos. En estas condiciones, los fEPSP no se vieron afectados, lo que indica que el efecto depresor de colina no está influenciado por procesos relacionados con la estabilidad de la membrana plasmática (figura 37).



**Figura 37. Citicolina no produce depresión de los fEPSP.** Las rodajas hipocámpales fueron sometidas a un tratamiento con citicolina 100  $\mu\text{M}$  durante 20 minutos. Los fEPSP registrados en el *stratum radiatum* de CA1 no se vieron modificados en presencia del compuesto. El trazo original muestra fEPSP representativos de los periodos indicados con las letras a (control) y b (citicolina) ( $n=3$ ).

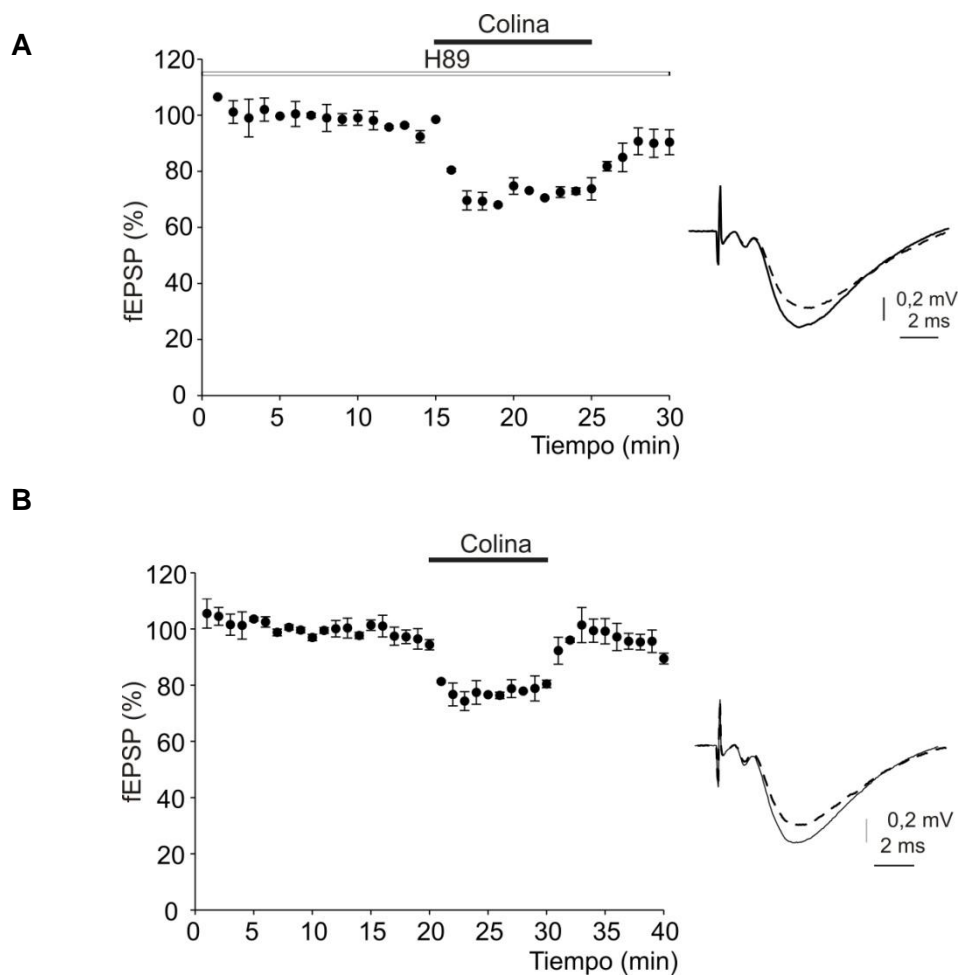
### **13. H89, INHIBIDOR DE LA PROTEÍNA QUINASA A DEPENDIENTE DE cAMP**

El enzima colina quinasa (CK) cataliza el primer paso de la vía CDP-colina, ruta a través de la cual colina se incorpora a los fosfolípidos de membrana. En este paso colina es fosforilada a fosfocolina, en un proceso en el que se requiere una molécula de ATP. Este enzima se encuentra en las células de los mamíferos en tres isoformas (CK $\alpha$ 1, CK $\alpha$ 2 y CK $\beta$ ) y se ha descrito que está implicado en procesos metabólicos y de proliferación celular. Puesto que el enzima colina quinasa está implicado en el mantenimiento estructural de la membrana plasmática, es posible que también pudiera estar implicado también en la excitabilidad celular.

H89 es un potente y selectivo inhibidor de la proteína quinasa A (PKA). Además, se ha demostrado que es capaz de inhibir el enzima colina quinasa (Wieprecht *et al.*, 1994). El mecanismo de acción de este proceso todavía no se conoce con exactitud. Existe la posibilidad de que la inhibición se produzca por una actuación directa sobre el enzima colina quinasa o bien, que se trate de un mecanismo indirecto por inhibición de PKA (Gabellieri *et al.*, 2009).

El efecto de colina sobre la excitabilidad neuronal podría deberse a una posible alteración en la vía de la CDP-colina, por lo que la aplicación de un inhibidor del enzima colina quinasa podría actuar modulando el efecto producido por la aplicación aguda de colina. Para valorar esta posibilidad, estudiamos el efecto de colina sobre el fEPSP en una solución KRB preincubada con H89 10  $\mu\text{M}$  (figura 38).

Los resultados obtenidos mostraron que la depresión producida por colina en la solución preincubada con H89 es de un  $27,4 \pm 0,7$  %, similar a la producida en la solución KRB en ausencia de H89,  $22,6 \pm 1,2$  %, por lo que parece que este efecto no está relacionado con el papel de colina como componente precursor de la membrana plasmática.



**Figura 38. La aplicación de H89 no revierte la reducción del fEPSP producida por colina. (A)** La aplicación de colina 10 mM a una solución KRB preincubada con H89 10  $\mu$ M produce una reducción similar a la producida en ausencia de H89 **(B)**. Las respuestas sinápticas se obtuvieron como consecuencia de la estimulación y registro en el *stratum radiatum* de la región CA1 (n=4).

#### **14. LOS RECEPTORES GABA NO ESTÁN IMPLICADOS EN LA MODULACIÓN EJERCIDA POR COLINA**

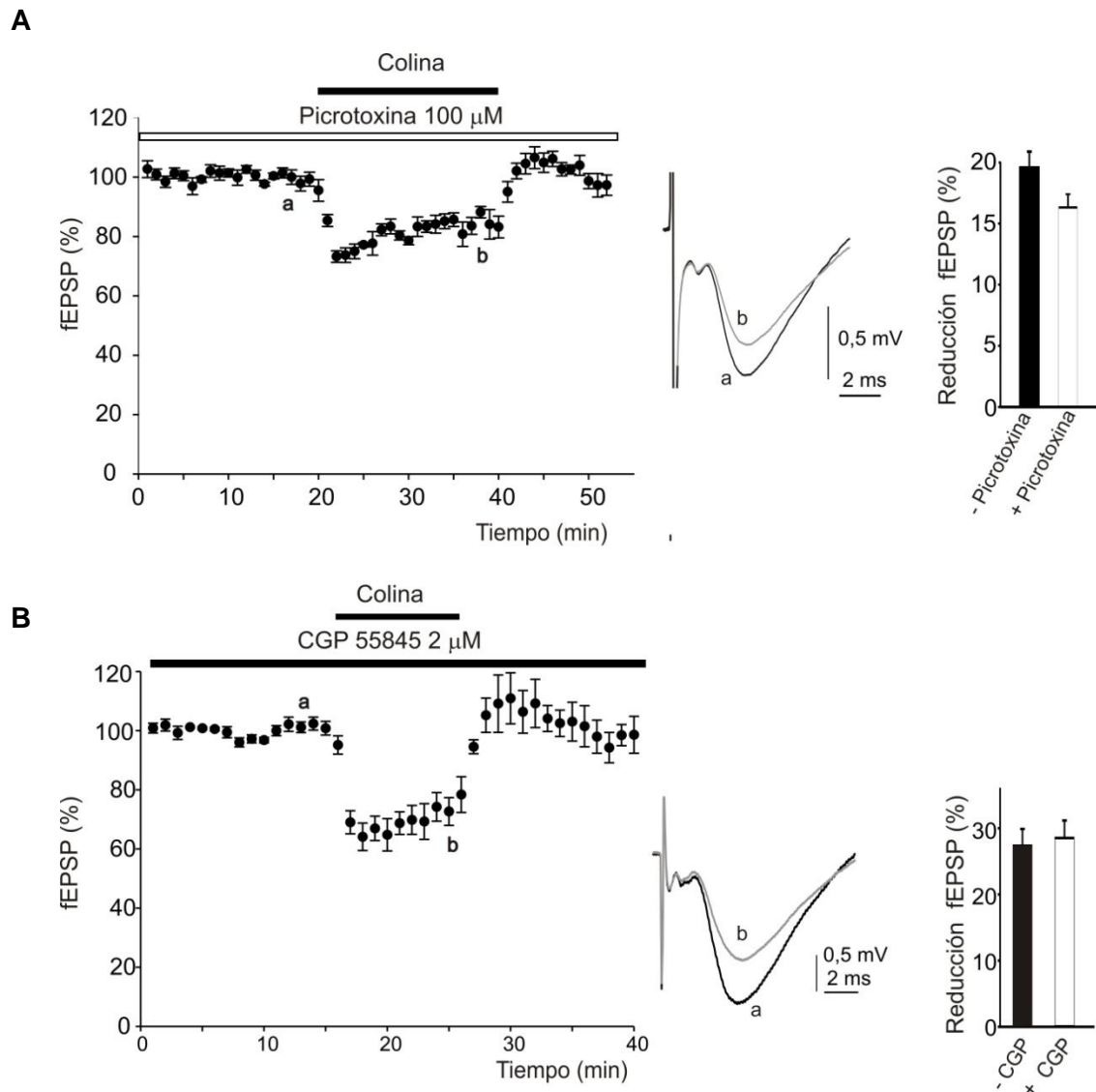
Las interneuronas hipocampales expresan receptores nicotínicos de tipo  $\alpha_4\beta_2$  y  $\alpha_7$  en sus diferentes regiones celulares. La presencia de estos subtipos de receptor nicotínico a nivel somato-dendrítico conduce a la generación de potenciales de acción en la interneurona y a su activación (Jones y Yakel, 1997; Alkondon *et al.*, 1998; Frazier *et al.*, 1998a, b; McQuiston y Madison, 1999; Sudweeks y Yakel, 2000; Alkondon y Albuquerque, 2004). La presencia de receptores nicotínicos en las interneuronas, a nivel presináptico produce una potenciación de la liberación de GABA (Alkondon *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 1996; Radcliffe y Dani 1998; Radcliffe *et al.*, 1999). Este proceso puede derivar en una inhibición o desinhibición de las neuronas piramidales dependiendo de la proyección de la interneurona (Ji y Dani, 2000).

Por lo tanto, la modulación de la transmisión sináptica ejercida por colina podría deberse a una acción sobre las neuronas GABAérgicas (Arnaíz-Cot *et al.*, 2008). Con el fin de valorar este posible efecto, realizamos experimentos en presencia del antagonista de los receptores GABA A, picrotoxina (100  $\mu$ M) y del antagonista de los receptores GABA B, CGP 55845 (2  $\mu$ M).

Tal y como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos, para llevar a cabo estos experimentos, en presencia de picrotoxina, utilizamos un KRB modificado (4 mM  $\text{CaCl}_2$  y 4 mM  $\text{MgSO}_4$ ) y realizamos un corte con la ayuda de un bisturí entre CA3 y CA1 con el fin de romper la comunicación entre ambas áreas, evitando descargas espontáneas producidas por la ausencia de inhibición.

La magnitud de la reducción del fEPSP en presencia de colina (10 mM) en aquellos experimentos en los que se añadió picrotoxina fue de  $16,1 \pm 2,0$  %; mientras que la reducción del fEPSP en presencia de colina y KRB con la misma composición que en el experimento anterior pero en ausencia de picrotoxina fue de  $19,4 \pm 3,0$  %. A la vista de estos resultados, parece que los receptores GABA A no están implicados en la modulación del fEPSP ejercido por colina (figura 39A).

La aplicación de colina en presencia de CGP 55845 (2  $\mu$ M), un antagonista de los receptores GABA B produjo una reducción del fEPSP del  $30,8 \pm 3,4$  %, mientras que en ausencia del antagonista, colina redujo en un  $28,6 \pm 2,6$  % el potencial postsináptico excitatorio de campo, por lo que parece que tampoco los receptores GABA B estarían implicados en la modulación ejercida por colina (figura 39B).



**Figura 39. La aplicación de antagonistas de los receptores GABA, picrotoxina y CGP 55845, no alteran la depresión de la transmisión sináptica ejercida por colina. (A)** Curso temporal medio en el que se puede observar el efecto de colina 10 mM en una solución KRB modificada a la que se le ha añadido picrotoxina 100  $\mu$ M. Los trazos originales son representativos de los tiempos marcados como a (control) y b (colina). El histograma representa la reducción ejercida por colina en las diferentes condiciones experimentales, la barra negra en ausencia de picrotoxina y la barra blanca en su presencia (n=6). **(B)** Curso temporal medio en el que se puede observar el efecto de colina 10 mM en una solución KRB a la que se le ha añadido CGP 55845 2  $\mu$ M. El histograma representa la reducción ejercida por colina en las diferentes condiciones experimentales, la barra negra en ausencia de CGP 55845 y la barra blanca en su presencia (n=4). Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM.

## **15. BLOQUEO DE LA INHIBICIÓN RECURRENTE EJERCIDA POR COLINA**

Los axones de las neuronas piramidales de la región CA1 emergen desde el *stratum pyramidale*, donde se encuentran los somas neuronales y se dirigen hacia el *stratum alveus* o el *stratum oriens*. Pueden dar lugar a fibras colaterales que actúan estimulando las interneuronas presentes en estas capas. El reclutamiento de interneuronas por las neuronas piramidales da lugar a una inhibición *feedback*, que actúa limitando la duración y la propagación de la activación de las neuronas principales.

Entre las interneuronas que ejercen este tipo de inhibición se encuentran las interneuronas axo-axónicas. Sus dendritas se encuentran en el *stratum pyramidale* y *stratum oriens* proximal, cuyos axones terminan en los axones proximales de las neuronas piramidales (Somogyi *et al.*, 1985; Buhl *et al.*, 1994). Asimismo, se encuentran las interneuronas en cesto piramidales, cuyas dendritas se localizan a lo largo del *stratum oriens*, *stratum radiatum* e incluso *stratum lacunosum-moleculare* y cuyos axones hacen sinapsis con el soma y las dendritas proximales de las células piramidales (Freund y Buzsáki, 1996). Algunas interneuronas como las células O-ML, las células biestratificadas o las células trilaminares, también ejercen una inhibición *feedback* (Kullmann, 2011).

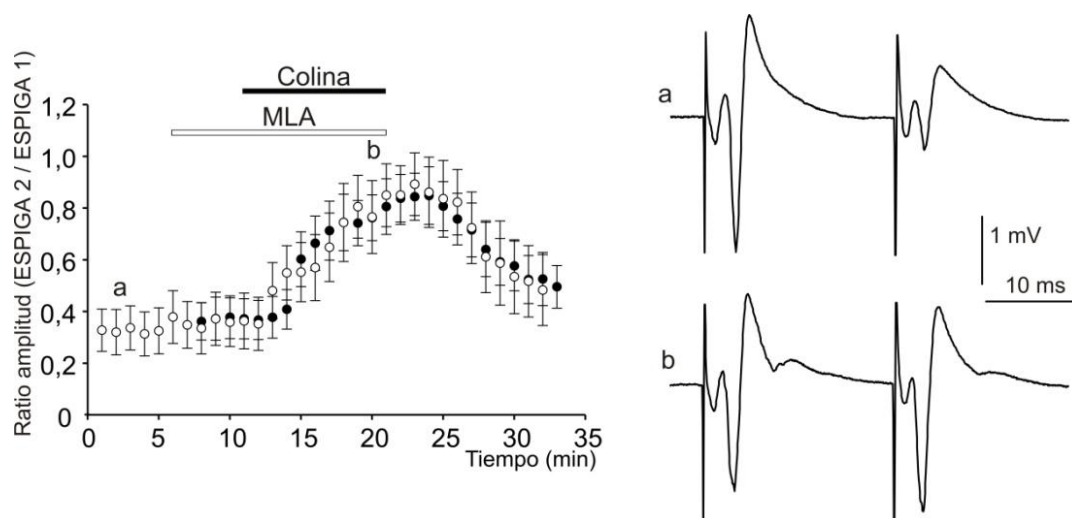
La activación de las interneuronas localizadas en el *stratum oriens*, por lo tanto, va a resultar en una inhibición de la neurona piramidal. Esta inhibición puede observarse mediante la estimulación del *stratum oriens* con pares de pulsos muy próximos entre sí (20 ms) y el registro en el *stratum pyramidale*. Con este patrón de estimulación se puede observar que la segunda espiga poblacional obtenida es mucho más pequeña que la primera. El motivo es que la segunda espiga se encuentra inhibida como consecuencia de la activación de las interneuronas.

Estudiamos el fenómeno de inhibición recurrente en un conjunto de rodajas, a través de la aplicación de pares de pulsos generados con un intervalo de 20 ms entre pulsos y aplicados a intervalos de 60 segundos (figura 40). Las espigas poblacionales se obtuvieron por la estimulación por pares de pulsos en el *stratum oriens* y el registro en el *stratum pyramidale*. Los experimentos se llevaron a cabo a la intensidad correspondiente a una respuesta máxima y la duración de los estímulos fue de 0,1 ms.

En el periodo basal se obtuvieron espigas poblacionales donde la segunda espiga fue un  $66,3 \pm 4,9$  % más pequeña que la primera. El ratio entre la segunda espiga poblacional y la primera (EP2/EP1) fue de  $0,4 \pm 0,1$ . La aplicación de colina 10

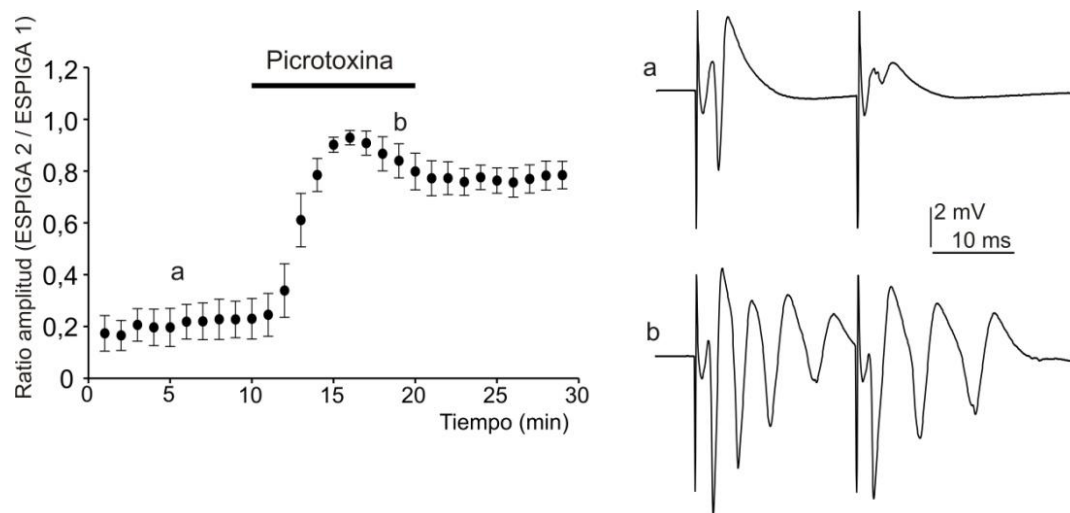
mM produjo un incremento gradual de la segunda espiga (EP2) que alcanzó un máximo de  $325,5 \pm 94,5$  % respecto a la amplitud inicial. En condiciones control, la amplitud de la EP2 fue de  $1,9 \pm 0,4$  mV y, tras la aplicación de colina durante 10 minutos, la amplitud pasó a ser de  $4,3 \pm 0,6$  mV. Estos resultados demuestran que colina produjo un bloqueo de la inhibición recurrente. El ratio EP2/EP1 pasó a ser de  $0,8 \pm 0,1$ . Una vez colina fue retirada del medio, las amplitudes de las espigas volvieron lentamente a sus valores en condiciones control.

