



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS (PEDECIBA)

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUB-ÁREA NEUROCIENCIA

**Modulación colinérgica de una entrada GABAérgica
a neuronas del núcleo *pontis oralis* (PnO): estudio
in vitro de los efectos dependientes de la actividad
presináptica**

ESTEBAN PINO

ORIENTADOR: Dr. MICHEL BORDE



Laboratorio de Ejecución: Neurofisiología Celular y Sináptica
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Udelar

TRIBUNAL

Presidente: Dr. Raúl Russo

Vocales: Dres. Sebastián Curti y Leonel Gómez

...

Montevideo, 2019



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
(PEDECIBA)

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUB-ÁREA NEUROCIENCIA

**Modulación colinérgica de una entrada GABAérgica a
neuronas del núcleo *pontis oralis* (PnO): estudio in vitro
de los efectos dependientes de la actividad presináptica**

ESTEBAN PINO

ORIENTADOR: Dr. MICHEL BORDE



Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdelAR

...

Montevideo, 2019

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	3
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	7
1.1. ANTECEDENTES GENERALES	8
1.1.1. LA FORMACIÓN RETICULADA MESOPONTINA CONTIENE AL ÁREA EJECUTIVA PARA LA GENERACIÓN DEL S-REM	8
1.1.2. INTERACCIÓN COLINÉRGICA-GABAérgica EN LA rPRF	9
1.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	14
1.2.1. PREPARACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA UNIÓN MESOPONTINA PARA EL ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN COLINÉRGICA DE ENTRADAS GABAérgicas AL PnO	14
1.2.2. MODULACIÓN HETEROSINÁPTICA DE LOS CONTACTOS GABAérgicos EN EL PnO	15
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GENERAL	19
2.2. HIPÓTESIS	19
2.3. OBJETIVOS EXPERIMENTALES	19
OBJETIVO EXPERIMENTAL 1 (OE1)	19
OBJETIVO EXPERIMENTAL 2 (OE2)	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DE LA PREPARACIÓN <i>IN</i> <i>VITRO</i>	21
3.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	21
3.1.2. OBTENCIÓN DE LA RODAJA	21
3.1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL PREPARADO <i>IN VITRO</i>	22
3.2. ESTÍMULO ELÉCTRICO DEL LDT/PPT	24
3.3. REGISTRO INTRACELULAR	24
3.4. APLICACIÓN YUXTACELULAR DE AGONISTAS COLINÉRGICOS	26
3.5. ANÁLISIS DE LAS CORRIENTES SINÁPTICAS	27
3.5.1. PARÁMETROS EMPLEADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS IPSCs GABAérgicos Y DE LOS FENÓMENOS PLÁSTICOS	27
3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	31
4. RESULTADOS	33
4.1. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS DEL PnO	33
4.2. PLASTICIDAD SINÁPTICA DE CORTO PLAZO (STP) EN LAS AFERENTES GABAérgicas AL PnO	35
4.3. MODULACIÓN NICOTÍNICA Y MUSCARÍNICA DE LOS FENÓMENOS PLÁSTICOS DE CORTO PLAZO EN AFERENTES GABAérgicas AL PnO	44
5. DISCUSIÓN	51
5.1. LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS IPSCs REGISTRADOS CONCUERDAN CON LA ACTIVACIÓN DE UNA POBLACIÓN RELATIVAMENTE HOMOGÉNEA DE AFERENTES GABAérgicas.	52

5.2. LAS AFERENTES GABAérgicas ACTIVADAS PRESENTAN AL MENOS DOS ESTADOS FUNCIONALES.	54
5.3. MODULACIÓN COLINÉRGICA DE LA EFICACIA SINÁPTICA EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN REPETITIVA DE LAS AFERENTES GABAérgicas	56
5.4. MODULACIÓN DUAL MUSCARÍNICO-NICOTÍNICA	57
5.5. LA MODULACIÓN COLINÉRGICA DE LA EFICACIA SINÁPTICA GABAérgica COMO ESTRATEGIA NEURAL CAPAZ DE CONTROLAR LA OPERATIVA DEL CIRCUITO MESOPONTINO IMPLICADO EN LA GENERACIÓN DEL S-REM.	58
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	63
7. MATERIAL SUPLEMENTARIO	67
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACh: acetilcolina.