En otro conjunto de experimentos, se estudió el efecto producido por colina 10 mM en presencia del antagonista selectivo de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , MLA (100 nM). Como era de esperar atendiendo a los resultados anteriores, el bloqueo de la inhibición recurrente, observado por la aplicación de colina, no se vio alterado en presencia de MLA. El incremento en la segunda espiga poblacional en presencia de colina fue de un  $325,5 \pm 94,5$  % y, en presencia de colina y MLA, el incremento fue de un  $325,2 \pm 87,0$  %. El ratio EP2/EP1 en presencia de colina y MLA fue de  $0,9 \pm 0,1$ .



**Figura 40. Colina previene la inhibición recurrente.** El curso temporal muestra el ratio medio en las espigas poblacionales producidas como consecuencia de la estimulación en el *stratum oriens* con un patrón de pares de pulsos. La aplicación de colina durante 10 minutos produce un incremento de la amplitud de la espiga poblacional (círculos negros), que no se ve afectada en presencia de MLA (100 nM) en el medio (círculos blancos). Cada uno de los puntos de la representación se normalizó respecto al ratio medio obtenido tras los 6 minutos de control y está expresado como media  $\pm$  EEM/minuto ( $n=5-8$ ). A la derecha se pueden observar dos trazos originales obtenidos en los tiempos indicados por las letras a (condiciones control) y b (en presencia de colina y ausencia de MLA).

La reversión de la inhibición recurrente ejercida por colina no da lugar a un comportamiento epileptogénico, al contrario de lo que ocurre en la reversión de la inhibición producida por la aplicación de picrotoxina, tal y como se puede observar en el siguiente grupo de experimentos (figura 41). La solución KRB utilizada se modificó (4 mM  $\text{CaCl}_2$  y 4 mM  $\text{MgSO}_4$ ) y se realizó un corte con la ayuda de un bisturí entre CA3 y CA1 con el fin de romper la comunicación entre ambas áreas. Bajo estas condiciones experimentales, como consecuencia de una estimulación por pares de pulsos, se obtuvieron dos espigas poblacionales, la segunda un  $77,7 \pm 9,0$  % menor que la primera (ratio EP2/EP1=  $0,2 \pm 0,1$ ). La aplicación de picrotoxina  $100 \mu\text{M}$  provocó un incremento progresivo de la segunda espiga ( $1,3 \pm 0,4$  mV en condiciones control y  $7,3 \pm 10$  mV tras 10 minutos en presencia de picrotoxina). El ratio EP2/EP1 fue de  $0,8 \pm 0,1$  en presencia de picrotoxina. Además se produjo la aparición de espigas poblacionales subsecuentes. Una vez eliminada la picrotoxina del medio, las amplitudes de las espigas poblacionales no volvieron a sus valores basales.



**Figura 41. La aplicación de picrotoxina produce una reversión de la inhibición recurrente.** Curso temporal donde se representa el ratio medio en las espigas poblacionales producidas como consecuencia de la estimulación en el *stratum oriens* con un patrón de pares de pulsos. La aplicación de picrotoxina se produce durante el tiempo indicado en la barra horizontal. Cada uno de los puntos de la representación se normalizó respecto al ratio medio obtenido tras los 10 minutos de control y está expresado como media  $\pm$  EEM/minuto ( $n=7$ ). Los trazos originales se obtuvieron en condiciones control (a) y en presencia de picrotoxina (b).



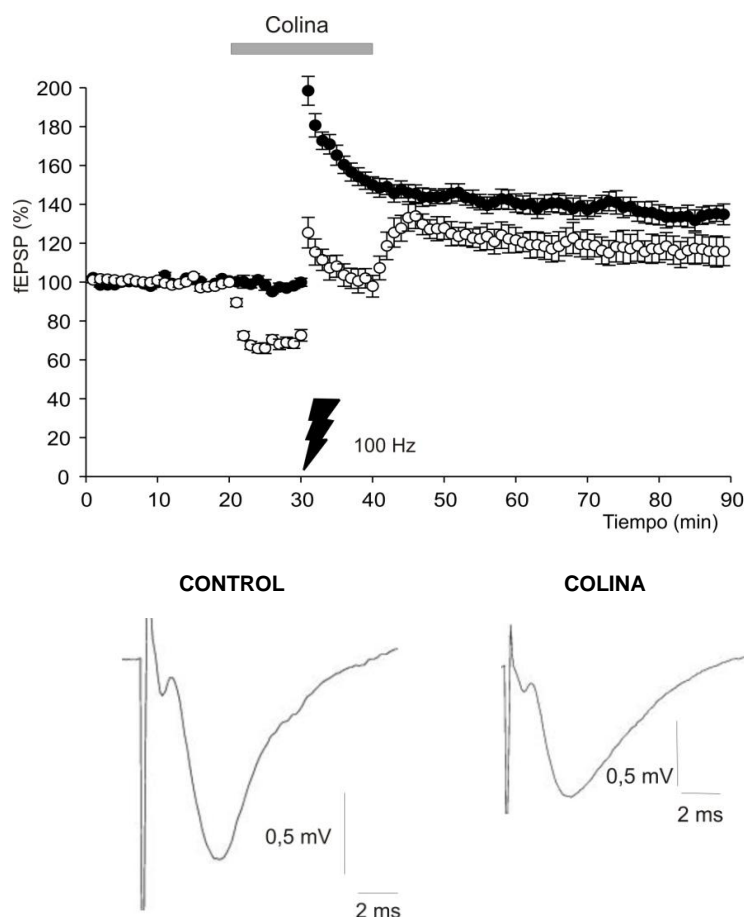
## **16. EFECTO DE COLINA SOBRE LA PLASTICIDAD NEURONAL**

Una de las formas de plasticidad sináptica que más interés ha generado por considerarse la base del aprendizaje es la potenciación de larga duración. La implicación del hipocampo y de los receptores nicotínicos en estos procesos es ampliamente conocida. En los siguientes experimentos, la potenciación de la respuesta sináptica se obtuvo por la aplicación de un tren de pulsos (de 100 Hz, durante 1 segundo) en las terminales presinápticas del *stratum radiatum* de la región CA1. Evaluamos si colina ejerce algún tipo de modulación sobre la potenciación de larga duración.

Registramos los fEPSP obtenidos durante un periodo de estabilización de 30 minutos, tras los cuales se aplicó el tétano (100 Hz, 1 s), obteniendo una potenciación transitoria de  $198,4 \pm 7,8$  % de la señal, como consecuencia de la facilitación, seguida de una respuesta incrementada, o LTP, que persistió durante, al menos, 60 minutos. La media normalizada de las pendientes de los fEPSP, en el minuto 60, fue de  $134,8 \pm 5,6$  % respecto a la basal (figura 42).

La aplicación de colina produjo una reducción de la pendiente del fEPSP de un  $27,7 \pm 2,9$  %. Tras 10 minutos de aplicación de colina, y una vez estabilizado su efecto, se aplicó el tétano, produciéndose un incremento inmediato de la media de la pendiente normalizada de los fEPSP ( $125,4 \pm 8,4$  % respecto al periodo basal). Esta disminuyó gradualmente durante unos minutos hasta que colina fue retirada del medio, tras 20 minutos de aplicación, obteniendo un ligero aumento de la señal como consecuencia de la reversión del efecto por su lavado. Después de 60 minutos, la señal alcanzó un valor medio de  $115,8 \pm 7,3$  % respecto a la basal.

Las rodajas expuestas a colina presentan una plasticidad sináptica menor que las rodajas en condiciones control, por lo que parece que colina produciría una depresión de la potenciación de larga duración.

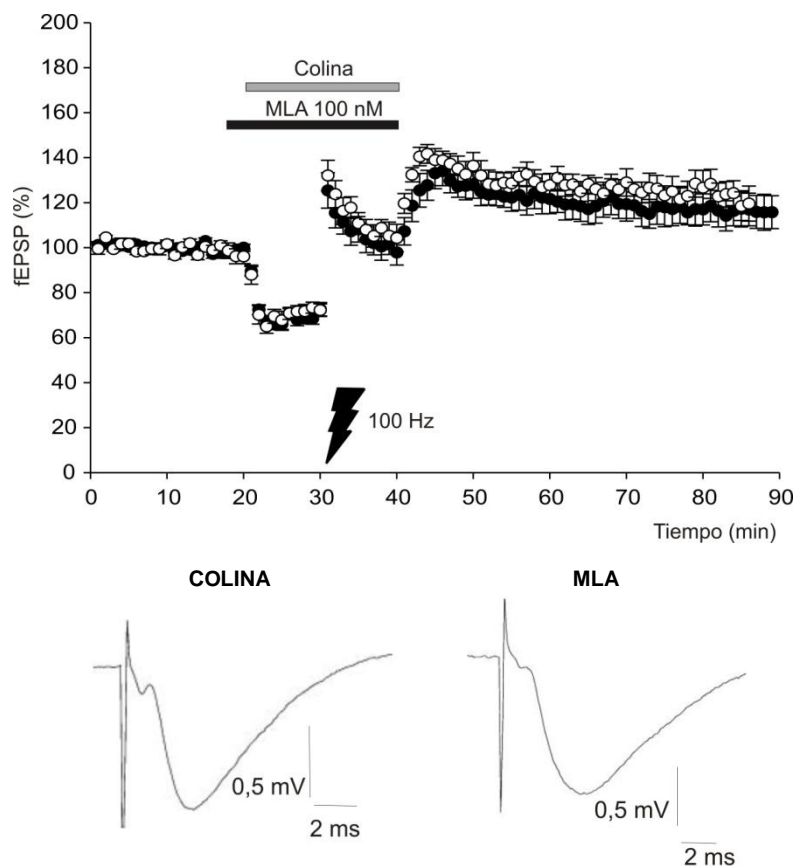


**Figura 42. Depresión de la LTP tras la aplicación de colina. (A)** Porcentaje de potenciación del fEPSP en situación control (círculos negros). Los círculos blancos representan el fEPSP en presencia de colina durante el tiempo indicado por la barra horizontal. El tétano (1 segundo, 100 Hz) se aplicó en el minuto 30. Los puntos normalizados representan la media  $\pm$  EEM/minuto ( $n= 6-9$ ). Los trazos originales corresponden al minuto 90 en condiciones control y en presencia de colina.

Del mismo modo que en experimentos anteriores, decidimos utilizar MLA, con el fin de corroborar que el efecto de colina viene mediado por un mecanismo independiente del receptor nicotínico  $\alpha_7$ .

Tras un periodo de estabilización, aplicamos MLA 100 nM al medio de perfusión durante 2 minutos antes de añadir colina 10 mM. La pendiente del fEPSP en presencia de los dos compuestos se redujo de forma progresiva alcanzando valores similares a los observados en presencia de colina sola (figura 43). A los 10 minutos de aplicación de los compuestos se aplicó el tétano, observándose una potenciación transitoria de la señal, que se redujo progresivamente hasta que los compuestos fueron retirados del líquido de perfusión. A partir de este momento, la pendiente del

fEPSP aumentó, alcanzándose finalmente una potenciación de la señal de un  $118,8 \pm 6,1 \%$ , valor similar al obtenido en presencia de colina sola ( $115,8 \pm 7,3 \%$ ).



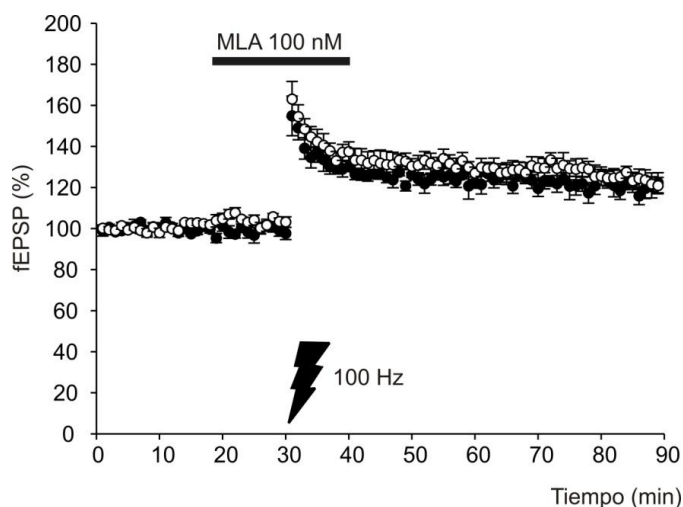
**Figura 43. LTP en presencia de colina y MLA.** Porcentaje de potenciación del fEPSP inducido y registrado en CA1 en presencia de colina (círculos negros) y en presencia de colina y MLA (círculos blancos), durante el tiempo indicado por las barras horizontales. El tétano se aplicó en el minuto 30 ( $n=6-9$ ). Los trazos originales corresponden al minuto 80 en presencia de colina y de MLA.

A la vista de estos resultados, decidimos observar el efecto de MLA por sí sola sobre la LTP. Tal y como se puede observar en la figura 44, MLA 100 nM aplicada en ausencia de colina no modula la LTP.

En condiciones control, tras un periodo de estabilización de 30 minutos se aplicó el tétano (100 Hz, 1 s). Como consecuencia, se obtuvo un incremento transitorio de la señal, que se redujo de forma progresiva hasta llegar a un valor de  $122 \pm 3,1 \%$  en el minuto 60 tras el tétano.

En otro grupo de rodajas, tras el periodo de estabilización, se añadió MLA 100 nM al medio durante 10 minutos, tras los cuales se aplicó el tétano. MLA no produjo

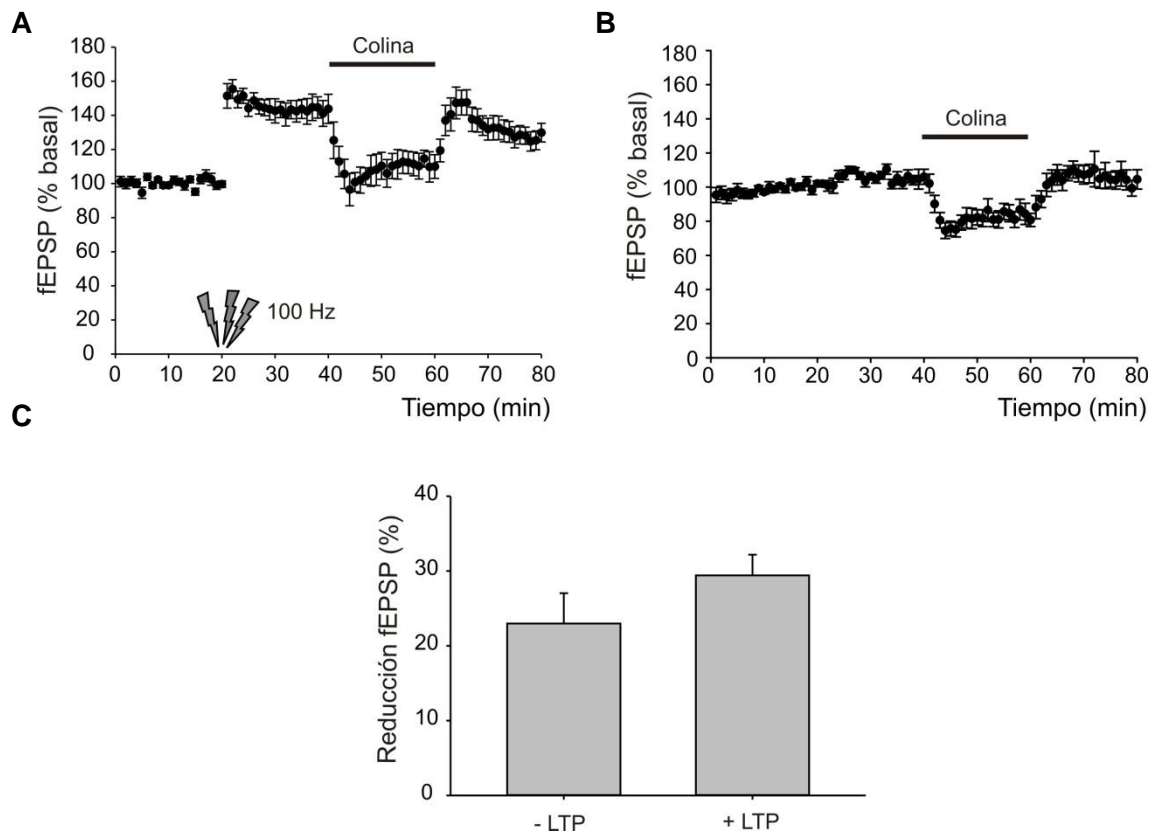
ningún cambio en la pendiente de los fEPSP, tampoco modificó la potenciación transitoria y la potenciación obtenida a los 60 minutos tras el tétano fue similar a la observada en ausencia del compuesto ( $120 \pm 2,4 \%$ ).



**Figura 44. LTP en condiciones control y en presencia de MLA 100 nM.** Potenciación del fEPSP en condiciones control (círculos negros) y en presencia de MLA (círculos blancos) durante el tiempo indicado por la barra horizontal ( $n=6-9$ ).

Con el fin de evaluar si el efecto de colina podría verse afectado por la facilitación que puede sufrir una sinapsis tras un proceso de estimulación tetánica, decidimos aplicar a las rodajas tres trenes de pulsos (100 Hz durante 1 segundo) separados por un periodo de tiempo de 20 segundos. Como consecuencia, se obtuvo una respuesta amplificada de la señal ( $150,0 \pm 4,4 \%$ ), que se mantuvo durante 60 minutos ( $127,0 \pm 5,3 \%$ ).

La aplicación de colina 10 mM en el minuto 20 tras la estimulación tetánica provocó una depresión de la señal de un  $29,4 \pm 2,8 \%$  (figura 45A). En ausencia de tétano, la aplicación de colina 10 mM durante 20 minutos, produjo una reducción de la señal de  $23,0 \pm 4,0 \%$  ( $p > 0,05$ ) (figura 45B). En vista a estos resultados, parece que la reducción de la señal ejercida por colina no se modifica en condiciones de potenciación post-tetánica.



**Figura 45. La reducción de la señal ejercida por colina no se ve modificada en condiciones de potenciación post-tetánica. (A)** Curso temporal medio en el que se representa la aplicación de colina 10 mM, 20 minutos después del tétano. **(B)** Aplicación de colina en ausencia de tétano (n= 6-9). **(C)** Histograma que representa el porcentaje de depresión ejercida por colina en presencia y en ausencia de potenciación de larga duración. Los datos están representados como media  $\pm$  EEM de las pendientes de los fEPSP medidas entre los minutos 15-20 de la exposición a colina (n=5).

## **17. EFECTO DE COLINA SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN RODAJAS HIPOCAMPALES PROCEDENTES DE RATAS ANCIANAS**

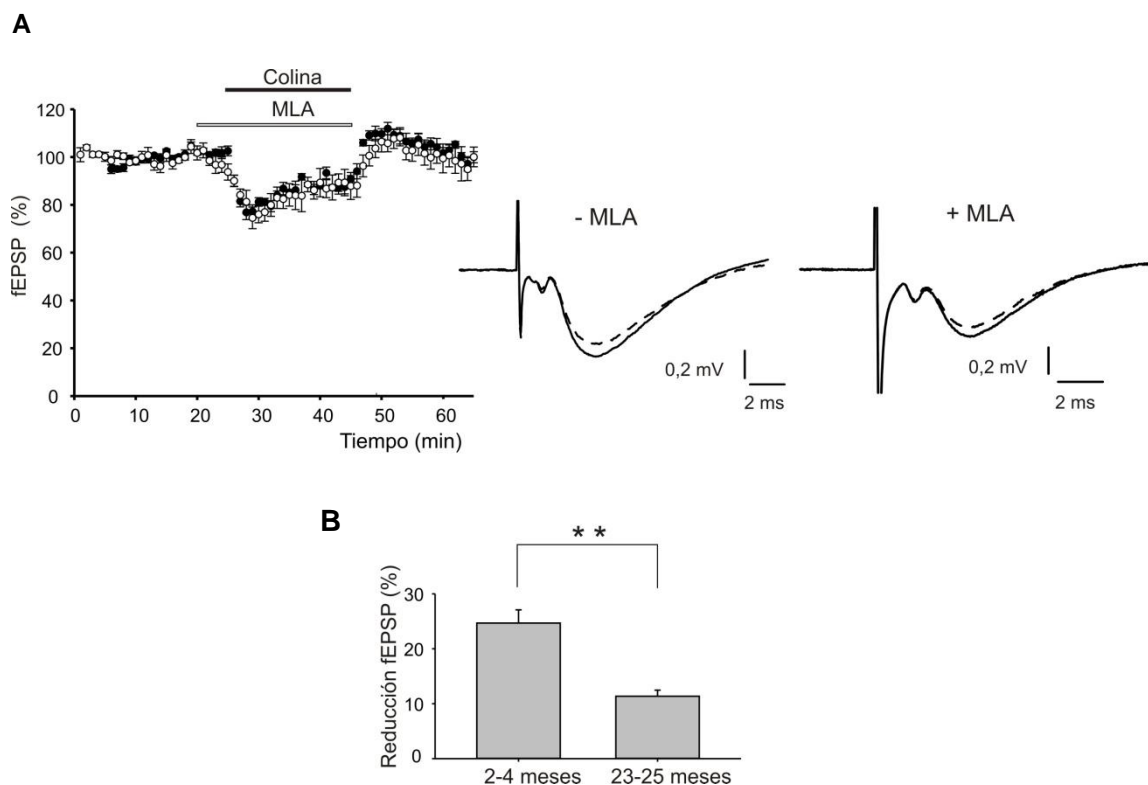
En edades avanzadas, se producen cambios a nivel cognitivo, que están relacionados con alteraciones en los sistemas neuroquímicos de diferentes regiones cerebrales, entre las que se incluye el hipocampo. Se ha demostrado que existe una degeneración y atrofia de neuronas colinérgicas, así como cambios en la homeostasis de  $\text{Ca}^{+2}$  y una alteración en los sistemas dopaminérgico, noradrenérgico, serotoninérgico y glutamatérgico (para revisión exhaustiva: Wu *et al.*, 2007).

En humanos, la vejez viene asociada a una disfunción colinérgica relacionada con las alteraciones en la memoria (Bartus *et al.*, 1982; Gallagher y Colombo, 1995).

En ratas ancianas, diversos estudios han demostrado una reducción de la transmisión colinérgica en el hipocampo, (Casu *et al.*, 2002; Portier *et al.*, 1992; Shen y Barnes, 1996) y, aunque parece que la pérdida de receptores nicotínicos en procesos no patológicos no está totalmente demostrada, sí se ha observado que agonistas nicotínicos mejoran la función cognitiva en animales de edad avanzada (Potier *et al.*, 2006).

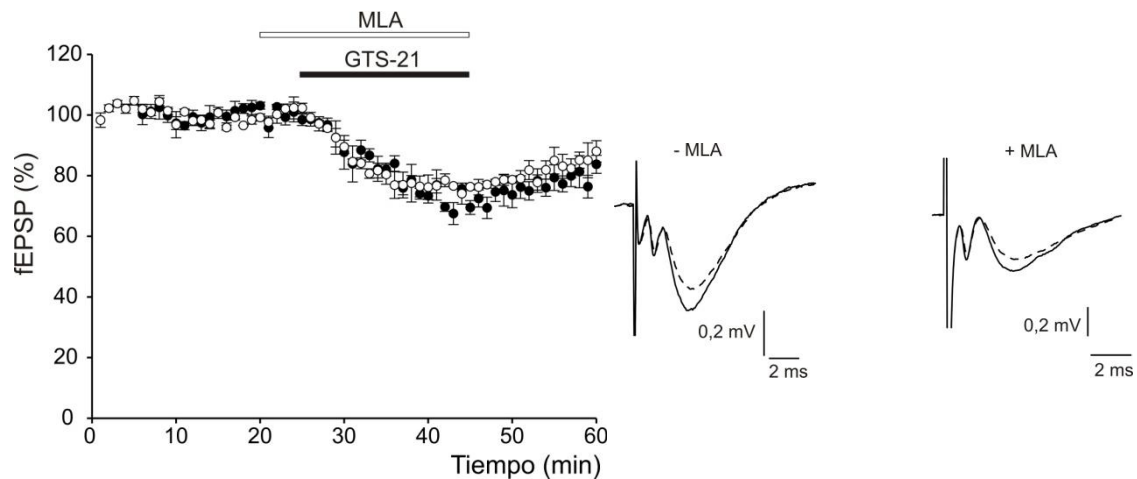
Es posible que el efecto sobre la transmisión sináptica observado con colina se viera modificado en ratas ancianas como consecuencia de los cambios que acontecen, de forma fisiológica, con la edad. Se ha descrito que, en condiciones fisiológicas, la absorción de colina no sufre modificaciones en ratas ancianas, aunque sí se ha observado un aumento de los niveles de colina en el hipocampo (Katz-Brull *et al.*, 2002). El estudio del efecto de colina en este modelo experimental constituiría una herramienta útil para comprender el mecanismo por el que ejerce tal modulación. Para ello, se llevaron a cabo experimentos en rodajas hipocampales de ratas ancianas (23-25 meses de edad).

En un primer grupo de experimentos, se procedió al estudio del fEPSP en presencia de colina. Al igual que se hizo en experimentos anteriores, los electrodos de estimulación y registro se colocaron en el *stratum radiatum*. Tras un periodo de estabilización de la señal de 20 minutos, se añadió colina (10 mM), obteniendo una reducción rápida (3-4 minutos) de la pendiente del fEPSP, que llegó a un máximo de  $17,2 \pm 2,0$  %. A los 15-20 minutos de la aplicación se alcanzó la estabilización de la señal, que resultó en una reducción del  $11,4 \pm 1,1$  % (figura 46A), valor inferior al obtenido en ratas jóvenes de 2-4 meses de edad,  $24,7 \pm 2,4$  % ( $p < 0,001$ ) (figura 46B). Al igual que en animales jóvenes, el pretratamiento de las rodajas con el antagonista MLA 100 nM, no consiguió revertir la reducción de la señal producida por colina (figura 43A).



**Figura 46. Colina produce una reducción del fEPSP en rodajas hipocámpales de ratas ancianas. (A)** Curso temporal en el que se representa la reducción de la pendiente del fEPSP, como consecuencia de la aplicación de colina 10 mM en ausencia (círculos negros) y en presencia (círculos blancos) de MLA 100 nM, durante el tiempo indicado en las barras horizontales (n=5-7). **(B)** Histograma en el que se representa la media  $\pm$  EEM de la reducción de la pendiente del fEPSP en presencia de colina, en ratas jóvenes (2-4 meses de edad) y en ratas ancianas (23-25 meses de edad).

La aplicación de GTS-21 (30  $\mu$ M), un agonista selectivo de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , a las rodajas hipocámpales de ratas ancianas, resultó en una reducción de la respuesta sináptica de un  $27,4 \pm 1,1$  %, valor similar al obtenido en ratas jóvenes tras la aplicación del agonista ( $23,3 \pm 1,2$  %). A diferencia de lo que ocurre en presencia de colina, la reducción de la pendiente del fEPSP en presencia de GTS 21 se produce de forma lenta y progresiva a lo largo del tiempo, la señal tarda en estabilizarse y su reversión durante el lavado es muy lenta e incompleta. Sorprendentemente, la aplicación de MLA 100 nM, no es capaz de revertir el efecto observado con GTS-21 (figura 47).

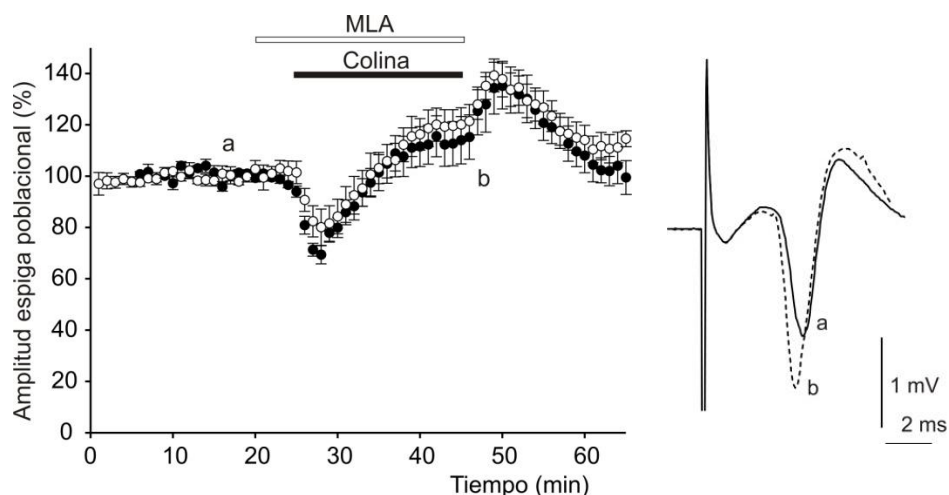


**Figura 47. El agonista de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , GTS-21 produce una reducción del fEPSP en rodajas hipocámpicas de ratas ancianas, que no revierte en presencia de MLA. Curso temporal en el que se representa la reducción del fEPSP tras la aplicación de GTS 21 (30  $\mu$ M) en ausencia (círculos negros) y en presencia (círculos blancos) de MLA (n=4-7).**

A continuación evaluamos las espigas poblacionales en este grupo de ratas ancianas, obtenidas por estimulación ortodrómica. Las respuestas obtenidas fueron, por lo general, de menor amplitud que las observadas en los animales jóvenes. La aplicación de colina 10 mM produjo, como en el caso de las ratas jóvenes, una potenciación progresiva de la espiga poblacional. Sin embargo, en este caso, la potenciación media observada, fue tan sólo de un  $119,0 \pm 9,2$  % (figura 48), distinta a la que se obtuvo en ratas jóvenes, que resultó ser de un  $190,4 \pm 16,4$  %.

A diferencia de lo que observamos en ratas jóvenes, la potenciación de la señal viene precedida por una reducción de la amplitud de la espiga poblacional, sin embargo, al igual de lo que observamos en ratas jóvenes el pretratamiento con MLA 100 nM, no evitó la potenciación producida por colina, que alcanzó un valor de  $125,2 \pm 7,1$  %.





**Figura 48. Efecto de colina sobre la espiga poblacional en ratas ancianas.** El curso temporal representa la amplitud media de la espiga poblacional provocada ortodrómicamente y la potenciación observada tras la aplicación de colina en ausencia (círculos negros) y en presencia de MLA 100 nM (círculos blancos). El trazo original muestra una espiga poblacional representativa, en condiciones control (a) y en presencia de colina (b) (n=6-7).

## **18. COLINA PRODUCE UN CAMBIO EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA CELULAR**

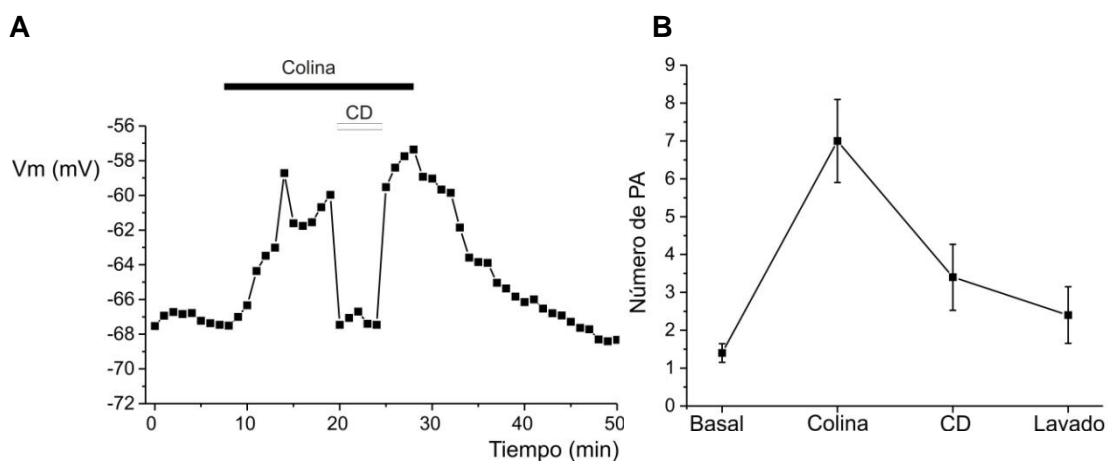
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y lo descrito en la literatura, resulta difícil explicar el efecto de colina únicamente como un cambio en las propiedades de la membrana a nivel postsináptico. Con la intención de estudiar más profundamente el mecanismo de acción por el cual colina actúa modulando la actividad sináptica, se llevaron a cabo registros intracelulares, utilizando electrodos de alta resistencia. Los registros se obtuvieron de los somas de las neuronas piramidales, situadas en el *stratum pyramidale* de la región CA1.

Las neuronas piramidales de CA1 tienen potenciales de membrana en reposo que se mantienen en el rango de -60 a -70 mV. El umbral para el disparo de potenciales de acción suele encontrarse en torno a los -40 o -50 mV y la amplitud de los potenciales obtenidos está en torno a los 100 mV (Spruston y McBain, 2007).

En nuestras condiciones experimentales, las neuronas mostraron un potencial de membrana en reposo de  $-72,6 \pm 1,2$  mV. Como consecuencia de la inyección de corriente despolarizante a nivel somático se produjo el disparo de potenciales de

acción. En concreto, en cinco neuronas se observó que, la aplicación de colina 10 mM produjo una despolarización del potencial de membrana de  $9,1 \pm 2,7$  mV.

Además, en presencia de colina se produjo un aumento en el número de potenciales de acción como consecuencia de la inyección intracelular de corriente despolarizante. En condiciones control el disparo medio fue de  $1,4 \pm 0,2$ , mientras que en presencia de colina el disparo de potenciales de acción pasó a ser de  $7,0 \pm 1,0$  (figura 49B). Este incremento en el disparo de potenciales de acción se redujo ( $3,4 \pm 0,8$ ) cuando se inyectó una corriente directa hiperpolarizante (CD, ver figura 44A), de forma que el potencial de membrana alcanzó valores cercanos a los de reposo. Una vez colina fue retirada del medio, las neuronas volvieron a sus condiciones basales, con potenciales de membrana en torno a los -68 mV y un disparo medio de  $2,4 \pm 0,7$  potenciales de acción. Estos resultados indicarían que colina produce un incremento de la excitabilidad neuronal a través de una despolarización del potencial de membrana.



**Figura 49. Incremento de la excitabilidad neuronal en neuronas piramidales tratadas con colina. (A)** Curso temporal en el que se representa el potencial de membrana (Vm) en condiciones control y en presencia de colina 10 mM (25 min). Con la intención de producir una hiperpolarización celular se inyectó corriente directa (CD) durante 5 minutos. **(B)** Media del número de potenciales de acción obtenidos en las condiciones experimentales señaladas. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM (n=5).

# **DISCUSIÓN**

Tal y como se ha comentado en la introducción de esta tesis, la activación del receptor nicotínico  $\alpha_7$  a nivel hipocampal y la consecuente entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al interior celular está relacionada con diversos procesos celulares mediados por este catión, entre los que se encuentran la plasticidad sináptica y la modulación de la liberación de neurotransmisores (McDermott et al., 1999; Broide y Leslie, 1999; Belluardo et al., 2000, Utsugisawa et al., 2002).

Colina, producto resultante de la hidrólisis de acetilcolina que tiene lugar en el espacio sináptico, es un componente fisiológico imprescindible para el mantenimiento de las membranas celulares y para la síntesis de acetilcolina. Esta molécula ha demostrado comportarse como un agonista  $\alpha_7$ , que activa parcialmente los receptores  $\alpha_3\beta_4$  (Alkondon et al., 1999).

En base a estas premisas, decidimos utilizar este compuesto para el estudio de la modulación sináptica ejercida por el receptor  $\alpha_7$ , utilizando un modelo experimental basado en el registro de potenciales extracelulares de campo en rodajas de hipocampo de rata.

## **1. RECEPTOR NICOTÍNICO E HIPOCAMPO**

Los subtipos de receptor nicotínico predominantes en las células hipocampales son los receptores nicotínicos  $\alpha_4\beta_2$  y los  $\alpha_7$ , aunque también se ha descrito la presencia de otras subunidades como  $\alpha_5$  y subtipos como el  $\alpha_3\beta_4$  (Alkondon y Albuquerque, 1993; Alkondon y Albuquerque, 2004; Jones y Yakel, 1997; Khiroug *et al.*, 2002; Sargent, 1993; Sudweeks y Yakel, 2000). La expresión de estos receptores varía en función del tipo celular y su función va a venir determinada por su localización anatómica.

En las interneuronas hipocampales se expresan tanto los receptores  $\alpha_4\beta_2$  como los  $\alpha_7$ , tanto a nivel somatodendrítico como a nivel presináptico, de forma que cuando se activan, ejercen un efecto excitador con la consecuente potenciación de la liberación de GABA. La liberación del neurotransmisor puede resultar en un efecto inhibitor o desinhibidor de la neurona piramidal (Ji y Dani, 2000).

En las neuronas glutamatérgicas presentes en el hipocampo, la expresión de receptores nicotínicos no está del todo caracterizada. En los experimentos realizados en cultivos de neuronas hipocampales, se ha demostrado la presencia de receptores nicotínicos a nivel somatodendrítico. Sin embargo, en experimentos llevados a cabo en

rodajas hipocampales los resultados han sido contradictorios. Diversos grupos han descrito que la aplicación de agonistas nicotínicos no produce ningún tipo de corriente como respuesta (Jones y Yakel, 1997; McQuiston y Madison, 1999; Frazier *et al.*, 1998). En cambio, otros autores han observado respuestas en las neuronas piramidales tras la aplicación de acetilcolina e incluso se ha descrito la existencia de receptores nicotínicos del subtipo  $\alpha_7$  en estas células (Alkondon *et al.*, 1997; Fabian-Fine *et al.*, 2001, Hefft *et al.*, 1999; Ji *et al.*, 2001).

De los diferentes subtipos de receptor nicotínico, el que presenta mayor permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  es el receptor  $\alpha_7$ , lo que hace que su activación esté relacionada con una modulación de la liberación de neurotransmisores o con procesos de plasticidad neuronal, y por lo tanto, está involucrado en mecanismos de cognición y memoria.

## **2. COLINA Y TRANSMISIÓN SINÁPTICA**

Tal y como se ha comentado en la introducción de esta tesis, la presencia de colina en la hendidura sináptica, se produce como consecuencia de la degradación de acetilcolina por el enzima colinesterasa. Cuando esto ocurre, la concentración de acetilcolina baja, y en cambio, aumenta la concentración de colina. Se ha estimado que la concentración de colina en el fluido cerebro-espinal oscila entre 3-5  $\mu\text{M}$  aproximadamente y que cuando tienen lugar las sinapsis colinérgicas, se pueden llegar a alcanzar concentraciones milimolares de acetilcolina, por lo que se estima que la concentración de colina tras la degradación de acetilcolina también alcanza concentraciones milimolares (Klein *et al.*, 1998; Zeisel, 2000; Alkondon y Albuquerque, 2006). Además, en determinadas patologías como hipoxia, isquemia o en situaciones despolarizantes se produce un incremento de colina en tejido cerebral (Djuricic *et al.*, 1991; Scremin y Jenden 1989).

La sensibilidad de colina por los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  es relativamente baja. La concentración mínima de colina capaz de activar los receptores es de 200  $\mu\text{M}$  y la concentración efectiva media ( $\text{EC}_{50}$ ) para activar los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  en rodajas hipocampales en cultivo es de aproximadamente 2 mM, por lo que en condiciones fisiológicas la concentración de colina circulante no es suficiente como para activar o desensibilizar los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  (Zwart y Vijverberg, 2000; Alkondon *et al.* 1997).

En nuestro grupo observamos que la aplicación de diferentes concentraciones de colina produce una reducción de la pendiente del fEPSP que es dosis-dependiente y reversible. Este resultado se obtuvo tras la estimulación y el registro en diferentes regiones del hipocampo, como son el *stratum radiatum* y *stratum oriens* de CA1 y el *stratum moleculare* del giro dentado.

Nuestros resultados, por un lado, concuerdan con los obtenidos por el grupo de Mielke *et al.*, (2011), donde también observan que colina ejerce una reducción reversible de la transmisión sináptica. Sin embargo, nuestro trabajo está desarrollado en un rango de concentraciones diferente, ya que en nuestros experimentos, a las concentraciones de 10, 500 y 1000  $\mu\text{M}$ , la depresión que observamos es muy reducida ( $9,69 \pm 2,50$  % tras la aplicación de colina 1000  $\mu\text{M}$ ), valores muy inferiores a los que obtiene el grupo de Mielke.