CCh: carbacol.

CV: coeficiente de variación.

CC, VC: fijación de corriente y voltaje.

DSP_c, FSP_c: depresión y facilitación sináptica persistente, respectivamente, inducidas por mecanismos colinérgicos

EPSC: corriente postsináptica excitadora.

GABA: ácido γ (gamma)-aminobutírico.

I_m : corriente transmembrana.

IPSC: corriente postsináptica inhibidora.

LDT: núcleo tegmental laterodorsal.

LTS: espiga de Ca^{2+} de bajo umbral.

mAChRs: receptores muscarínicos de ACh.

$\dot{n}_T$: número de sitios de liberación o sitios activos.

nAChRs: receptores nicotínicos de ACh.

NM-V: núcleo motor del V par craneano.

p_{f1} : probabilidad de fallos para el primer IPSC.

PGO: ondas ponto-genículo-occipitales.

PnC: núcleo *pontis caudalis*.

PnO: núcleo *pontis oralis*.

PPD, PPF: depresión y facilitación por pares de pulsos.

PPT: núcleo tegmental pedúnculo-pontino.

PPR: *paired pulse ratio* o índice de facilitación/depresión por pares de pulsos.

p_r : probabilidad de liberación.

$p_{r(t=0)}$: probabilidad de liberación inicial del terminal presináptico.

PRF: formación reticulada del puente.

q : tamaño cuantal.

Q_{inh} : carga inhibidora.

REM-S: sueño de movimientos oculares rápidos.

R_1 : eficacia sináptica del primer IPSC

R_{en} : resistencia de entrada

R_i : eficacia sináptica del i -ésimo IPSC ($i = 1, 2, \dots, 5$)

R_s : resistencia serie.

rPRF: región rostral de la PRF.

SCP: pedúnculo cerebeloso superior.

S-NREM: sueño no-REM.

SNC: sistema nervioso central.

STB: *short term biphasic plasticity* o perfil bifásico de plasticidad de corto plazo.

STD, STF: depresión y facilitación por frecuencia.

STP: plasticidad sináptica de corto plazo

STP_r: perfil de plasticidad sináptica de corto plazo

STPR: *short term plasticity ratio*, índice de plasticidad de corto plazo.

$\tau_{15\text{ Hz}}$: constante de tiempo del curso temporal de la eficacia sináptica.

V_h : potencial de mantenimiento.

V_m : potencial de membrana

El sector rostral de la formación reticulada mesopontina (PnO) ha sido implicado en la generación de los signos electroencefalográficos y electromiográficos característicos del *sueño de movimientos oculares rápidos* (S-REM). Neuronas promotoras de REM del PnO se hallan bajo control GABAérgico y colinérgico, desconociéndose aún la mayoría de los mecanismos sinápticos implicados en dicho control. Estudios previos sugieren la *co-expresión* y *co-activación* de receptores colinérgicos de tipo *muscarínico* y *nicotínico* en terminales presinápticas GABAérgicas que establecen contactos con neuronas del PnO. En respuestas provocadas por la activación de estas aferentes con estímulos únicos, la aplicación local de *muscarina* en el PnO provoca una reducción de la eficacia sináptica, en tanto que la de *nicotina* produce el efecto opuesto. Para avanzar en el conocimiento de los mecanismos de control del PnO, se reevaluó *in vitro* el efecto modulador muscarínico-nicotínico de la eficacia sináptica de los contactos sinápticos GABAérgicos sobre neuronas del PnO, utilizando *patrones fisiológicos de activación presináptica* (activación repetitiva a 15 Hz). Durante la activación a 15 Hz se observó cambios transitorios de la eficacia (plasticidad sináptica de corto plazo, STP) de los contactos GABAérgicos. Independientemente de la forma preexistente de STP en el contacto (facilitación o depresión por frecuencia) la aplicación local de *muscarina* en el PnO provocó *inhibición presináptica* acompañada de *facilitación por frecuencia*, en tanto la de *nicotina* promovió efectos opuestos. En ambos casos se redujo la *carga inhibidora transferida al elemento postsináptico*, sugiriendo así que, en las condiciones de actividad presináptica referidas, los agonistas colinérgicos *muscarina* y *nicotina* podrían actuar de modo concertado, reduciendo la inhibición GABAérgica de las neuronas del PnO.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El sueño de movimientos oculares rápidos (S-REM, por *rapid eye movements*) constituye un estado comportamental definido por signos electroencefalográficos (EEG) y electromiográficos (EMG) característicos, que lo distinguen de los estados de *vigilia* y *sueño lento* o *no REM* (S-NREM) (Aserinsky and Kleitman, 1953; Jouvet and Michel, 1959). Los *núcleos tegmentales laterodorsal y pedunculopontino* (LDT/PPT) y su proyección sináptica a neuronas pertenecientes a un sector topográficamente definido de la *formación reticulada mesopontina* (PRF, por *pontine reticular formation*), integran una *red neural* críticamente implicada en la organización y control de este estado (Arrigoni et al., 2016; Brown et al., 2012; Jones, 2004; Sakai et al., 2001). Evidencias obtenidas fundamentalmente *in vivo* indican que el control operativo de dicha red y particularmente de la actividad de neuronas “REM-on” de la PRF (*promotoras* de los componentes fundamentales del S-REM, Fuller et al., 2007), supone una compleja interacción entre los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y colinérgico (Xi et al., 2004; Vazquez and Baghdoyan, 2004; Maloney et al., 1999; Sanford et al., 2003).