Puesto que, en condiciones patológicas o tras la liberación y posterior degradación de acetilcolina, se logra alcanzar valores milimolares de colina en la hendidura sináptica y en base a las concentraciones utilizadas en trabajos de otros grupos para describir farmacológicamente el efecto de colina sobre los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , decidimos utilizar una concentración de colina 10 mM para llevar a cabo el resto de los experimentos (Alkondon y Albuquerque, 2006; Alkondon *et al.*, 1997; Arnaiz-Cot *et al.*, 2008).

Habitualmente, la estimulación de los receptores nicotínicos resulta en una activación inicial, en la que se produce la apertura del canal iónico, seguida de una desensibilización en la que el receptor pierde su funcionalidad. En concreto, el receptor nicotínico  $\alpha_7$  se caracteriza por presentar una cinética de desensibilización rápida (Hogg *et al.* 2003). En base a estos conceptos, el efecto observado con colina debería desaparecer a medida que los receptores se desensibilizan. En concreto, en 1997 el grupo de Alkondon *et al.*, describió que la exposición continua de neuronas hipocampales a colina o acetilcolina (durante aproximadamente 10 minutos) resultó en una desensibilización de los receptores  $\alpha_7$  (Alkondon *et al.*, 1997). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, la exposición a colina durante 70 minutos, produjo una reducción de la señal que no revirtió a lo largo del tiempo.

Se ha descrito que la exposición crónica a nicotina conlleva un incremento en el número de receptores nicotínicos, resultante de un mecanismo compensatorio. Este proceso se ha observado tanto en los receptores  $\alpha_7$  como los  $\alpha_4\beta_2$  en diferentes regiones cerebrales (Picciotto *et al.*, 2008; Gotti *et al.*, 2009) aunque parece que son los receptores que poseen la subunidad  $\beta_2$  los que parecen que sufrir un mayor

incremento de expresión tras la exposición crónica a nicotina. En el caso de los receptores  $\alpha_7$ , este incremento de la expresión se produce en menor medida, debido a su menor afinidad por la nicotina.

Coutcher *et al.*, observaron, en 1992, que la ingesta de colina produce un incremento en el número de receptores nicotínicos a nivel cerebral en ratas, lo cual podría explicar la capacidad de colina para modular la transmisión sináptica durante un largo periodo de tiempo. En cambio, Alkondon *et al.*, en un trabajo publicado en 1997 postularon que la presencia de colina durante un periodo de tiempo prolongado (10 días) conlleva una disminución del número de receptores nicotínicos  $\alpha_7$  funcionales.

Son varios los mecanismos que explican el proceso de sobre-expresión. Por un lado, parece que los agonistas nicotínicos potencian el ensamblaje de los receptores nicotínicos en el retículo endoplásmico (Picciotto *et al.*, 2008; Dani y De Biasi, 2001). Otros grupos han observado una disminución en la velocidad de renovación de los receptores  $\alpha_4\beta_2$  en presencia de nicotina, aunque hay bastante controversia al respecto (Peng *et al.*, 1994; Bencherif *et al.*, 2005; Kishi y Steinbach, 2006). También se ha descrito que un incremento en la velocidad de transporte del receptor a la superficie celular estaría implicado en este fenómeno (Govind *et al.*, 2009). Un concepto que todavía no se conoce con exactitud es si este incremento en el número de receptores conlleva un incremento de su funcionalidad.

Sin embargo, es importante recordar que se trata de un proceso producido tras una exposición crónica a agonistas nicotínicos, por lo que este aumento de la expresión no podría explicar la reducción del fEPSP observada en presencia de colina, cuyo inicio tiene lugar a los 2-3 minutos de la exposición a colina y es capaz de perdurar, al menos, durante 70 minutos. Sin embargo, es cierto que en trabajos como el de Mielke y Mealing, se ha descrito que en el interior de las células hipocámpales existe una reserva de subunidades  $\alpha_7$  listas para ser transportadas a la superficie celular, lo que permitiría responder rápidamente a diversos estímulos (Mielke y Mealing, 2009).

En un inicio, en vista a estos resultados, nos planteamos que este efecto podría explicarse por una activación de los receptores  $\alpha_7$  localizados en las interneuronas hipocámpales, lo cual produciría una potenciación de la liberación de GABA. El resultado final de la liberación de GABA por parte de las interneuronas va a depender de las subunidades implicadas y de la conectividad neuronal, ya que como se ha descrito anteriormente, puede resultar en una inhibición o desinhibición de la neurona piramidal (Ji y Dani, 2000). Podría ser que la reducción del fEPSP en presencia de

colina registrada en las dendritas de las neuronas piramidales se obtuviera como consecuencia de la inhibición de la neurona piramidal.

El hecho de que la FV no se viera modificada tras la aplicación del compuesto, medida en un amplio rango de intensidades de estimulación, sugiere que el efecto observado no se produce como consecuencia de una reducción en el número de fibras reclutadas (Andersen *et al.*, 1978).

### **3. COLINA Y EXCITABILIDAD NEURONAL**

Dado que la activación de receptores nicotínicos a nivel presináptico en las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas conduce a un incremento de la probabilidad de liberación del neurotransmisor como consecuencia de la entrada de  $Ca^{+2}$  a la terminal presináptica, decidimos utilizar un protocolo de facilitación por pares de pulsos. Este protocolo nos permitiría obtener información sobre si el efecto de colina sobre la transmisión sináptica estaba relacionado con un mecanismo presináptico en el que se viera modificada la probabilidad de liberación del neurotransmisor, en concreto de glutamato.

Sin embargo, los resultados obtenidos revelaron que la modulación de la transmisión sináptica observada con colina no está relacionada con un mecanismo presináptico. Estos resultados difieren con los obtenidos por el grupo de Mielke *et al.*, (2011), donde observan que colina a una concentración de 500  $\mu$ M es capaz de incrementar la facilitación por pares de pulsos, de forma significativa en intervalos inferiores a 100 ms.

En base a los resultados obtenidos, en los que parece que colina ejerce una modulación de la transmisión sináptica en diferentes regiones hipocampales, que no está relacionada con procesos presinápticos y donde, en principio, no parece que estén relacionados procesos de desensibilización o sobre-expresión de receptores, pensamos que el estudio de su efecto sobre la espiga poblacional podría aportarnos información sobre una posible modulación de los receptores nicotínicos localizados a nivel postsináptico.

El disparo de potenciales de acción de forma sincrónica de las neuronas piramidales se puede registrar a nivel extracelular en forma de espiga poblacional, cuya amplitud está relacionada con el número de neuronas que disparan de forma sincrónica y se ha utilizado en numerosos estudios para evaluar cambios en la excitabilidad media neuronal (Andersen *et al.* 1971; Lopez-Aguado *et al.*, 2000)



La estimulación de las colaterales de Schaffer provoca la liberación sináptica de glutamato que activa sus receptores postsinápticos produciendo una corriente de entrada. Dicha corriente se puede registrar extracelularmente en la zona de las dendritas donde se produce como un sumidero activo de corriente, y en la zona del soma, más alejada, como una fuente pasiva de corriente. Por el contrario, en el caso del registro extracelular de la espiga poblacional, que corresponde al disparo sincrónico de potenciales de acción en una población de neuronas, el sumidero activo de corriente se localiza en el soma de las neuronas y la fuente pasiva de corriente se encuentra en las dendritas más distales (Andersen *et al.*, 1971).

En la región CA1, la espiga poblacional suele registrarse en el *stratum pyramidale*, donde se localizan los somas neuronales. La aplicación de colina 10 mM produjo una considerable potenciación de la espiga poblacional, únicamente cuando ésta se obtuvo por estimulación ortodrómica, tras la estimulación en *stratum radiatum*, con la consecuente liberación de neurotransmisor en la terminal presináptica y el inicio del potencial de acción cerca del soma de la neurona postsináptica y su propagación a nivel axonal. Sin embargo, tras una estimulación antidrómica, en la región alveolar del hipocampo, donde se localizan los axones de las neuronas piramidales, obtuvimos espigas poblacionales cuya amplitud no se vio modificada en presencia de colina.

Teniendo en cuenta el efecto de colina sobre la espiga poblacional, decidimos utilizar un agonista distinto de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  como es GTS-21 y observar su efecto sobre la espiga poblacional. Este compuesto es un derivado sintético de la anabaseína que activa de forma selectiva los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  (de Fiebre *et al.*, 1995; Briggs *et al.*, 1997).

En un principio nos planteamos que la reducción de la amplitud de la espiga poblacional ejercida por GTS-21 sobre la espiga poblacional se debía a una activación de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  localizados en las interneuronas hipocampales. La activación de las interneuronas que se encuentran inervando las neuronas piramidales y la consecuente potenciación de la liberación de GABA conduciría a una entrada de iones  $\text{Cl}^-$  al interior de la neurona piramidal produciendo una hiperpolarización de la misma y, por lo tanto, una reducción de la excitabilidad neuronal. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro grupo, donde GTS-21 produce una reducción del fEPSP que no revierte en presencia del antagonista de receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , MLA, hizo que nos planteáramos que, tal vez, el efecto de GTS-21 sobre la espiga poblacional se debe a un mecanismo independiente de receptores nicotínicos.

En experimentos llevados a cabo en receptores de serotonina 5-HT<sub>3</sub> de ratón y humano, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, se ha observado que GTS-21 y sus metabolitos pueden actuar como agonistas o antagonistas de este tipo de receptor. Por lo que consideramos que tal vez, el efecto de GTS-21 se deba a una acción sobre estos receptores. En ratón, GTS-21 se comportaría como un antagonista de este tipo de receptor, pero sus metabolitos se comportarían como agonistas parciales. En cambio, tanto GTS-21 como sus metabolitos tienen un efecto antagónico sobre los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> humanos (Machu *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006)

Los receptores de serotonina 5-HT<sub>3</sub> son receptores iónicos activados por ligando, que cuando se activan permiten el paso de cationes (Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) al interior celular, dando lugar a corrientes despolarizantes. En el hipocampo, se ha descrito su localización en algunos tipos de interneuronas, entre otras, las interneuronas en cesto y las interneuronas que inervan las dendritas de las células principales. La localización de este tipo de receptor puede ser tanto postsináptica como presináptica, donde actuaría potenciando la liberación de GABA. Se ha propuesto que la activación de este receptor conllevaría un incremento de las corrientes espontáneas postsinápticas inhibitorias mediadas por GABA en las células piramidales y que reduciría la estimulación excitatoria en CA1 proveniente de las neuronas piramidales de CA3.

Es posible que, en rodajas hipocámpales de rata, GTS-21 se comporte como un agonista del receptor 5-HT<sub>3</sub>, potenciando la liberación de GABA y reduciendo la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1.

#### **4. LOS RECEPTORES GABA NO ESTÁN IMPLICADOS EN LA MODULACIÓN EJERCIDA POR COLINA**

McQuiston y Madison publicaron, en 1999, un trabajo realizado en rodajas hipocámpales de rata, en el que distinguen tres tipos diferentes de interneuronas en función de su respuesta a la aplicación de acetilcolina. Una de las poblaciones se caracteriza por dar lugar a respuestas nicotínicas rápidas mediadas únicamente por receptores nicotínicos  $\alpha_7$ . Este grupo englobaría interneuronas de diferentes morfologías y cuyos axones se localizarían en diferentes capas de la estructura hipocámpal, excepto en el *stratum pyramidale*. Sugieren que estas interneuronas actuarían ejerciendo una inhibición *feedforward*, recibiendo estímulos de las fibras que se adentran en la región CA1 e inhibiendo las áreas donde se localizan las dendritas

de las células piramidales (McQuiston y Madison, 1999). Las interneuronas O-ML, tal y como se ha descrito brevemente en la introducción de esta tesis, poseen el soma y las dendritas dispuestas de forma paralela al *stratum alveus* y sus axones llegan hasta el *stratum lacunosum-moleculare*. En esta región conectan con las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la región CA1 (Griguoli y Cherubini, 2012). Este tipo de interneuronas se caracteriza por responder a acetilcolina con una respuesta mediada tanto por receptores  $\alpha 7$  como no  $\alpha 7$ . Por último, existe una población de interneuronas que no responde a la aplicación de acetilcolina.

Una posible hipótesis que explicaría la reducción del fEPSP observado en presencia de colina sería la activación de receptores nicotínicos  $\alpha 7$  localizados en las interneuronas hipocampales. La activación de este subtipo de receptor a nivel somato-dendrítico conduce a un incremento de la excitabilidad neuronal y a la generación de potenciales de acción, con una potenciación de la liberación de GABA que finalmente conduce a una inhibición o desinhibición de la neurona piramidal, dependiendo de la conectividad neuronal. En concreto, en experimentos llevados a cabo tanto en cultivo como en rodajas hipocampales, en los que las interneuronas fueron perfundidas con colina a diferentes concentraciones, se observó como ésta, a través de receptores nicotínicos  $\alpha 7$  es capaz de facilitar la liberación de GABA a través de un mecanismo dependiente de la generación de potenciales de acción (Alkondon *et al.*, 1999; Arnaiz-Cot *et al.*, 2008).

Con el fin de evaluar si el efecto de colina sobre la transmisión sináptica se debe a una potenciación de la liberación de GABA por parte de las interneuronas que conectan con las dendritas de las neuronas piramidales, mediada por receptores nicotínicos  $\alpha 7$ , llevamos a cabo experimentos en los que aplicamos picrotoxina, un antagonista de los receptores GABA A y CGP 55845, un antagonista de los receptores GABA B. Sin embargo, la reducción de la señal que se produce en presencia de colina permanece a pesar del bloqueo de los distintos receptores GABA, lo que sugiere que el efecto observado no se produce como consecuencia de una potenciación de la liberación de este neurotransmisor.

## 5. FARMACOLOGÍA DE LA ACCIÓN MEDIADA POR COLINA

### 5.1. LOS AGONISTAS $\alpha_7$ NO REPRODUCEN EL EFECTO DE COLINA

En vista a los resultados obtenidos con colina, tanto en el fEPSP como en la espiga poblacional, optamos por la utilización de otros agonistas nicotínicos tales como GTS-21, PNU 282987 o nicotina, con el fin de observar su efecto sobre la transmisión sináptica.

Por un lado, la utilización del agonista selectivo de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  PNU 282987 en una concentración 30  $\mu\text{M}$ , que está descrito que activa receptores nicotínicos  $\alpha_7$  en neuronas hipocampales en cultivo, no consiguió producir una reducción significativa del fEPSP (Hajós *et al.*, 2005; Bodnar *et al.*, 2005). Tras la aplicación de GTS-21 30  $\mu\text{M}$  obtuvimos una reducción del fEPSP, que al igual que en la espiga poblacional, podría explicarse con una posible activación de receptores 5-HT<sub>3</sub> en las interneuronas presentes en la región CA1, que conlleve una potenciación de la liberación de GABA.

Finalmente, decidimos aplicar nicotina 100  $\mu\text{M}$ , agonista no selectivo de receptores nicotínicos, que actúa sobre todos los subtipos de receptor nicotínico presentes en las neuronas hipocampales. Los receptores  $\alpha_4\beta_2$  presentan mayor afinidad por este compuesto que los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , sin embargo, en presencia de este compuesto, el fEPSP no se vio modificado.

### 5.2. EL EFECTO PRODUCIDO CON COLINA NO REVIERTE CON ANTAGONISTAS NICOTÍNICOS

Las sorprendentes respuestas que obtuvimos en presencia de los diferentes agonistas nicotínicos nos hizo plantearnos si el efecto que observamos en presencia de colina estaba realmente mediado por receptores nicotínicos  $\alpha_7$ . Para confirmar la implicación del receptor nicotínico  $\alpha_7$  en este efecto decidimos utilizar diferentes antagonistas nicotínicos, esperando que en presencia del antagonista, la reducción del fEPSP observado en presencia de colina revirtiera.

En primer lugar, utilizamos MLA, un potente antagonista selectivo de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  (Ward *et al.*, 1990). Se ha descrito que una concentración picomolar de este compuesto es capaz de bloquear de forma reversible las corrientes de receptores nicotínicos  $\alpha_7$  expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* y en cultivo de

neuronas hipocampales (Davies *et al.*, 1999). En los experimentos llevados a cabo en nuestro grupo, utilizamos una concentración 100 nM, primero en ausencia y luego en presencia de colina. En presencia de colina, MLA no fue capaz de revertir la reducción del fEPSP ni tampoco la potenciación de la espiga poblacional.

La aplicación de MLA en ausencia de colina en ningún caso modificó la señal basal, por lo que se descarta una actividad tónica colinérgica mediada por el receptor nicotínico  $\alpha_7$  que module en condiciones basales la transmisión sináptica.

Consideramos conveniente utilizar otro antagonista selectivo de receptores nicotínicos  $\alpha_7$ . Pretratamos la rodaja hipocampal con  $\alpha$ -bungarotoxina 100 nM y después la aplicamos en presencia de colina. El resultado que obtuvimos es que la reducción del fEPSP no revirtió en presencia del antagonista.

Los resultados obtenidos nos sugieren que colina produce una modulación de la transmisión sináptica a través de un mecanismo independiente de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ . Se ha descrito que colina es un inhibidor de los receptores nicotínicos  $\alpha_3\beta_4$  expresados en ovocitos (González-Rubio *et al.*, 2006) y  $\alpha_3\beta_4^*$  presentes en rodajas de hipocampo (Alkondon *et al.*, 2006). Con la finalidad de descartar un posible efecto a través de este u otro subtipo de receptor nicotínico, aplicamos un antagonista no selectivo de receptores nicotínicos, mecamilamina. Sin embargo, este compuesto tampoco logró revertir el efecto de colina, descartando la implicación del receptor  $\alpha_3\beta_4$ .

### 5.3. LA APLICACIÓN DE MODULADORES ALOSTÉRICOS NO MODIFICA EL EFECTO DE COLINA

Utilizamos una herramienta farmacológica distinta, moduladores alostéricos, para el estudio del mecanismo de acción de colina sobre la transmisión sináptica. En un grupo de experimentos, tratamos las rodajas hipocampales con el modulador alostérico PNU 120596. Este compuesto ha demostrado comportarse como un modulador alostérico positivo de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  en vivo y en vitro, que aumenta el tiempo medio de apertura del canal, lo que se traduce en un incremento de la corriente máxima provocada por el agonista y en un retardo del declive de la corriente. La eficacia de este compuesto en receptores nativos fue comprobada a través del registro de corrientes en interneuronas de la región CA1 del *stratum radiatum* (Hurst *et al.*, 2005).

En nuestros experimentos no observamos que PNU120596 incremente el efecto de colina, la reducción del fEPSP es similar en ausencia y en presencia del compuesto.

Obtuvimos el mismo resultado tras la utilización de 5-OH-indol, otro modulador alostérico positivo de receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , capaz de potenciar las respuestas de este subtipo de receptor.

La ausencia de potenciación por parte de dos moduladores alostéricos diferentes, el hecho de que los agonistas nicotínicos no reproduzcan el efecto de colina y de que los antagonistas nicotínicos no reviertan su efecto, nos sugirió, una vez más, que el receptor nicotínico  $\alpha_7$  no está implicado en la modulación de la transmisión sináptica ejercida por colina.

#### 5.4. EFECTO DE COLINA EN RODAJAS HIPOCAMPALES DE RATONES KNOCK-OUT PARA EL RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha_7$

Con el fin de confirmar la no implicación de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  en el efecto de colina, decidimos estudiar su efecto en ratones *knock-out* para el receptor nicotínico  $\alpha_7$ . Los resultados obtenidos tanto en ratones *knock-out* como en ratones *wild type*, nos confirman que este subtipo de receptor no puede mediar la reducción del fEPSP observada con colina, ya que en ambos modelos se obtuvo una reducción de la señal cuyas diferencias no son estadísticamente significativas. El mecanismo por el que colina produce esta depresión es efectivo tanto en rata como en ratón y el grado de bloqueo en ambos modelos es similar. La aplicación de MLA, al igual que en el resto de los casos, no es capaz de revertir la depresión de la transmisión sináptica.

En lo referente a la espiga poblacional, la potenciación de la señal en presencia de colina en ratón *knock-out* corrobora que el efecto no puede estar mediado por receptores  $\alpha_7$ .