La existencia de fenómenos de *modulación heterosináptica de entradas GABAérgicas a neuronas REM-on de la PRF* como *eventual sustrato de la interacción colinérgica-GABAérgica* en esta región no ha sido explorada en detalle. No obstante, estudios *in vitro* desarrollados previamente por nuestro grupo revelaron la existencia de mecanismos de *modulación colinérgica* de la *eficacia* de entradas sinápticas GABAérgicas a neuronas del *núcleo pontis oralis* de la PRF (PnO), sugiriendo asimismo la *co-expresión* y *co-activación* de *receptores colinérgicos* de tipo *muscarínico* (mAChRs) y *nicotínico* (nAChRs) en las *terminales presinápticas* de dichos contactos. En respuestas postsinápticas provocadas por la activación de aferentes GABAérgicas con *estímulos únicos*, los *efectos moduladores colinérgicos* resultantes de la activación de mAChRs consistieron en una *reducción de la eficacia sináptica* de los contactos, mientras que la activación de nAChRs tuvo el efecto opuesto (Kunizawa, 2016).

Ahora bien, el *significado funcional* de un mecanismo de modulación colinérgica *dual* mediado por efectos *antagónicos* de mAChRs y nAChRs sobre la eficacia sináptica, no resulta evidente al analizar respuestas postsinápticas a estímulos únicos. En el presente trabajo se reevaluó *in vitro* el efecto modulador colinérgico empleando *patrones fisiológicos de activación presináptica* (activación repetitiva de las aferentes GABAérgicas con trenes de 15 Hz). La eficacia de los contactos GABAérgicos mostró cambios transitorios durante la activación por trenes, compatibles con la expresión de fenómenos de *plasticidad sináptica de corto plazo* (STP, por *short term plasticity*) (Fortune and Rose, 2000; Zucker, 1989; Zucker and Regehr, 2002); estos incluyeron tanto la *facilitación* (STF) como la *depresión* (STD) *por frecuencia*. Los resultados aportados por esta Tesis muestran que independientemente de la forma preexistente de STP en el contacto, la

activación de mAChRs resulta en una *inhibición presináptica* acompañada de STF, en tanto la de nAChRs promueve los efectos contrarios. En ambos casos tiene lugar una reducción de la *carga inhibitoria transferida*¹ a la neurona postsináptica, sugiriendo así que, en condiciones fisiológicas, los efectos resultantes de la activación de los mAChRs y nAChRs podrían reducir concertada y cooperativamente la inhibición GABAérgica de las neuronas del PnO. Estos efectos podrían eventualmente dar cuenta de la existencia de mecanismos locales de control de la transmisión GABAérgica en el PnO, implicados en la supresión de la entrada GABAérgica tónica a neuronas de esta región (“*gating*”) durante el S-REM (Xi et al. 2004).

1.1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1. LA FORMACIÓN RETICULADA MESOPONTINA CONTIENE AL ÁREA EJECUTIVA PARA LA GENERACIÓN DEL S-REM

Los componentes fundamentales o *signos cardinales* del S-REM incluyen la ocurrencia periódica de movimientos oculares rápidos y la activación cortical (desincronización del EEG con actividad de alta frecuencia y baja amplitud), ritmo *theta* hipocampal (4-9 Hz) y ondas ponto-genículo-occipitales (PGO) vinculadas a los movimientos sacádicos. Estos se presentan paradójicamente asociados con la atonía muscular esquelética (excluyendo la de la musculatura ocular extrínseca), por lo que el S-REM es también denominado *sueño paradójico* (PS, por *paradoxical sleep*) (Pace-Schott and Hobson, 2002; Brown et al., 2012; Jones, 2004; Scammell et al., 2017).

Experimentos consistentes en la transección completa del tronco encefálico del gato a diversos niveles (e.g., *punte rostral*, *cuerpos trapezoides*, *mesencéfalo rostral*, etc.) (Jouvet, 1960; 1962; 1965), o la lesión electrolítica (Carli and Zanchetti, 1965) o química (Webster and Jones, 1988) de sectores restringidos del tronco encefálico, permitieron establecer que la PRF contiene al *área ejecutiva* para la generación de los signos cardinales del S-REM (McCarley, 2007; Jones, 2004; Siegel, 1995; Torterolo et al., 2009). Esta región ha sido asimismo referida por otros autores como “*conmutador principal*” o “*conexión nodal*” (traducción de “*nodal link*”) para la generación, organización y mantenimiento del S-REM (Reinoso-Suárez et al., 2001).

Aun cuando el sitio específico de la PRF correspondiente al *área ejecutiva* permanece como objeto de debate, existe consenso en que la región dorsal de los núcleos *pontis oralis* y *caudalis* (PnO y PnC, respectivamente, según Paxinos y Watson, 1998), pertenecientes al sector rostral de la PRF (rPRF), y localizados ventral y medialmente al *locus coeruleus* (LC) y en posición dorso-medial al núcleo motor del V par craneano (NM-V), contiene poblaciones neuronales

¹ La *carga inhibitoria transferida* (medida en pA.ms) constituye una medida de la cantidad total de carga eléctrica que atraviesa la membrana postsináptica, como resultado de un evento sináptico; constituye asimismo una medida de la cantidad total de *neurotransmisor* liberado en dicho evento. Ver Morgan, N. H., Stanford, I. M., & Woodhall, G. L. (2009). Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology*, 57(4), 356-368.

responsables de la generación de la *atonía muscular*, las *ondas PGO* y la *activación cortical* (Krenzer et al., 2011; Luppi et al., 2012, 2011; Scammell et al., 2017)². Experimentos de privación de S-REM en los que se combinó el marcaje inmunohistoquímico de *c-Fos* con la hibridación *in situ* para vGLUT2 (*vesicular glutamate transporter 2*) permitieron postular que neuronas glutamatérgicas del PnO son primariamente “REM-on” (i.e., presentan frecuencias máximas de activación durante la ocurrencia de S-REM) (Clément et al., 2011). En roedores, la rPRF contiene dos poblaciones de neuronas *glutamatérgicas* funcionalmente segregadas. Una de estas proyecta rostralmente al núcleo intralaminar del tálamo, al hipotálamo posterior y al prosencéfalo basal, y se halla implicada en la generación de la *activación cortico-hipocampal* y la *desincronización cortical* características del S-REM; la otra lo hace caudalmente sobre diversas poblaciones neuronales de los núcleos gigantocelular ventral y alfa, paragigantocelular lateral y al *raphe magnus*, y se vincula a la generación de la *atonía muscular* (Boissard et al., 2002; Héricé et al., 2018; Jones, 1991; Sanford et al., 2001; Krenzer et al., 2011; Peever y Fuller, 2017).