#### 5.5. LA APLICACIÓN DE ATROPINA NO PREVIENE EL EFECTO EJERCIDO POR COLINA

De cara a obtener información adicional sobre el mecanismo de acción por el que colina ejerce su efecto sobre la transmisión sináptica y puesto que algunos autores han descrito que colina activa los receptores muscarínicos de tipo M<sub>3</sub>,

presentes en neuronas piramidales y células granulares del giro dentado (Levey et al., 1995; Tayebati et al., 2002; Andersen et al., 2007), decidimos utilizar un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos, atropina (50  $\mu$ M). Sin embargo, en base a los resultados obtenidos, donde la reducción de la señal es similar en presencia y en ausencia del compuesto, parece que el efecto de colina no está relacionado con la activación de receptores muscarínicos  $M_3$ .

## 6. EFFECTO DE COLINA SOBRE LA PLASTICIDAD NEURONAL

La implicación del hipocampo en procesos de atención, memoria o aprendizaje es ampliamente conocida y son numerosos los estudios que han demostrado la implicación de la transmisión colinérgica (Jones et al., 1999; Levin et al., 1993; Levin et al., 1998; McKay et al., 2007). El fenómeno de potenciación de larga duración que tiene lugar a nivel hipocampal se considera la base celular del aprendizaje y la memoria, y existen múltiples publicaciones que han relacionado déficits en procesos de memoria con LTP alteradas (Martin et al., 2000).

Varios grupos han descrito la implicación de los receptores nicotínicos en la inducción de la LTP. Algunos de ellos postulan que la activación de receptores nicotínicos  $\alpha_7$  por acetilcolina liberada de forma endógena, tiene un papel en la función cognitiva y que facilita la inducción de la LTP de una forma tiempo dependiente (Ge y Dani, 2005; Gu y Yakel, 2011; Nakauchi y Sumikawa, 2012). Entre ellos se encuentra el trabajo del grupo de Ji et al., que en 2001, observó que la activación de receptores nicotínicos tanto en las neuronas piramidales como en las interneuronas puede modificar la inducción de LTP en ratón *wild type*.

En sus experimentos, a través del registro a nivel de las neuronas piramidales, observan como una estimulación suave en las colaterales de Schaffer que es capaz de generar plasticidad de corta duración (STP) en condiciones control, puede inducir en la mayoría de las neuronas una LTP en presencia de acetilcolina, únicamente cuando la corriente nicotínica a nivel postsináptico fue activada coincidiendo con la estimulación, de forma que la despolarización generada contribuyera a la liberación del receptor NMDA del ion  $Mg^{+2}$ . Por otro lado, asumiendo que la mayoría de las corrientes nicotínicas hipocampales se producen a través de receptores  $\alpha_7$ , con gran permeabilidad al  $Ca^{+2}$ , se puede intuir que su activación, además de producir una despolarización, contribuirá a la señal de calcio mediada por los receptores glutamatérgicos, potenciando la LTP. También observan que los receptores nicotínicos

localizados a nivel presináptico pueden contribuir a la inducción de la LTP, incrementando la liberación de glutamato.

Sin embargo este grupo, por otro lado, observa que la activación de receptores nicotínicos a nivel de las interneuronas, con la consecuente liberación de GABA e inhibición de la neurona piramidal, si se produce en el momento adecuado, justo antes o en el mismo instante en el que se produce la estimulación de las colaterales de Schaffer, disminuye de forma considerable la probabilidad de observar plasticidad sináptica (Ji *et al.*, 2001).

Otros grupos, han observado que la aplicación tanto de nicotina como de colina produce una potenciación de la LTP (Welsby *et al.*, 2006; Matsuyama *et al.*, 2000). Welsby *et al.*, en 2006, observaron como la aplicación de nicotina produce una potenciación en la inducción de la LTP, a través de un mecanismo en el que están implicados los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  localizados a nivel postsináptico. En sus experimentos observan el mismo efecto en presencia de colina (Welsby *et al.*, 2006). Este estudio se llevó a cabo en giro dentado. La densidad de receptores nicotínicos  $\alpha_7$  es mayor en la capa molecular de esta región que en CA1 (Fabian-Fine *et al.*, 2001). Es posible que debido a que la conectividad neuronal es diferente en las distintas áreas hipocampales, haya diferencias en el efecto de colina sobre la plasticidad sináptica entre las diferentes áreas. Otros estudios, en cambio, observan que la modulación nicotínica en la inducción de la LTP se produce de forma distinta dependiendo de si se trata de acetilcolina liberada de forma endógena o nicotina exógena, postulando que estarían implicados distintos subtipos de receptor nicotínico (Nakauchi y Sumikawa, 2012).

Por otro lado, hay grupos que postulan que otra forma por la que la aplicación de nicotina es capaz de convertir STP en LTP es por una reducción de la actividad de las interneuronas por la desensibilización de receptores nicotínicos localizados en interneuronas (Kenney y Gould, 2008; Fujii *et al.*, 2000b).

En concreto, el grupo de Fujii *et al.*, en el año 2000, publicó un trabajo en el que se sugería que la activación de receptores nicotínicos no- $\alpha_7$  disminuye el umbral para la inducción de las LTP, obtenidas en la región CA1 del hipocampo de rata. En cambio, observaron que la activación de receptores nicotínicos  $\alpha_7$  actuaría atenuando la inducción de la LTP. En concreto, en sus experimentos comprueban que la aplicación de MLA facilita la inducción de la LTP. Por lo tanto, postulan que los receptores  $\alpha_7$  y los no-  $\alpha_7$  tendrían efectos opuestos en la inducción de la LTP.



En nuestros experimentos, lo que observamos es que colina, además de producir una reducción del fEPSP, también deprime la potenciación de larga duración. Como consecuencia de la depresión de la transmisión sináptica ejercida por colina, la aplicación del tétano no produce potenciación post-tetánica, al contrario de lo que ocurre en condiciones normales. A los 60 minutos de la aplicación del tétano se puede observar como la potenciación de la transmisión es significativamente menor en presencia de colina. El mecanismo por el que se produce esta depresión, en principio y basándonos en los resultados obtenidos, donde MLA no revierte la depresión ejercida por colina, no estaría mediado por el receptor nicotínico  $\alpha_7$ . A pesar de observar una reducción del fEPSP en presencia de colina, el grupo de Mielke *et al.*, (2011) no observa que colina (500  $\mu$ M) produzca una depresión de la potenciación de larga duración durante los 30-40 minutos de registro tras la aplicación del tétano, aunque sí que observan que colina cambia el curso temporal de la LTP. En su trabajo también observan que colina es capaz de provocar depresión de la transmisión sináptica durante la potenciación obtenida tras la aplicación de un tétano. En nuestros experimentos observamos que el grado de depresión del fEPSP ejercido por colina en presencia y en ausencia de estimulación tetánica es similar.

En nuestros experimentos no observamos que colina ejerza una modulación de la transmisión sináptica mediada por un mecanismo presináptico. Tampoco parece que los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  se vean implicados, basándonos en que no observamos desensibilización de receptores, bloqueo por antagonistas o efecto semejante con agonistas nicotínicos.

Sin embargo nos resulta sorprendente que a nivel de fEPSP, colina sea capaz de producir depresión de la transmisión sináptica pero que por otro lado potencie la espiga poblacional obtenida ortodrómicamente de forma considerable. Este último efecto podría estar relacionado con la reversión de la inhibición recurrente que se observa en presencia de colina.

El proceso de inhibición recurrente, se produce como consecuencia de la estimulación de las colaterales de las neuronas piramidales localizadas en el *stratum oriens*, lo que provoca la activación de las interneuronas presentes en esta capa y que finalmente producen una inhibición *feedback*. Por lo tanto, la estimulación en el *stratum oriens* activaría, por un lado, las interneuronas localizadas en esta capa, las colaterales de las neuronas piramidales y las colaterales de Schaffer-fibras comisurales que estimularían las dendritas basales de la neurona piramidal.

Un resultado llamativo es el bloqueo de la inhibición recurrente ejercido por colina, que no se ve alterado en presencia de MLA. Podríamos pensar que colina ejerce el bloqueo de la inhibición recurrente a través de la activación de interneuronas que actúan sobre las interneuronas responsables de la inhibición de la neurona piramidal. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados anteriores, en los que se observa que el GABA liberado por las interneuronas no es el responsable de la depresión ejercida por colina, ya que la aplicación de antagonistas de receptores GABA A y GABA B no revierten la depresión de la transmisión sináptica, es difícil pensar que la reversión de la inhibición de recurrente que observamos en presencia de colina sea consecuencia de un bloqueo de la inhibición *feedback* ejercido por otras interneuronas. El hecho de que la primera espiga no se vea potenciada en presencia de colina se debe a que se trabajó a intensidades donde se obtuvo la respuesta máxima.

## **7. ESTABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA**

Es posible que el efecto de colina se deba a cambios en la estabilidad de la membrana plasmática, teniendo en cuenta que colina es precursor de los fosfolípidos de membrana fosfatidilcolina y esfingomielina. Fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante en membranas eucariotas

Existen mecanismos fisiológicos por los que las células utilizan la descomposición de un número reducido de fosfolípidos para que una señal extracelular active segundos mensajeros a nivel intracelular (Divecha y Irvine, 1995). Esta hidrólisis de fosfolípidos es necesaria para la correcta regulación de las funciones celulares, sin embargo, está descrito que la ruptura de los componentes de la membrana plasmática en condiciones patológicas altera la homeostasis celular y pone en peligro su viabilidad. En concreto, la ruptura de fosfatidilcolina puede dar lugar a la liberación de colina libre. En determinadas condiciones patológicas, como hipoxia o isquemia, se produce un incremento de los niveles de colina en el tejido cerebral como consecuencia de la activación de fosfolipasas (Klein, 2000).

También se han descrito cambios en la concentración de fosfolípidos en cerebros de pacientes con Alzheimer, lo que ha dado lugar al desarrollo de la hipótesis de la degradación de las membranas plasmáticas neuronales como una de las causas de la fisiopatología de esta enfermedad (Tayebati y Amenta, 2013). Como consecuencia de esta ruptura (calcio dependiente) de fosfolípidos de membrana en

procesos neurodegenerativos, se produce un incremento de los niveles de ácidos grasos y de colina libres (Klein, 2000).

Con la finalidad de obtener más información acerca de si la aplicación aguda de colina podría estar provocando una alteración de la estabilidad de la membrana plasmática y como consecuencia alteraciones en la transmisión sináptica, decidimos someter a las rodajas hipocampales a un tratamiento con citicolina o citidina difosfocolina. Este compuesto es un intermediario en la síntesis de fosfolípidos de membrana. Se trata de un mononucleótido formado por ribosa, citosina, pirofosfato y colina. Varios estudios han demostrado que la administración de citicolina incrementa la síntesis de fosfolípidos de membrana, y se le asocia un efecto neuroprotector y neurorreparador en situaciones de isquemia e hipoxia (para revisión exhaustiva, Secades, 2011).

Sin embargo, en los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio se observa que, citicolina 100  $\mu\text{M}$  al contrario que colina, no es capaz de producir ninguna modificación en el fEPSP, por lo que parece el efecto de colina no está relacionado con procesos de estabilización de la membrana plasmática.

La utilización del compuesto H89, nos permitió corroborar esta hipótesis. Tal y como se ha comentado anteriormente, se trata de un inhibidor del enzima colina quinasa. Este enzima cataliza el primer paso de la vía CDP-colina. Si el efecto de colina fuera consecuencia de una alteración en la vía Kennedy o CDP-colina, la aplicación de un inhibidor del enzima colina quinasa debería modular el efecto de colina, sin embargo este efecto no se vio modificado por la preincubación de las rodajas con H89 10  $\mu\text{M}$ .

#### 7.1. LA INHIBICIÓN DE LA RECAPTACIÓN DE COLINA NO INFLUYE EN EL EFECTO SOBRE LOS fEPSP

El cerebro es incapaz de sintetizar colina de *novo*, por lo que necesita obtenerla del fluido extracelular. Al tratarse de una molécula cargada positivamente, es necesario un mecanismo mediado por proteínas para atravesar la membrana lipídica celular. Existen tres mecanismos de transporte de colina al interior celular. En primer lugar, el transportador con alta afinidad para colina (*High-affinity choline transporter* (CHT)), fundamental para el transporte de colina destinada a la síntesis de acetilcolina, localizado en neuronas colinérgicas. Se trata de un transportador dependiente de  $\text{Na}^+$  y sensible a Hemicolinio-3 (Michel *et al.*, 2006).

En segundo lugar, el transportador de baja afinidad para colina (*Low-affinity polyspecific organic cation transporter* (OTC)). Se le relaciona con un transporte no selectivo de colina, por difusión facilitada e independiente de  $\text{Na}^+$ . Este transportador ha sido principalmente estudiado por su implicación en el transporte de cationes orgánicos endógenos, fármacos y tóxicos (Nakata *et al.*, 2013). Se ha descrito la presencia del transportador OTC2 en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo de ratón (Bacq *et al.*, 2012). El transportador OTC3 también se localiza en el hipocampo, sin embargo este subtipo no es capaz de transportar colina (Wu *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 2006)

Y por último, el transportador específico de colina (*Choline specific transporter like protein* (CTL)) con estructura proteica, débilmente dependiente de  $\text{Na}^+$ , localizado en diversas poblaciones neuronales (Traiffort *et al.*, 2005). Se ha descrito la presencia del subtipo CTL1 en células granulares del giro dentado y en las neuronas piramidales del hipocampo de ratas jóvenes y adultas (Traiffort *et al.*, 2005).

La colina que se introduce en la célula a través de sistemas de alta afinidad está fundamentalmente destinada a la síntesis de acetilcolina mientras que la que lo hace a través de sistemas de baja afinidad va a contribuir a la síntesis de fosfolípidos.

Hemicolinio es un inhibidor del transportador con alta afinidad para colina. Este tipo de transporte se produce fundamentalmente en neuronas colinérgicas y está destinado a la síntesis de acetilcolina (Sarter y Parikh, 2005). Sin embargo, este compuesto es capaz de inhibir, con menor afinidad, los transportadores CTL1, presentes en hipocampo (Michel y Bakovic, 2012). Los resultados obtenidos muestran que colina ejerce una reducción de la señal similar en presencia y en ausencia del compuesto, por lo que es probable que este tipo de transportador tampoco esté implicado en el efecto de colina.

## **8. COLINA PRODUCE UN CAMBIO EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA CELULAR**

Colina es una amina cuaternaria, cargada positivamente y soluble en agua. Como ya se ha comentado anteriormente, existen diferentes transportadores de colina, entre los que se encuentra el transportador específico de colina o los transportadores OTC2 y 3, presentes a nivel hipocampal, que podrían actuar permitiendo el paso de

colina al interior celular a medida que aumenta su concentración en el medio de perfusión.

Los transportadores de cationes orgánicos (OTC) son responsables del transporte de cationes al interior celular de forma insaturable, dependiente del gradiente electroquímico a lo largo de la membrana y sensible al potencial de membrana (Shu, 2011). La entrada de colina al interior celular a través de estos transportadores conllevaría la entrada de cargas positivas al interior celular, modificando el potencial de membrana hacia valores menos negativos. Esta despolarización en presencia de colina explica que la aplicación de una corriente despolarizante produzca un incremento del número de disparos de potenciales de acción, comparado con las condiciones control.

Estos resultados registrados a nivel somático serían acordes con los resultados obtenidos durante el registro de la espiga poblacional obtenida por estimulación ortodrómica. En este caso, la aplicación de colina provocó un incremento considerable de la amplitud de la espiga, lo cual concuerda el incremento de la cantidad de disparos registrados a través de registro intracelular en presencia de colina.

Sin embargo, este fenómeno no explicaría la reducción del fEPSP provocado por la aplicación de colina ni la depresión de la LTP. Puede que el mecanismo por el que colina ejerce una reducción del fEPSP y de la LTP no esté relacionado con una entrada de colina al interior neuronal.

## **9. EFECTO DE COLINA SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN RODAJAS HIPOCAMPALES PROCEDENTES DE RATAS ANCIANAS**

En las distintas especies, la expresión de receptores nicotínicos cambia a medida que el individuo se desarrolla y crece. En los humanos, los sitios de unión a nicotina disminuyen a lo largo de la vida en casi todas las regiones cerebrales. En concreto, la expresión de receptores nicotínicos  $\alpha_7$  disminuye progresivamente a lo largo de la vida en la región CA1 del hipocampo y en la corteza entorrinal (Gotti y Clementi, 2004). En concreto, en ratas ancianas se ha demostrado una reducción de la transmisión colinérgica a nivel hipocampal.

A pesar de que el efecto de colina sobre la transmisión sináptica no parece que esté mediado por este subtipo de receptor, nos planteamos que, tal vez, estudiarlo en ratas ancianas nos podría aportar información valiosa sobre su mecanismo de acción, ya que, como se ha comentado anteriormente, a pesar de que la absorción de colina no sufre cambios con la edad, sí se ha observado que los niveles de este compuesto en el hipocampo es mayor en ratas ancianas (Katz-Brull *et al.*, 2002).

Observamos la reducción del fEPSP en presencia de colina, al igual que acontecía con ratas jóvenes. Sin embargo esta reducción fue significativamente menor en ratas ancianas. En este caso también descartamos la implicación de los receptores nicotínicos  $\alpha_7$ , ya que la aplicación de MLA no logra revertir el efecto producido por colina. También resulta sorprendente el efecto de colina sobre la espiga poblacional en ratas ancianas. A diferencia de lo que observamos en ratas jóvenes, al inicio de la aplicación de colina, observamos una breve reducción de la señal, seguida de una potenciación de la espiga que no logra alcanzar los niveles que sí observamos en ratas jóvenes. En este caso, al igual que en el resto, la aplicación de MLA no logra revertir la potenciación.

Existen estudios que confirman que la transmisión glutamatérgica a nivel hipocampal sufre modificaciones relacionadas con la edad. Se ha descrito que las subunidades que dan lugar a los receptores AMPA y NMDA sufren una reducción en ratas ancianas que conlleva una disminución de la transmisión excitatoria mediada por glutamato (Shi *et al.*, 2007). Este hecho explicaría que las respuestas en este modelo experimental sean inferiores a las obtenidas en ratas más jóvenes. Por otro lado, a pesar de que ni el número de neuronas ni el número de sinapsis se vean alterados en ratas ancianas, es posible que los mecanismos por los que colina ejerce una modulación de la transmisión sináptica, sí se vieran afectados. Se ha descrito que el transporte de colina de alta afinidad no sufre modificaciones con la edad (Wheeler, 1985; Shi *et al.*, 2007). Sin embargo, es posible que en ratas ancianas se vea alterado el número de transportadores de cationes orgánicos, responsables del transporte de cationes al interior celular de forma insaturable, capaces de transportar colina al interior celular y que por ello, observemos que la potenciación de la espiga poblacional que observamos en presencia del compuesto sea menor en ratas ancianas que en ratas jóvenes.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis demuestran que en los diferentes modelos experimentales, la modulación de la transmisión sináptica

observada en presencia de colina no está mediada por receptores nicotínicos, ya que ni los antagonistas logran revertir su efecto, ni los agonistas nicotínicos logran reproducirlo. Los resultados obtenidos en ratón *knock-out*, complementan la corroboración de esta hipótesis. En principio, el efecto de colina no estaría relacionado con un cambio de la estabilidad de la membrana plasmática, como consecuencia de su participación en la síntesis de fosfolípidos. Es posible que el mecanismo por el que colina ejerce una reducción del fEPSP y de la LTP sea distinto al que media en la potenciación de la espiga poblacional. En este sentido, es posible que la entrada de colina a través de transportadores de cationes orgánicos presentes en el hipocampo contribuya a esta potenciación.

# **CONCLUSIONES**



En base a la discusión de los resultados obtenidos en esta tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Colina ejerce una modulación de la transmisión sináptica que se traduce en:
  - ✓ Reducción reversible de la pendiente del potencial postsináptico excitatorio de campo. La depresión de la señal es dosis-dependiente y se reproduce en *stratum radiatum*, *stratum oriens* y giro dentado.
  - ✓ Potenciación de la espiga poblacional obtenida por estimulación ortodrómica y ausencia de modulación en la espiga poblacional obtenida por estimulación antidrómica.
  - ✓ Modulación de la plasticidad sináptica.
  - ✓ Bloqueo de la inhibición recurrente.
  
- Los resultados obtenidos mediante la utilización de diferentes herramientas farmacológicas, así como por el estudio en modelos animales *knock out* para el receptor nicotínico  $\alpha_7$ , sugieren que estos receptores no están implicados en dicha modulación.
  
- Colina ejerce una modulación de la transmisión sináptica tanto en ratas adultas como en ratas ancianas.
  
- El mecanismo de acción de colina está relacionado con un cambio en el potencial de membrana celular.
  
- Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que es necesario continuar la investigación con el fin de estudiar con mayor precisión el mecanismo por el cual colina ejerce una modulación de la transmisión sináptica.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- ALBRIGHT, C.D., TSAI, A.Y., FRIEDRICH, C.B., MAR, M.H. y ZEISEL, S.H., 1999. Choline availability alters embryonic development of the hippocampus and septum in the rat. *Brain research. Developmental brain research*, **113**(1-2), pp. 13-20.
- ALBUQUERQUE, E.X., ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., CASTRO, N.G., SCHRATTENHOLZ, A., BARBOSA, C.T., BONFANTE-CABARCAS, R., ARACAVAL, Y., EISENBERG, H.M. y MAELICKE, A., 1997. Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **280**(3), pp. 1117-1136.
- ALBUQUERQUE, E.X., PEREIRA, E.F., ALKONDON, M. y ROGERS, S.W., 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, **89**(1), pp. 73-120.
- ALBUQUERQUE, E.X., PEREIRA, E.F., CASTRO, N.G., ALKONDON, M., REINHARDT, S., SCHRODER, H. y MAELICKE, A., 1995. Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **757**, pp. 48-72.
- ALEXANDER, S.P.H., MATHIE, A. y PETERS, J.A., 2008. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edn. *Br J Pharmacol* **153** (Suppl. 2): S1–S209
- ALKONDON, M. y ALBUQUERQUE, E.X., 2006. Subtype-specific inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by choline: a regulatory pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **318**(1), pp. 268-275.
- ALKONDON, M. y ALBUQUERQUE, E.X., 2004. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Progress in brain research*, **145**, pp. 109-120.
- ALKONDON, M. y ALBUQUERQUE, E.X., 1993. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **265**(3), pp. 1455-1473.
- ALKONDON, M., BRAGA, M.F., PEREIRA, E.F., MAELICKE, A. y ALBUQUERQUE, E.X., 2000. Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors and Modulation of Gabaergic Synaptic Transmission in the Hippocampus. *European journal of pharmacology*, **393**(1-3), pp. 59-67.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F. y ALBUQUERQUE, E.X., 1998. Alpha-Bungarotoxin- and Methyllycaconitine-Sensitive Nicotinic Receptors Mediate Fast Synaptic Transmission in Interneurons of Rat Hippocampal Slices. *Brain research*, **810**(1-2), pp. 257-263.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F. y ALBUQUERQUE, E.X., 1996. Mapping the location of functional nicotinic and gamma-aminobutyric acidA receptors on hippocampal neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **279**(3), pp. 1491-1506.

- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., BARBOSA, C.T. y ALBUQUERQUE, E.X., 1997. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **283**(3), pp. 1396-1411.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., CORTES, W.S., MAELICKE, A. y ALBUQUERQUE, E.X., 1997. Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *The European journal of neuroscience*, **9**(12), pp. 2734-2742.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., EISENBERG, H.M. y ALBUQUERQUE, E.X., 1999. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **19**(7), pp. 2693-2705.
- ALTMAN, J., BRUNNER, R.L. y BAYER, S.A., 1973. The hippocampus and behavioral maturation. *Behavioral biology*, **8**(5), pp. 557-596.
- AMARAL, D.G. y KURZ, J., 1985. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *The Journal of comparative neurology*, **240**(1), pp. 37-59.
- AMARAL, D.G. y LAVENEX, P., 2007. Hippocampal neuroanatomy. *Andersen, P.; Morris, R.; Amaral, D.; Bliss, T.; O'Keefe, J.* . 1 edn. New York: Oxford University Press, pp. 37.
- AMARAL, D.G., SCHARFMAN, H.E. y LAVENEX, P., 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research*, **163**, pp. 3-22.
- AMARAL, D.G. y WITTER, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, **31**(3), pp. 571-591.
- AMARAL, D.G. y WITTER, M.P., 1995. Hippocampal formation. In: G. PAXINOS, ed, *The Rat Nervous System*. 2ª edn. San Diego: Academic Press.
- ANDERSEN, P., BLISS, T.V. y SKREDE, K.K., 1971. Unit analysis of hippocampal population spikes. *Experimental brain research*, **13**(2), pp. 208-221.
- ANDERSEN, P., MORRIS, R., AMARAL, D., BLISS, T. y O'KEEFE, J., 2007. Historical Perspective: Proposed Functions, biological characteristics, and neurobiological models of the hippocampus. In: P. ANDERSEN, R. MORRIS, D. AMARAL, T. BLISS and J. O'KEEFE, eds, *The hippocampus book* . 1 edn. New York: Oxford University Press, pp. 9.

- ANDERSEN, P., SILFVENIUS, H., SUNDBERG, S.H., SVEEN, O. y WIGSTROM, H., 1978. Functional characteristics of unmyelinated fibres in the hippocampal cortex. *Brain research*, **144**(1), pp. 11-18.
- ANDERSEN, P., SOLENG, A.F. y RAASTAD, M., 2000. The hippocampal lamella hypothesis revisited. *Brain research*, **886**(1-2), pp. 165-171.
- ANWYL, R., 1991. Modulation of vertebrate neuronal calcium channels by transmitters. *Brain research. Brain research reviews*, **16**(3), pp. 265-281.
- ARNAIZ-COT, J.J., GONZALEZ, J.C., SOBRADO, M., BALDELLI, P., CARBONE, E., GANDIA, L., GARCIA, A.G. y HERNANDEZ-GUIJO, J.M., 2008. Allosteric modulation of alpha 7 nicotinic receptors selectively depolarizes hippocampal interneurons, enhancing spontaneous GABAergic transmission. *The European journal of neuroscience*, **27**(5), pp. 1097-1110.
- ASCHER, P. y NOWAK, L., 1988. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *The Journal of physiology*, **399**, pp. 247-266.
- ASCOLI, G.A., ALONSO-NANCLARES, L., ANDERSON, S.A., BARRIONUEVO, G., BENAVIDES-PICCIONE, R., BURKHALTER, A., BUZSAKI, G., CAULI, B., DEFELIPE, J., FAIREN, A., FELDMEYER, D., FISHELL, G., FREGNAC, Y., FREUND, T.F., GARDNER, D., GARDNER, E.P., GOLDBERG, J.H., HELMSTAEDTER, M., HESTRIN, S., KARUBE, F., KISVARDAY, Z.F., LAMBOLEZ, B., LEWIS, D.A., MARIN, O., MARKRAM, H., MUNOZ, A., PACKER, A., PETERSEN, C.C., ROCKLAND, K.S., ROSSIER, J., RUDY, B., SOMOGYI, P., STAIGER, J.F., TAMAS, G., THOMSON, A.M., TOLEDO-RODRIGUEZ, M., WANG, Y., WEST, D.C. y YUSTE, R., 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience*, **9**(7), pp. 557-568.
- BACQ, A., BALASSE, L., BIALA, G., GUIARD, B., GARDIER, A.M., SCHINKEL, A., LOUIS, F., VIALOU, V., MARTRES, M.P., CHEVARIN, C., HAMON, M., GIROS, B. y GAUTRON, S., 2012. Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearance and antidepressant response. *Molecular psychiatry*, **17**(9), pp. 926-939.
- BARTOS, M., ALLE, H. y VIDA, I., 2010. Role of microcircuit structure and input integration in hippocampal interneuron recruitment and plasticity. *Neuropharmacology*, **60**(5), pp. 730-739.
- BARTUS, R.T., DEAN, R.L., 3RD, BEER, B. y LIPPA, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (New York, N. Y.)*, **217**(4558), pp. 408-414.
- BELLUARDO, N., MUDO, G., BLUM, M. y FUXE, K., 2000. Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behavioural brain research*, **113**(1-2), pp. 21-34.
- BEN-ARI, Y., KHAZIPOV, R., LEINEKUGEL, X., CAILLARD, O. y GAIARSA, J.L., 1997. GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends in neurosciences*, **20**(11), pp. 523-529.

- BENCHERIF, M., FOWLER, K., LUKAS, R.J. y LIPPIELLO, P.M., 1995. Mechanisms of up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal rat brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **275**(2), pp. 987-994.
- BERGER, F., GAGE, F.H. y VIJAYARAGHAVAN, S., 1998. Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **18**(17), pp. 6871-6881.
- BERTRAND, D. y GOPALAKRISHNAN, M., 2007. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*, **74**(8), pp. 1155-1163.
- BETTLER, B., KAUPMANN, K., MOSBACHER, J. y GASSMANN, M., 2004. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiological Reviews*, **84**(3), pp. 835-867.
- BIASI, E., 2011. The effects of dietary choline. *Neuroscience bulletin*, **27**(5), pp. 330-342.
- BJELLAND, I., TELL, G.S., VOLLSET, S.E., KONSTANTINOVA, S. y UELAND, P.M., 2009. Choline in anxiety and depression: the Hordaland Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **90**(4), pp. 1056-1060.
- BLISS, T., GRAHAM, C. y MORRIS, R., 2007. Synaptic plasticity in the hippocampus. In: P. ANDERSEN, R. MORRIS, D. AMARAL, T. BLISS and J. O'KEEFE, eds, *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press, pp. 343-460.
- BLISS, T.V. y LOMO, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, **232**(2), pp. 331-356.
- BLUSZTAJN, J.K., 1998. Choline, a vital amine. *Science (New York, N.Y.)*, **281**(5378), pp. 794-795.
- BLUSZTAJN, J.K. y ZEISEL, S.H., 1989. 1,2-sn-diacylglycerol accumulates in choline-deficient liver. A possible mechanism of hepatic carcinogenesis via alteration in protein kinase C activity? *FEBS letters*, **243**(2), pp. 267-270.
- BLUSZTAJN, J.K., ZEISEL, S.H. y WURTMAN, R.J., 1979. Synthesis of lecithin (phosphatidylcholine) from phosphatidylethanolamine in bovine brain. *Brain research*, **179**(2), pp. 319-327.
- BODNAR, A.L., CORTES-BURGOS, L.A., COOK, K.K., DINH, D.M., GROPPPI, V.E., HAJOS, M., HIGDON, N.R., HOFFMANN, W.E., HURST, R.S., MYERS, J.K., ROGERS, B.N., WALL, T.M., WOLFE, M.L. y WONG, E., 2005. Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of medicinal chemistry*, **48**(4), pp. 905-908.
- BRIGGS, C.A., ANDERSON, D.J., BRIONI, J.D., BUCCAFUSCO, J.J., BUCKLEY, M.J., CAMPBELL, J.E., DECKER, M.W., DONNELLY-ROBERTS, D., ELLIOTT, R.L., GOPALAKRISHNAN, M.,

- HOLLADAY, M.W., HUI, Y.H., JACKSON, W.J., KIM, D.J., MARSH, K.C., O'NEILL, A., PRENDERGAST, M.A., RYTHER, K.B., SULLIVAN, J.P. y ARNERIC, S.P., 1997. Functional characterization of the novel neuronal nicotinic acetylcholine receptor ligand GTS-21 in vitro and in vivo. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **57**(1-2), pp. 231-241.
- BROIDE, R.S. y LESLIE, F.M., 1999. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Molecular neurobiology*, **20**(1), pp. 1-16.
- BUCHMAN, A.L., 2009. The addition of choline to parenteral nutrition. *Gastroenterology*, **137**(5 Suppl), pp. S119-28.
- BUHL, E.H., HAN, Z.S., LORINCZI, Z., STEZHKA, V.V., KARNUP, S.V. y SOMOGYI, P., 1994. Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *Journal of neurophysiology*, **71**(4), pp. 1289-1307.
- BURGESS, N., MAGUIRE, E.A. y O'KEEFE, J., 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, **35**(4), pp. 625-641.
- CASTRO, N.G. y ALBUQUERQUE, E.X., 1995. alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophysical journal*, **68**(2), pp. 516-524.
- CASU, M.A., WONG, T.P., DE KONINCK, Y., RIBEIRO-DA-SILVA, A. y CUELLO, A.C., 2002. Aging causes a preferential loss of cholinergic innervation of characterized neocortical pyramidal neurons. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, **12**(3), pp. 329-337.
- CELIE, P.H., KASHEVEROV, I.E., MORDVINTSEV, D.Y., HOGG, R.C., VAN NIEROP, P., VAN ELK, R., VAN ROSSUM-FIKKERT, S.E., ZHMAK, M.N., BERTRAND, D., TSETLIN, V., SIXMA, T.K. y SMIT, A.B., 2005. Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant. *Nature structural y molecular biology*, **12**(7), pp. 582-588.
- CHALIFOUX, J.R. y CARTER, A.G., 2011. GABAB receptor modulation of synaptic function. *Current opinion in neurobiology*, **21**(2), pp. 339-344.
- CHAMBERS, R.A., 2013. Adult hippocampal neurogenesis in the pathogenesis of addiction and dual diagnosis disorders. *Drug and alcohol dependence*, **130**(1-3), pp. 1-12.
- CHAN, K.C., SO, K.F. y WU, E.X., 2009. Proton magnetic resonance spectroscopy revealed choline reduction in the visual cortex in an experimental model of chronic glaucoma. *Experimental eye research*, **88**(1), pp. 65-70.
- CHANG, K.T. y BERG, D.K., 2001. Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron*, **32**(5), pp. 855-865.

- CHANGEUX, J.P., 2010. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nature reviews.Neuroscience*, **11**(6), pp. 389-401.
- CHANGEUX, J.P. y EDELSTEIN, S.J., 1998. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron*, **21**(5), pp. 959-980.
- CLAIBORNE, B.J., AMARAL, D.G. y COWAN, W.M., 1990. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, **302**(2), pp. 206-219.
- CLARKE, P.B. y REUBEN, M., 1996. Release of [3H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [3H]-dopamine release. *British journal of pharmacology*, **117**(4), pp. 595-606.
- CLEMENTI, F., COURT, J. y PERRY, E., 2000. Involvement of neuronal nicotinic receptors in disease. In: F. CLEMENTI, D. FORNASARI and C. GOTTI, eds, *Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 1. Neuronal Nicotinic Receptors*. Berlin: Springer,.
- CONTI-FINE, B.M., NAVANEETHAM, D., LEI, S. y MAUS, A.D., 2000. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *European journal of pharmacology*, **393**(1-3), pp. 279-294.
- CORRINGER, P.J., LE NOVERE, N. y CHANGEUX, J.P., 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **40**, pp. 431-458.
- COSSART, R., EPSZTEIN, J., TYZIO, R., BECQ, H., HIRSCH, J., BEN-ARI, Y. y CREPEL, V., 2002. Quantal release of glutamate generates pure kainate and mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons. *Neuron*, **35**(1), pp. 147-159.
- COURT, J.A., PIGGOTT, M.A., LLOYD, S., COOKSON, N., BALLARD, C.G., MCKEITH, I.G., PERRY, R.H. y PERRY, E.K., 2000. Nicotine binding in human striatum: elevation in schizophrenia and reductions in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease and in relation to neuroleptic medication. *Neuroscience*, **98**(1), pp. 79-87.
- COUTCHER, J.B., CAWLEY, G. y WECKER, L., 1992. Dietary choline supplementation increases the density of nicotine binding sites in rat brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **262**(3), pp. 1128-1132.
- CRAGG, B.G. y HAMLIN, L.H., 1957. Some commissural and septal connexions of the hippocampus in the rabbit; a combined histological and electrical study. *The Journal of physiology*, **135**(3), pp. 460-485.
- DANI, J.A., 2001. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biological psychiatry*, **49**(3), pp. 166-174.



- DANI, J.A. y BERTRAND, D., 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **47**, pp. 699-729.
- DANI, J.A. y DE BIASI, M., 2001. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **70**(4), pp. 439-446.
- DAVIES, A.R., HARDICK, D.J., BLAGBROUGH, I.S., POTTER, B.V., WOLSTENHOLME, A.J. y WONNACOTT, S., 1999. Characterisation of the binding of [3H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, **38**(5), pp. 679-690.
- DE FIEBRE, C.M., MEYER, E.M., HENRY, J.C., MURASKIN, S.I., KEM, W.R. y PAPKE, R.L., 1995. Characterization of a series of anabaseine-derived compounds reveals that the 3-(4)-dimethylaminocinnamyldine derivative is a selective agonist at neuronal nicotinic alpha 7/125I-alpha-bungarotoxin receptor subtypes. *Molecular pharmacology*, **47**(1), pp. 164-171.
- DESCARRIES, L., GISIGER, V. y STERIADE, M., 1997. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Progress in neurobiology*, **53**(5), pp. 603-625.
- DITTMAN, J.S. y REGEHR, W.G., 1996. Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**(5), pp. 1623-1633.
- DIVECHA, N. y IRVINE, R.F., 1995. Phospholipid signaling. *Cell*, **80**(2), pp. 269-278.
- DJURICIC, B., OLSON, S.R., ASSAF, H.M., WHITTINGHAM, T.S., LUST, W.D. y DREWES, L.R., 1991. Formation of free choline in brain tissue during in vitro energy deprivation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **11**(2), pp. 308-313.
- DUTAR, P., BASSANT, M.H., SENUT, M.C. y LAMOUR, Y., 1995. The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiological Reviews*, **75**(2), pp. 393-427.
- EGEBJERG, J. y HEINEMANN, S.F., 1993. Ca<sup>2+</sup> permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**(2), pp. 755-759.
- FABIAN-FINE, R., SKEHEL, P., ERRINGTON, M.L., DAVIES, H.A., SHER, E., STEWART, M.G. y FINE, A., 2001. Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**(20), pp. 7993-8003.

- FAGNI, L., CHAVIS, P., ANGO, F. y BOCKAERT, J., 2000. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and ion channels in neurons. *Trends in neurosciences*, **23**(2), pp. 80-88.
- FAGONE, P. y JACKOWSKI, S., 2013. Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle. *Biochimica et biophysica acta*, **1831**(3), pp. 523-532.
- FLORES-SOTO, M.E., CHAPARRO-HUERTA, V., ESCOTO-DELGADILLO, M., VAZQUEZ-VALLS, E., GONZALEZ-CASTANEDA, R.E. y BEAS-ZARATE, C., 2012. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, **27**(5), pp. 301-310.
- FLÓREZ, J., 1998. *Farmacología humana*. 3 edn. Barcelona: Masson S.A.
- FRAZIER, C.J., BUHLER, A.V., WEINER, J.L. y DUNWIDDIE, T.V., 1998. Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **18**(20), pp. 8228-8235.
- FRAZIER, C.J., ROLLINS, Y.D., BREESE, C.R., LEONARD, S., FREEDMAN, R. y DUNWIDDIE, T.V., 1998. Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **18**(4), pp. 1187-1195.
- FREUND, T.F. y BUZSAKI, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, **6**(4), pp. 347-470.
- FROTSCHER, M. y LERANTH, C., 1985. Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *The Journal of comparative neurology*, **239**(2), pp. 237-246.
- FUCILE, S., 2004. Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell calcium*, **35**(1), pp. 1-8.
- FUJII, S., JI, Z. y SUMIKAWA, K., 2000. Inactivation of alpha7 ACh receptors and activation of non-alpha7 ACh receptors both contribute to long term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience letters*, **286**(2), pp. 134-138.
- FUJII, S., JIA, Y., YANG, A. y SUMIKAWA, K., 2000. Nicotine reverses GABAergic inhibition of long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Brain research*, **863**(1-2), pp. 259-265.
- GABELLIERI, C., BELOUECHE-BABARI, M., JAMIN, Y., PAYNE, G.S., LEACH, M.O. y EYKYN, T.R., 2009. Modulation of choline kinase activity in human cancer cells observed by dynamic 31P NMR. *NMR in biomedicine*, **22**(4), pp. 456-461.