1.1.2. INTERACCIÓN COLINÉRGICA-GABAérgica EN LA rPRF

La inducción de S-REM por aplicación en el PnO de colinomiméticos como *carbacol* (CCh) o *acetilcolina* (ACh) ha constituido un importante *modelo farmacológico de S-REM* (Baghdoyan, 1997; Baghdoyan et al., 1984; Capece et al., 1997; George et al., 1964; Greene et al., 1989; Jones, 2004; Shiromani y Fishbein, 1986; Steriade et al., 1990; Vanni-Mercier et al., 1989). Los efectos colinérgicos promotores de S-REM en la rPRF son en general atribuidos a los mediados por mAChRs (principalmente de tipo M₂ y M₄) distribuidos a lo largo del eje rostro-caudal de la PRF (Baghdoyan, 1997; Baghdoyan et al., 1994), asignándose menor relevancia a los resultantes de la activación de nAChRs (para revisión ver McCarley, 2007). Particularmente, la inervación colinérgica del PnO originada en los núcleos *tegmentales pedúnculo pontino y laterodorsal* (LDT/PPT) ha sido considerada como un elemento central en la generación y control del S-REM (Hobson et al., 1975; McCarley, 2004; McCarley y Hobson, 1975; Mitani et al., 1988; Semba et al., 1990; Shiromani et al., 1988). El papel de ACh como *promotor* del S-REM en la

² La localización precisa y denominación específica del *área ejecutiva* para la generación de los componentes cardinales del S-REM perteneciente a la PRF es aún objeto de debate entre diversos grupos de investigación, variando según la especie seleccionada y el atlas estereotáxico utilizado. Ciertos autores refieren a este sector como subcoeruleus (SubC), conteniendo diversas regiones implicadas en el control del S-REM (periLC-alfa, área parabraquial, etc.). Según otros, estos sectores estarían bajo el control de un área más rostral, correspondiente al sector ventral del núcleo reticularis pontis oralis, vRPO. Finalmente, otros autores indican que las poblaciones neuronales particularmente implicadas en la generación de la atonía muscular del S-REM se localizarían en el sector rostral del SubC y ventralmente al agrupamiento colinérgico del LDT/PPT, denominando a esta región como *área sublaterodorsal* (SLD), equivalente al peri-LC α . En esta tesis se ha adoptado la denominación de PnO (Paxinos and Watson, 1998) para hacer referencia al sector rostral de la PRF correspondiente al sector ejecutivo para el S-REM; el sector dorsal de este núcleo correspondería así al SLD. A lo largo del presente trabajo, se hará referencia de modo indistinto al sector rostral de la PRF (rPRF), al PnO y a la formación reticulada de la unión mesopontina.

rPRF es actualmente objeto de revisión, proponiéndose en cambio su efecto como *modulador* o de carácter *permisivo* para la generación de este estado (Boissard et al., 2002; Bourgin et al., 1995; Gnadt and Pegram, 1986; López-Rodríguez et al., 1994; Velazquez-Moctezuma et al., 1989).

Trabajos más recientes jerarquizan el rol de la neurotransmisión mediada por *ácido gamma-aminobutírico* (GABA) en el control del S-REM. Según diversos modelos, neuronas GABAérgicas pertenecientes a sectores del tronco encefálico (dentro de los que se incluye al LDT/PPT), desempeñan un rol central en la organización de este estado (Boissard et al., 2003, 2002; Grace et al., 2014; Kroeger et al., 2016; Lu et al., 2006; Luppi et al., 2012, 2011, 2007; Peever and Fuller, 2017; Sapin et al., 2009; Scammell et al., 2017; Torterolo et al., 2001; Weber et al., 2018). Específicamente, Xi et al. (2004) propusieron que neuronas *REM-on* del PnO podrían estar bajo una *inhibición tónica GABAérgica* durante los estados de vigilia y S-NREM. La aplicación unilateral de los antagonistas del receptor GABA_A *bicuculina* (BIC) o *gabazina* en el PnO del gato promueve la irrupción de episodios de S-REM de larga duración, mientras que la aplicación de *muscimol* (agonista del receptor GABA_A) promueve la irrupción de un estado indistinguible de la vigilia (Xi et al., 2001, 1999). Resultados similares fueron obtenidos en la rata por Marks et al., (2008), Pollock and Mistlberger (2003), y Sanford et al., (2003).