- GALLAGHER, M. y COLOMBO, P.J., 1995. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Current opinion in neurobiology*, **5**(2), pp. 161-168.
- GE, S. y DANI, J.A., 2005. Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**(26), pp. 6084-6091.
- GOLGI, C., 1873. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello (Comunicazione preventiva). *Gazzetta Medica Italiana. Lombardia*, **33**, pp. 244-246.
- GONZALEZ-RUBIO, J.M., ROJO, J., TAPIA, L., MANEU, V., MULET, J., VALOR, L.M., CRIADO, M., SALA, F., GARCIA, A.G. y GANDIA, L., 2006. Activation and blockade by choline of bovine alpha7 and alpha3beta4 nicotinic receptors expressed in oocytes. *European journal of pharmacology*, **535**(1-3), pp. 53-60.
- GOTTI, C. y CLEMENTI, F., 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in neurobiology*, **74**(6), pp. 363-396.
- GOTTI, C., CLEMENTI, F., FORNARI, A., GAIMARRI, A., GUIDUCCI, S., MANFREDI, I., MORETTI, M., PEDRAZZI, P., PUCCI, L. y ZOLI, M., 2009. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical pharmacology*, **78**(7), pp. 703-711.
- GOVIND, A.P., VEZINA, P. y GREEN, W.N., 2009. Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochemical pharmacology*, **78**(7), pp. 756-765.
- GRADY, S., MARKS, M.J., WONNACOTT, S. y COLLINS, A.C., 1992. Characterization of nicotinic receptor-mediated [3H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *Journal of neurochemistry*, **59**(3), pp. 848-856.
- GRANDO, S.A., 1997. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc.[and] European Society for Dermatological Research*, **2**(1), pp. 41-48.
- GRAY, R., RAJAN, A.S., RADCLIFFE, K.A., YAKEHIRO, M. y DANI, J.A., 1996. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, **383**(6602), pp. 713-716.
- GRIGUOLI, M. y CHERUBINI, E., 2012. Regulation of hippocampal inhibitory circuits by nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of physiology*, **590**(Pt 4), pp. 655-666.
- GU, Z. y YAKEL, J.L., 2011. Timing-dependent septal cholinergic induction of dynamic hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **71**(1), pp. 155-165.

- GULYAS, A.I., MEGIAS, M., EMRI, Z. y FREUND, T.F., 1999. Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **19**(22), pp. 10082-10097.
- GULYAS, A.I., MILES, R., SIK, A., TOTH, K., TAMAMAKI, N. y FREUND, T.F., 1993. Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature*, **366**(6456), pp. 683-687.
- HAJOS, M., HURST, R.S., HOFFMANN, W.E., KRAUSE, M., WALL, T.M., HIGDON, N.R. y GROPPPI, V.E., 2005. The selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **312**(3), pp. 1213-1222.
- HAMAM, B.N., AMARAL, D.G. y ALONSO, A.A., 2002. Morphological and electrophysiological characteristics of layer V neurons of the rat lateral entorhinal cortex. *The Journal of comparative neurology*, **451**(1), pp. 45-61.
- HAN, Z.S., BUHL, E.H., LORINCZI, Z. y SOMOGYI, P., 1993. A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience*, **5**(5), pp. 395-410.
- HEFFT, S., HULO, S., BERTRAND, D. y MULLER, D., 1999. Synaptic transmission at nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal organotypic cultures and slices. *The Journal of physiology*, **515** ( Pt 3)(Pt 3), pp. 769-776.
- HOGG, R.C., RAGGENBASS, M. y BERTRAND, D., 2003. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, **147**, pp. 1-46.
- HOLLMANN, M. y HEINEMANN, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience*, **17**, pp. 31-108.
- HOLLMANN, M., O'SHEA-GREENFIELD, A., ROGERS, S.W. y HEINEMANN, S., 1989. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*, **342**(6250), pp. 643-648.
- HURST, R.S., HAJOS, M., RAGGENBASS, M., WALL, T.M., HIGDON, N.R., LAWSON, J.A., RUTHERFORD-ROOT, K.L., BERKENPAS, M.B., HOFFMANN, W.E., PIOTROWSKI, D.W., GROPPPI, V.E., ALLAMAN, G., OGIER, R., BERTRAND, S., BERTRAND, D. y ARNERIC, S.P., 2005. A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**(17), pp. 4396-4405.

- ISHIZUKA, N., COWAN, W.M. y AMARAL, D.G., 1995. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology*, **362**(1), pp. 17-45.
- JENSEN, A.A., FROLUND, B., LILJEFORS, T. y KROGSGAARD-LARSEN, P., 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *Journal of medicinal chemistry*, **48**(15), pp. 4705-4745.
- JI, D. y DANI, J.A., 2000. Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. *Journal of neurophysiology*, **83**(5), pp. 2682-2690.
- JI, D., LAPE, R. y DANI, J.A., 2001. Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **31**(1), pp. 131-141.
- JONES, S., SUDWEEKS, S. y YAKEL, J.L., 1999. Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends in neurosciences*, **22**(12), pp. 555-561.
- JONES, S. y YAKEL, J.L., 1997. Functional nicotinic ACh receptors on interneurons in the rat hippocampus. *The Journal of physiology*, **504 ( Pt 3)**(Pt 3), pp. 603-610.
- KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H. y JESSELL, T.M., 1997. *Neurociencia y conducta*. Madrid: Prentice Hall.
- KAO, P.N., DWORK, A.J., KALDANY, R.R., SILVER, M.L., WIDEMAN, J., STEIN, S. y KARLIN, A., 1984. Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *The Journal of biological chemistry*, **259**(19), pp. 11662-11665.
- KARLIN, A., 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature reviews.Neuroscience*, **3**(2), pp. 102-114.
- KARLIN, A., COX, R.N., DIPAOLO, M., HOLTZMAN, E., KAO, P.N., LOBEL, P., WANG, L. y YODH, N., 1986. Functional domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **463**, pp. 53-69.
- KATZ-BRULL, R., KOUDINOV, A.R. y DEGANI, H., 2002. Choline in the aging brain. *Brain research*, **951**(2), pp. 158-165.
- KAWASHIMA, K. y FUJII, T., 2003. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sciences*, **74**(6), pp. 675-696.
- KEINANEN, K., WISDEN, W., SOMMER, B., WERNER, P., HERB, A., VERDOORN, T.A., SAKMANN, B. y SEEBURG, P.H., 1990. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science (New York, N.Y.)*, **249**(4968), pp. 556-560.

- KENNEY, J.W. y GOULD, T.J., 2008. Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Molecular neurobiology*, **38**(1), pp. 101-121.
- KHIROUG, S.S., HARKNESS, P.C., LAMB, P.W., SUDWEEKS, S.N., KHIROUG, L., MILLAR, N.S. y YAKEL, J.L., 2002. Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *The Journal of physiology*, **540**(Pt 2), pp. 425-434.
- KIHARA, T., SHIMOHAMA, S., SAWADA, H., HONDA, K., NAKAMIZO, T., SHIBASAKI, H., KUME, T. y AKAIKE, A., 2001. alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, **276**(17), pp. 13541-13546.
- KISHI, M. y STEINBACH, J.H., 2006. Role of the agonist binding site in up-regulation of neuronal nicotinic alpha4beta2 receptors. *Molecular pharmacology*, **70**(6), pp. 2037-2044.
- KITTLER, J.T. y MOSS, S.J., 2003. Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Current opinion in neurobiology*, **13**(3), pp. 341-347.
- KLAUSBERGER, T., 2009. GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *The European journal of neuroscience*, **30**(6), pp. 947-957.
- KLEIN, J., 2000. Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, **107**(8-9), pp. 1027-1063.
- KLEIN, J., KOPPEN, A. y LOFFELHOLZ, K., 1998. Regulation of free choline in rat brain: dietary and pharmacological manipulations. *Neurochemistry international*, **32**(5-6), pp. 479-485.
- KLEIN, J., WEICHEL, O., RUHR, J., DVORAK, C. y LOFFELHOLZ, K., 2002. A homeostatic mechanism counteracting K(+) -evoked choline release in adult brain. *Journal of neurochemistry*, **80**(5), pp. 843-849.
- KOHLER, C., 1985. Intrinsic projections of the retrohippocampal region in the rat brain. I. The subicular complex. *The Journal of comparative neurology*, **236**(4), pp. 504-522.
- KORPI, E.R., GRUNDER, G. y LUDDENS, H., 2002. Drug interactions at GABA(A) receptors. *Progress in neurobiology*, **67**(2), pp. 113-159.
- KUKSIS, A., BRECKENRIDGE, W.C., MARAI, L. y STACHNYK, O., 1968. Quatitative gas chromatography in the structural characterization of glyceryl phosphatides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **45**(8), pp. 537-546.

- KULIK, A., VIDA, I., LUJAN, R., HAAS, C.A., LOPEZ-BENDITO, G., SHIGEMOTO, R. y FROTSCHER, M., 2003. Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**(35), pp. 11026-11035.
- KULLMANN, D.M., 2007. Hippocampal neuroanatomy. In: P. ANDERSEN, R. MORRIS, D. AMARAL, T. BLISS and J. O'KEEFE, eds, *The hippocampus book*. 1 edn. New York: Oxford University Press., pp. 37.
- KULLMANN, D.M., 2011. Interneuron networks in the hippocampus. *Current opinion in neurobiology*, **21**(5), pp. 709-716.
- KULLMANN, D.M., 2001. Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity. *Neuron*, **32**(4), pp. 561-564.
- KULLMANN, D.M., RUIZ, A., RUSAKOV, D.M., SCOTT, R., SEMYANOV, A. y WALKER, M.C., 2005. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Progress in biophysics and molecular biology*, **87**(1), pp. 33-46.
- LAURI, S.E., BORTOLOTTI, Z.A., BLEAKMAN, D., ORNSTEIN, P.L., LODGE, D., ISAAC, J.T. y COLLINGRIDGE, G.L., 2001. A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron*, **32**(4), pp. 697-709.
- LEE, M., MARTIN-RUIZ, C., GRAHAM, A., COURT, J., JAROS, E., PERRY, R., IVERSEN, P., BAUMAN, M. y PERRY, E., 2002. Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. *Brain : a journal of neurology*, **125**(Pt 7), pp. 1483-1495.
- LERANTH, C. y HAJSZAN, T., 2007. Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Progress in brain research*, **163**, pp. 63-84.
- LEVEY, A.I., EDMUNDS, S.M., KOLIATSOS, V., WILEY, R.G. y HEILMAN, C.J., 1995. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **15**(5 Pt 2), pp. 4077-4092.
- LEVIN, E.D., CHRISTOPHER, N.C., BRIGGS, S.J. y ROSE, J.E., 1993. Chronic nicotine reverses working memory deficits caused by lesions of the fimbria or medial basalcortical projection. *Brain research.Cognitive brain research*, **1**(3), pp. 137-143.
- LEVIN, E.D., MCCLERNON, F.J. y REZVANI, A.H., 2006. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*, **184**(3-4), pp. 523-539.
- LEVIN, E.D. y REZVANI, A.H., 2002. Nicotinic treatment for cognitive dysfunction. *Current drug targets.CNS and neurological disorders*, **1**(4), pp. 423-431.

- LEVIN, E.D. y SIMON, B.B., 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*, **138**(3-4), pp. 217-230.
- LINDSTROM, J.M., 2003. Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **998**, pp. 41-52.
- LIU, Q., KAWAI, H. y BERG, D.K., 2001. beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(8), pp. 4734-4739.
- LOFFELHOLZ, K., KLEIN, J. y KOPPEN, A., 1993. Choline, a precursor of acetylcholine and phospholipids in the brain. *Progress in brain research*, **98**, pp. 197-200.
- LOMBARDI, B., 1971. Effects of choline deficiency on rat hepatocytes. *Federation proceedings*, **30**(1), pp. 139-142.
- LOMBARDI, B., PANI, P. y SCHLUNK, F.F., 1968. Choline-deficiency fatty liver: impaired release of hepatic triglycerides. *Journal of lipid research*, **9**(4), pp. 437-446.
- LOPEZ-AGUADO, L., IBARZ, J.M. y HERRERAS, O., 2000. Modulation of dendritic action currents decreases the reliability of population spikes. *Journal of neurophysiology*, **83**(2), pp. 1108-1114.
- LOSONCZY, A., BIRO, A.A. y NUSSER, Z., 2004. Persistently active cannabinoid receptors mute a subpopulation of hippocampal interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(5), pp. 1362-1367.
- LUKAS, R.J., CHANGEUX, J.P., LE NOVERE, N., ALBUQUERQUE, E.X., BALFOUR, D.J., BERG, D.K., BERTRAND, D., CHIAPPINELLI, V.A., CLARKE, P.B., COLLINS, A.C., DANI, J.A., GRADY, S.R., KELLAR, K.J., LINDSTROM, J.M., MARKS, M.J., QUIK, M., TAYLOR, P.W. y WONNACOTT, S., 1999. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacological reviews*, **51**(2), pp. 397-401.
- MACCAFERRI, G. y MCBAIN, C.J., 1995. Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. *Neuron*, **15**(1), pp. 137-145.
- MACDERMOTT, A.B., ROLE, L.W. y SIEGELBAUM, S.A., 1999. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annual Review of Neuroscience*, **22**, pp. 443-485.
- MACHU, T.K., HAMILTON, M.E., FRYE, T.F., SHANKLIN, C.L., HARRIS, M.C., SUN, H., TENNER, T.E., JR, SOTI, F.S. y KEM, W.R., 2001. Benzylidene analogs of anabaseine display partial agonist and antagonist properties at the mouse 5-hydroxytryptamine(3A) receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **299**(3), pp. 1112-1119.



- MACKLIN, K.D., MAUS, A.D., PEREIRA, E.F., ALBUQUERQUE, E.X. y CONTI-FINE, B.M., 1998. Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **287**(1), pp. 435-439.
- MANABE, T., WYLLIE, D.J., PERKEL, D.J. y NICOLL, R.A., 1993. Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *Journal of neurophysiology*, **70**(4), pp. 1451-1459.
- MANDELZYS, A., DE KONINCK, P. y COOPER, E., 1995. Agonist and toxin sensitivities of ACh-evoked currents on neurons expressing multiple nicotinic ACh receptor subunits. *Journal of neurophysiology*, **74**(3), pp. 1212-1221.
- MARAI, L. y KUKSIS, A., 1969. Molecular species of lecithins from erythrocytes and plasma of man. *Journal of lipid research*, **10**(2), pp. 141-152.
- MARTIN, A., WIGGS, C.L. y WEISBERG, J., 1997. Modulation of human medial temporal lobe activity by form, meaning, and experience. *Hippocampus*, **7**(6), pp. 587-593.
- MARTIN, B.R. y ACETO, M.D., 1981. Nicotine binding sites and their localization in the central nervous system. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **5**(4), pp. 473-478.
- MARTIN, P.D. y SHAPIRO, M.L., 2000. Disparate effects of long-term potentiation on evoked potentials and single CA1 neurons in the hippocampus of anesthetized rats. *Hippocampus*, **10**(3), pp. 207-212.
- MARTIN, S.J., GRIMWOOD, P.D. y MORRIS, R.G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, **23**, pp. 649-711.
- MARTIN-RUIZ, C.M., HAROUTUNIAN, V.H., LONG, P., YOUNG, A.H., DAVIS, K.L., PERRY, E.K. y COURT, J.A., 2003. Dementia rating and nicotinic receptor expression in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biological psychiatry*, **54**(11), pp. 1222-1233.
- MARTIN-RUIZ, C.M., LEE, M., PERRY, R.H., BAUMANN, M., COURT, J.A. y PERRY, E.K., 2004. Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. *Brain research. Molecular brain research*, **123**(1-2), pp. 81-90.
- MATSUYAMA, S., MATSUMOTO, A., ENOMOTO, T. y NISHIZAKI, T., 2000. Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *The European journal of neuroscience*, **12**(10), pp. 3741-3747.
- MATYAS, F., FREUND, T.F. y GULYAS, A.I., 2004. Convergence of excitatory and inhibitory inputs onto CCK-containing basket cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience*, **19**(5), pp. 1243-1256.
- MAYER, M.L., 2006. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature*, **440**(7083), pp. 456-462.

- MCGEHEE, D.S. y ROLE, L.W., 1995. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annual Review of Physiology*, **57**, pp. 521-546.
- MCKAY, B.E., PLACZEK, A.N. y DANI, J.A., 2007. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*, **74**(8), pp. 1120-1133.
- MCQUISTON, A.R. y MADISON, D.V., 1999. Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **19**(8), pp. 2887-2896.
- MECK, W.H. y WILLIAMS, C.L., 1997. Characterization of the facilitative effects of perinatal choline supplementation on timing and temporal memory. *Neuroreport*, **8**(13), pp. 2831-2835.
- MECK, W.H. y WILLIAMS, C.L., 1997. Perinatal choline supplementation increases the threshold for chunking in spatial memory. *Neuroreport*, **8**(14), pp. 3053-3059.
- MECK, W.H. y WILLIAMS, C.L., 1997. Simultaneous temporal processing is sensitive to prenatal choline availability in mature and aged rats. *Neuroreport*, **8**(14), pp. 3045-3051.
- MICHAELIS, E.K., 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in neurobiology*, **54**(4), pp. 369-415.
- MICHEL, V. y BAKOVIC, M., 2012. The ubiquitous choline transporter SLC44A1. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, **12**(2), pp. 70-81.
- MICHEL, V., YUAN, Z., RAMSUBIR, S. y BAKOVIC, M., 2006. Choline transport for phospholipid synthesis. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, **231**(5), pp. 490-504.
- MIELKE, J.G., AHUJA, T.K., COMAS, T. y MEALING, G.A., 2011. Choline-mediated depression of hippocampal synaptic transmission. *Nutritional Neuroscience*, **14**(5), pp. 186-194.
- MIELKE, J.G. y MEALING, G.A., 2009. Cellular distribution of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in rat hippocampus. *Neuroscience research*, **65**(3), pp. 296-306.
- MIKE, A., CASTRO, N.G. y ALBUQUERQUE, E.X., 2000. Choline and acetylcholine have similar kinetic properties of activation and desensitization on the alpha7 nicotinic receptors in rat hippocampal neurons. *Brain research*, **882**(1-2), pp. 155-168.
- MILES, R., TOTH, K., GULYAS, A.I., HAJOS, N. y FREUND, T.F., 1996. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*, **16**(4), pp. 815-823.
- MINTZ, I.M. y BEAN, B.P., 1993. GABAB receptor inhibition of P-type Ca<sup>2+</sup> channels in central neurons. *Neuron*, **10**(5), pp. 889-898.

- MIYAZAWA, A., FUJIYOSHI, Y. y UNWIN, N., 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, **423**(6943), pp. 949-955.
- MIZUMORI, S.J., PATTERSON, T.A., STERNBERG, H., ROSENZWEIG, M.R., BENNETT, E.L. y TIMIRAS, P.S., 1985. Effects of dietary choline on memory and brain chemistry in aged mice. *Neurobiology of aging*, **6**(1), pp. 51-56.
- MOHLER, H., 2006. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell and tissue research*, **326**(2), pp. 505-516.
- MONOD, J., WYMAN, J. y CHANGEUX, J.P., 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model. *Journal of Molecular Biology*, **12**, pp. 88-118.
- MORLEY, B.J. y RODRIGUEZ-SIERRA, J.F., 2004. A phenotype for the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor null mutant. *Brain research*, **1023**(1), pp. 41-47.
- MOSKO, S., LYNCH, G. y COTMAN, C.W., 1973. The distribution of septal projections to the hippocampus of the rat. *The Journal of comparative neurology*, **152**(2), pp. 163-174.
- NAKANISHI, S., NAKAJIMA, Y., MASU, M., UEDA, Y., NAKAHARA, K., WATANABE, D., YAMAGUCHI, S., KAWABATA, S. y OKADA, M., 1998. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain research. Brain research reviews*, **26**(2-3), pp. 230-235.
- NAKATA, T., MATSUI, T., KOBAYASHI, K., KOBAYASHI, Y. y ANZAI, N., 2013. Organic cation transporter 2 (SLC22A2), a low-affinity and high-capacity choline transporter, is preferentially enriched on synaptic vesicles in cholinergic neurons. *Neuroscience*, **252**, pp. 212-221.
- NAKAUCHI, S. y SUMIKAWA, K., 2012. Endogenously released ACh and exogenous nicotine differentially facilitate long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region of mice. *The European journal of neuroscience*, **35**(9), pp. 1381-1395.
- NEWHOUSE, P.A., POTTER, A. y LEVIN, E.D., 1997. Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs & aging*, **11**(3), pp. 206-228.
- NIIMI, K., NISHIMURA-AKIYOSHI, S., NAKASHIBA, T. y ITOHARA, S., 2007. Monoclonal antibodies discriminating netrin-G1 and netrin-G2 neuronal pathways. *Journal of neuroimmunology*, **192**(1-2), pp. 99-104.
- NISHIMURA-AKIYOSHI, S., NIIMI, K., NAKASHIBA, T. y ITOHARA, S., 2007. Axonal netrin-Gs transneuronally determine lamina-specific subdendritic segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **17**(23), pp 9165-9171.
- O'KEEFE, J. y NADEL, L., 1978. *The hippocampus as a cognitive map* Oxford, UK: Clarendon Press.

- O'MARA, S.M., COMMINS, S., ANDERSON, M. y GIGG, J., 2001. The subiculum: a review of form, physiology and function. *Progress in neurobiology*, **64**(2), pp. 129-155.
- ORR-URTREGER, A., GOLDNER, F.M., SAEKI, M., LORENZO, I., GOLDBERG, L., DE BIASI, M., DANI, J.A., PATRICK, J.W. y BEAUDET, A.L., 1997. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **17**(23), pp. 9165-9171.
- OZAWA, S., KAMIYA, H. y TSUZUKI, K., 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology*, **54**(5), pp. 581-618.
- PAPKE, R.L., BENCHERIF, M. y LIPPIELLO, P., 1996. An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neuroscience letters*, **213**(3), pp. 201-204.
- PASCUAL, J., GONZALEZ, A.M. y PAZOS, A., 1990. Characterization of [3H]hemicholinium-3 binding sites in human brain membranes: a marker for presynaptic cholinergic nerve terminals. *Journal of neurochemistry*, **54**(3), pp. 792-800.
- PAVLOV, V.A. y TRACEY, K.J., 2005. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, behavior, and immunity*, **19**(6), pp. 493-499.
- PENG, X., GERZANICH, V., ANAND, R., WHITING, P.J. y LINDSTROM, J., 1994. Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Molecular pharmacology*, **46**(3), pp. 523-530.
- PEREIRA, E.F., HILMAS, C., SANTOS, M.D., ALKONDON, M., MAELICKE, A. y ALBUQUERQUE, E.X., 2002. Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *Journal of neurobiology*, **53**(4), pp. 479-500.
- PERRY, E.K., LEE, M.L., MARTIN-RUIZ, C.M., COURT, J.A., VOLSEN, S.G., MERRIT, J., FOLLY, E., IVERSEN, P.E., BAUMAN, M.L., PERRY, R.H. y WENK, G.L., 2001. Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain. *The American Journal of Psychiatry*, **158**(7), pp. 1058-1066.
- PETTIT, D.L., SHAO, Z. y YAKEL, J.L., 2001. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**(1), pp. RC120.
- PICCIOTTO, M.R., ADDY, N.A., MINEUR, Y.S. y BRUNZELL, D.H., 2008. It is not "either/or": activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Progress in neurobiology*, **84**(4), pp. 329-342.

- PICCIOTTO, M.R., ZOLI, M., LENA, C., BESSIS, A., LALLEMAND, Y., LE NOVERE, N., VINCENT, P., PICH, E.M., BRULET, P. y CHANGEUX, J.P., 1995. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature*, **374**(6517), pp. 65-67.
- PIKKARAINEN, M., RONKKO, S., SAVANDER, V., INSAUSTI, R. y PITKANEN, A., 1999. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *The Journal of comparative neurology*, **403**(2), pp. 229-260.
- PISKOROWSKI, R.A. y CHEVALEYRE, V., 2012. Synaptic integration by different dendritic compartments of hippocampal CA1 and CA2 pyramidal neurons. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **69**(1), pp. 75-88.
- POTIER, B., JOUVENCEAU, A., EPELBAUM, J. y DUTAR, P., 2006. Age-related alterations of GABAergic input to CA1 pyramidal neurons and its control by nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampus. *Neuroscience*, **142**(1), pp. 187-201.
- POTIER, B., RASCOL, O., JAZAT, F., LAMOUR, Y. y DUTAR, P., 1992. Alterations in the properties of hippocampal pyramidal neurons in the aged rat. *Neuroscience*, **48**(4), pp. 793-806.
- POUILLE, F. y SCANZIANI, M., 2004. Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature*, **429**(6993), pp. 717-723.
- POUILLE, F. y SCANZIANI, M., 2001. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science (New York, N.Y.)*, **293**(5532), pp. 1159-1163.
- RADCLIFFE, K.A. y DANI, J.A., 1998. Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **18**(18), pp. 7075-7083.
- RADCLIFFE, K.A., FISHER, J.L., GRAY, R. y DANI, J.A., 1999. Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **868**, pp. 591-610.
- RAPIER, C., LUNT, G.G. y WONNACOTT, S., 1990. Nicotinic modulation of [3H]dopamine release from striatal synaptosomes: pharmacological characterization. *Journal of neurochemistry*, **54**(3), pp. 937-945.
- RIBAK, C.E. y SERESS, L., 1983. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *Journal of neurocytology*, **12**(4), pp. 577-597.
- RIBAK, C.E., SERESS, L. y AMARAL, D.G., 1985. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *Journal of neurocytology*, **14**(5), pp. 835-857.

- RIVERA, C., VOIPIO, J., PAYNE, J.A., RUUSUVUORI, E., LAHTINEN, H., LAMSA, K., PIRVOLA, U., SAARMA, M. y KAILA, K., 1999. The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, **397**(6716), pp. 251-255.
- ROHLFS, E.M., GARNER, S.C., MAR, M.H. y ZEISEL, S.H., 1993. Glycerophosphocholine and phosphocholine are the major choline metabolites in rat milk. *The Journal of nutrition*, **123**(10), pp. 1762-1768.
- ROLE, L.W. y BERG, D.K., 1996. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*, **16**(6), pp. 1077-1085.
- ROUVIÈRE, H. y DELMAS, A., 2005. Anatomía Humana. Descriptiva, topográfica y funcional. 11<sup>a</sup> edn. España: Elsevier.
- SAJIKUMAR, S., NAVAKKODE, S. y FREY, J.U., 2005. Protein synthesis-dependent long-term functional plasticity: methods and techniques. *Current opinion in neurobiology*, **15**(5), pp. 607-613.
- SARGENT, P.B., 1993. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annual Review of Neuroscience*, **16**, pp. 403-443.
- SARTER, M. y PARIKH, V., 2005. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature reviews.Neuroscience*, **6**(1), pp. 48-56.
- SCHAFFER, K., 1892. Beitrag zur Histologie der Ammonshornformation. *Arch mikroskop Anatomie* **39**, pp. 611-632.
- SCREMIN, O.U. y JENDEN, D.J., 1989. Focal ischemia enhances choline output and decreases acetylcholine output from rat cerebral cortex. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, **20**(1), pp. 92-95.
- SECADES, J.J., 2011. Citicolina: farmacológica y clínica review, 2010 update. *Revista de neurología*, **52 Suppl 2**, pp. S1-S62.
- SHARMA, G. y VIJAYARAGHAVAN, S., 2003. Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. *Neuron*, **38**(6), pp. 929-939.
- SHARMA, G. y VIJAYARAGHAVAN, S., 2001. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(7), pp. 4148-4153.
- SHAW, S., BENCHERIF, M. y MARRERO, M.B., 2002. Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta-(1-42) amyloid. *The Journal of biological chemistry*, **277**(47), pp. 44920-44924.

- SHEN, J. y BARNES, C.A., 1996. Age-related decrease in cholinergic synaptic transmission in three hippocampal subfields. *Neurobiology of aging*, **17**(3), pp. 439-451.
- SHI, H., WANG, H., LU, Y., YANG, B. y WANG, Z., 1999. Choline modulates cardiac membrane repolarization by activating an M3 muscarinic receptor and its coupled K<sup>+</sup> channel. *The Journal of membrane biology*, **169**(1), pp. 55-64.
- SHI, H., WANG, H., YANG, B., XU, D. y WANG, Z., 2004. The M3 receptor-mediated K<sup>(+)</sup> current (IKM3), a G(q) protein-coupled K<sup>(+)</sup> channel. *The Journal of biological chemistry*, **279**(21), pp. 21774-21778.
- SHI, L., ADAMS, M.M., LINVILLE, M.C., NEWTON, I.G., FORBES, M.E., LONG, A.B., RIDDLE, D.R. y BRUNSO-BECHTOLD, J.K., 2007. Caloric restriction eliminates the aging-related decline in NMDA and AMPA receptor subunits in the rat hippocampus and induces homeostasis. *Experimental neurology*, **206**(1), pp. 70-79.
- SHIMOHAMA, S. y KIHARA, T., 2001. Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity. *Biological psychiatry*, **49**(3), pp. 233-239.
- SHU, Y., 2011. Research progress in the organic cation transporters. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences*, **36**(10), pp. 913-926.
- SHYTLER, R.D., SILVER, A.A., LUKAS, R.J., NEWMAN, M.B., SHEEHAN, D.V. y SANBERG, P.R., 2002. Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Molecular psychiatry*, **7**(6), pp. 525-535.
- SHYTLER, R.D., SILVER, A.A., SHEEHAN, K.H., SHEEHAN, D.V. y SANBERG, P.R., 2002. Neuronal nicotinic receptor inhibition for treating mood disorders: preliminary controlled evidence with mecamylamine. *Depression and anxiety*, **16**(3), pp. 89-92.
- SKREDE, K.K. y WESTGAARD, R.H., 1971. The transverse hippocampal slice: a well-defined cortical structure maintained in vitro. *Brain research*, **35**(2), pp. 589-593.
- SOMOGYI, P., FREUND, T.F., HODGSON, A.J., SOMOGYI, J., BEROUKAS, D. y CHUBB, I.W., 1985. Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus and visual cortex of the cat. *Brain research*, **332**(1), pp. 143-149.
- SPRENGEL, R., 2006. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell and tissue research*, **326**(2), pp. 447-455.
- SPRUSTON, N., 2008. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature reviews. Neuroscience*, **9**(3), pp. 206-221.

- SPRUSTON, N., JONAS, P. y SAKMANN, B., 1995. Dendritic glutamate receptor channels in rat hippocampal CA3 and CA1 pyramidal neurons. *The Journal of physiology*, **482 ( Pt 2)**(Pt 2), pp. 325-352.
- SPRUSTON, N. y McBAIN, C., 2007. Structural and functional properties of hippocampal neurons. In: P. ANDERSEN, R. MORRIS, D. AMARAL, T. BLISS and J. O'KEEFE, eds, *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press, pp. 133-191.
- SQUIRE, L.R., 2009. Memory and brain systems: 1969-2009. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**(41), pp. 12711-12716.
- STEINLEIN, O.K., 2004. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nature reviews.Neuroscience*, **5**(5), pp. 400-408.
- STEINLEIN, O.K., MULLEY, J.C., PROPPING, P., WALLACE, R.H., PHILLIPS, H.A., SUTHERLAND, G.R., SCHEFFER, I.E. y BERKOVIC, S.F., 1995. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature genetics*, **11**(2), pp. 201-203.
- STEWART, O. y SCOVILLE, S.A., 1976. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *The Journal of comparative neurology*, **169**(3), pp. 347-370.
- SUDWEEKS, S.N. y YAKEL, J.L., 2000. Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *The Journal of physiology*, **527 Pt 3**, pp. 515-528.
- SWANSON, L.W., WYSS, J.M. y COWAN, W.M., 1978. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **181**(4), pp. 681-715.
- SWEET, D.H., MILLER, D.S. y PRITCHARD, J.B., 2001. Ventricular choline transport: a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus. *The Journal of biological chemistry*, **276**(45), pp. 41611-41619.
- TAMAMAKI, N., ABE, K. y NOJYO, Y., 1988. Three-dimensional analysis of the whole axonal arbors originating from single CA2 pyramidal neurons in the rat hippocampus with the aid of a computer graphic technique. *Brain research*, **452**(1-2), pp. 255-272.
- TAUPIN, P., 2007. *Hippocampus: Neurotransmission and Plasticity in the Nervous System*. Nova Science Publishers Inc.
- TAYEBATI, S.K. y AMENTA, F., 2013. Choline-containing phospholipids: relevance to brain functional pathways. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, **51**(3), pp. 513-521.



- TAYEBATI, S.K., AMENTA, F., EL-ASSOUAD, D. y ZACCHEO, D., 2002. Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the hippocampus of aged rats. *Mechanisms of ageing and development*, **123**(5), pp. 521-528.
- TEYLER, T.J., 1980. Brain slice preparation: hippocampus. *Brain research bulletin*, **5**(4), pp. 391-403.
- TRAIFFORT, E., RUAT, M., O'REGAN, S. y MEUNIER, F.M., 2005. Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants. *Journal of neurochemistry*, **92**(5), pp. 1116-1125.
- TRAYNELIS, S.F., WOLLMUTH, L.P., MCBAIN, C.J., MENNITI, F.S., VANCE, K.M., OGDEN, K.K., HANSEN, K.B., YUAN, H., MYERS, S.J. y DINGLELINE, R., 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, **62**(3), pp. 405-496.
- UMBRIACO, D., WATKINS, K.C., DESCARRIES, L., COZZARI, C. y HARTMAN, B.K., 1994. Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections. *The Journal of comparative neurology*, **348**(3), pp. 351-373.
- UNWIN, N., 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **346**(4), pp. 967-989.
- UTSUGISAWA, K., NAGANE, Y., OBARA, D. y TOHGI, H., 2002. Over-expression of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor induces sustained ERK phosphorylation and N-cadherin expression in PC12 cells. *Brain research. Molecular brain research*, **106**(1-2), pp. 88-93.
- VIDA, I. y FROTSCHER, M., 2000. A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(3), pp. 1275-1280.
- VIDA, I., HALASY, K., SZINYEI, C., SOMOGYI, P. y BUHL, E.H., 1998. Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *The Journal of physiology*, **506 ( Pt 3)**(Pt 3), pp. 755-773.
- VOGT, K., MELLOR, J., TONG, G. y NICOLL, R., 2000. The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, **26**(1), pp. 187-196.
- WANG, N., ORR-URTREGER, A., CHAPMAN, J., RABINOWITZ, R., NACHMAN, R. y KORCZYN, A.D., 2002. Autonomic function in mice lacking alpha5 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit. *The Journal of physiology*, **542**(Pt 2), pp. 347-354.
- WANG, N., ORR-URTREGER, A. y KORCZYN, A.D., 2002. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autonomic ganglia: lessons from knockout mice. *Progress in neurobiology*, **68**(5), pp. 341-360.

- WARD, J.M., COCKCROFT, V.B., LUNT, G.G., SMILLIE, F.S. y WONNACOTT, S., 1990. Methylycaconitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites. *FEBS letters*, **270**(1-2), pp. 45-48.
- WELSBY, P., ROWAN, M. y ANWYL, R., 2006. Nicotinic receptor-mediated enhancement of long-term potentiation involves activation of metabotropic glutamate receptors and ryanodine-sensitive calcium stores in the dentate gyrus. *The European journal of neuroscience*, **24**(11), pp. 3109-3118.
- WHEELER, D.D., 1985. Aging of membrane transport mechanisms in the central nervous system--high affinity choline transport in rat cortical synaptosomes. *Experimental gerontology*, **20**(2), pp. 73-80.
- WIEPRECHT, M., WIEDER, T. y GEILEN, C.C., 1994. N-[2-bromocinnamyl(amino)ethyl]-5-isoquinolinesulphonamide (H-89) inhibits incorporation of choline into phosphatidylcholine via inhibition of choline kinase and has no effect on the phosphorylation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *The Biochemical journal*, **297** ( Pt 1)(Pt 1), pp. 241-247.
- WILKIE, G.I., HUTSON, P.H., STEPHENS, M.W., WHITING, P. y WONNACOTT, S., 1993. Hippocampal nicotinic autoreceptors modulate acetylcholine release. *Biochemical Society transactions*, **21**(2), pp. 429-431.
- WITTER, M.P., 1993. Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus*, **3 Spec No**, pp. 33-44.
- WONNACOTT, S., 1997. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends in neurosciences*, **20**(2), pp. 92-98.
- WONNACOTT, S. y BARIK, J., 2007-last update, *TOCRIS Bioscience Scientific Review* . Available: [http://www.tocris.com/pdfs/pdf\\_downloads/nicotinic\\_ach\\_receptors\\_review.pdf](http://www.tocris.com/pdfs/pdf_downloads/nicotinic_ach_receptors_review.pdf).
- WONNACOTT, S., DRASDO, A., SANDERSON, E. y ROWELL, P., 1990. Presynaptic nicotinic receptors and the modulation of transmitter release. *Ciba Foundation symposium*, **152**, pp. 87-101; discussion 102-5.
- WONNACOTT, S., WILKIE, G.I., SOLIAKOV, L. y WHITAKER, P., 1995. Presynaptic nicotinic autoreceptors and heteroreceptors in the CNS. In: P.B. CLARKE, M. QUIK, F. ADLKOFER and K. THURAU, eds, *Advances in Pharmacological Sciences. Effects of Nicotine on Biological Systems II*. Springer, .
- WOOD, R. y HARLOW, R.D., 1969. Structural studies of neutral glycerides and phosphoglycerides of rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **131**(2), pp. 495-501.
- WOOLF, N.J., 1991. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Progress in neurobiology*, **37**(6), pp. 475-524.

- WU, L.G. y SAGGAU, P., 1995. GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx. *The Journal of physiology*, **485** ( Pt 3)(Pt 3), pp. 649-657.
- WU, L.G. y SAGGAU, P., 1994. Presynaptic calcium is increased during normal synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **14**(2), pp. 645-654.
- WU, W.W., OH, M.M. y DISTERHOFT, J.F., 2002. Age-related biophysical alterations of hippocampal pyramidal neurons: implications for learning and memory. *Ageing research reviews*, **1**(2), pp. 181-207.
- WU, X., KEKUDA, R., HUANG, W., FEI, Y.J., LEIBACH, F.H., CHEN, J., CONWAY, S.J. y GANAPATHY, V., 1998. Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *The Journal of biological chemistry*, **273**(49), pp. 32776-32786.
- YANG, X., CRISWELL, H.E. y BREESE, G.R., 1996. Nicotine-induced inhibition in medial septum involves activation of presynaptic nicotinic cholinergic receptors on gamma-aminobutyric acid-containing neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **276**(2), pp. 482-489.
- YAO, Z.M. y VANCE, D.E., 1989. Head group specificity in the requirement of phosphatidylcholine biosynthesis for very low density lipoprotein secretion from cultured hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*, **264**(19), pp. 11373-11380.
- YAO, Z.M. y VANCE, D.E., 1988. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*, **263**(6), pp. 2998-3004.
- ZAMANI, M.R. y ALLEN, Y.S., 2001. Nicotine and its interaction with beta-amyloid protein: a short review. *Biological psychiatry*, **49**(3), pp. 221-232.
- ZEISEL, S.H., 2006. Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annual Review of Nutrition*, **26**, pp. 229-250.
- ZEISEL, S.H., 2000. Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **16**(7-8), pp. 669-671.
- ZEISEL, S.H., 1990. Choline deficiency. *The Journal of nutritional biochemistry*, **1**(7), pp. 332-349.
- ZEISEL, S.H. y BLUSZTAJN, J.K., 1994. Choline and human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, **14**, pp. 269-296.

- ZEISEL, S.H., CHAR, D. y SHEARD, N.F., 1986. Choline, phosphatidylcholine and sphingomyelin in human and bovine milk and infant formulas. *The Journal of nutrition*, **116**(1), pp. 50-58.
- ZEISEL, S.H. y DA COSTA, K.A., 2009. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutrition reviews*, **67**(11), pp. 615-623.
- ZEISEL, S.H., EPSTEIN, M.F. y WURTMAN, R.J., 1980. Elevated choline concentration in neonatal plasma. *Life Sciences*, **26**(21), pp. 1827-1831.
- ZHANG, R., WHITE, N.A., SOTI, F.S., KEM, W.R. y MACHU, T.K., 2006. N-terminal domains in mouse and human 5-hydroxytryptamine<sub>3A</sub> receptors confer partial agonist and antagonist properties to benzylidene analogs of anabaseine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **317**(3), pp. 1276-1284.
- ZUCKER, R.S. y REGEHR, W.G., 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology*, **64**, pp. 355-405.
- ZWART, R., DE FILIPPI, G., BROAD, L.M., MCPHIE, G.I., PEARSON, K.H., BALDWINSON, T. y SHER, E., 2002. 5-Hydroxyindole potentiates human alpha 7 nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology*, **43**(3), pp. 374-384.
- ZWART, R. y VIJVERBERG, H.P., 2000. Potentiation and inhibition of neuronal alpha4beta4 nicotinic acetylcholine receptors by choline. *European journal of pharmacology*, **393**(1-3), pp. 209-214.