Los trabajos mencionados señalan que la actividad de neuronas *REM-on* pertenecientes a la rPRF se halla sujeta a un control dependiente de mecanismos *colinérgicos* y *GABAérgicos*; la innervación GABAérgica y particularmente su *interacción* con la transmisión *colinérgica* en la rPRF emergen como elementos críticos para el control del S-REM, tal como indican las siguientes evidencias:

(1) Mientras que la microinyección de CCh en el PnO del gato provoca la ocurrencia de S-REM, este efecto no tiene lugar si su aplicación se realiza luego de una preinyección del agonista *muscimol* para receptores GABA_A en el mismo sitio (Xi et al., 2004). Por el contrario, la preinyección del antagonista colinérgico *escopolamina* no tiene efectos sobre la inducción de S-REM provocada por la inyección de BIC en esta región. De acuerdo con estos resultados, la acción colinérgica promotora del S-REM sobre neuronas *REM-on* del PnO se hallaría sujeta a un “*gating*” dependiente de la actividad tónica de entradas GABAérgicas sobre estas neuronas, capaz de prevenir la ocurrencia de S-REM inducida por ACh y promover, en cambio, la ocurrencia de vigilia o S-NREM (Fig. 1A). La remoción de esta inhibición (i.e., la reducción del tono GABAérgico) sería necesaria para la generación de los componentes cardinales del S-REM, dependiente de la excitación colinérgica de neuronas *REM-on* del PnO (véase también Maloney et al., 1999; Sanford et al., 2003).

(2) La aplicación de BIC en la PRF de gatos tiene como consecuencia un incremento dosis-dependiente de los niveles endógenos de ACh detectados por microdiálisis. Asimismo, la coadministración de *muscimol* + BIC es capaz de prevenir este efecto. Finalmente, la aplicación de BIC en la PRF durante el S-REM en animales no anestesiados provoca un incremento en los

niveles locales de ACh. GABA podría ejercer un efecto modulador consistente en: (i) la inhibición presináptica de las terminales colinérgicas de proyecciones descendentes del LDT/PPT sobre la PRF o (ii) la inhibición de neuronas de la PRF que proyectan sobre el LDT/PPT y tienen un efecto postsináptico excitador sobre neuronas colinérgicas de estos agregados, las que finalmente proyectan sobre la rPRF (**Fig. 1B**) (Flint et al., 2010; Vazquez and Baghdoyan, 2004).

(3) La demostración de la presencia de varicosidades colinérgicas en el PnO y de la co-localización de la *proteína de transporte vesicular de acetilcolina* (VACHT) con la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A (**Fig. 1C**), aportando evidencias en favor de un *control presináptico directo de GABA sobre la liberación de ACh en esta región* (Liang and Marks, 2014).

(4) La microinyección de *atropina* (antagonista del receptor muscarínico de ACh) en la rPRF previene la inducción de S-REM provocada por la microinyección de antagonistas GABAérgicos (BIC, GBZ) en esa región (Marks et al., 2008).

(5) Los niveles de GABA en la rPRF presentan variaciones asociadas al estado comportamental, con valores máximos durante la vigilia y el S-NREM (ver **Fig. 1D** y Vanini et al., 2011); recíprocamente, los niveles de ACh en la PRF son máximos durante el S-REM (**Fig. 1D**) (Leonard and Lydic, 1997). Asimismo, los niveles de GABA en la rPRF se reducen significativamente respecto a la vigilia y al S-NREM durante la inducción de un estado similar al S-REM provocado por la inyección de antagonistas de la enzima acetilcolinesterasa en la rPRF contralateral (**Fig. 1D**) (Vanini et al., 2011).

La presencia de *varicosidades presinápticas colinérgicas* en el PnO mencionada en (3) sugiere la existencia de una modalidad de *transmisión colinérgica no sináptica* (o *de volumen*) en esta región (Bennett et al., 2012; Lendvai and Vizi, 2008; Yamasaki et al., 2010). La ACh liberada desde estas terminales podría tener efectos *moduladores* locales en la rPRF (pre o postsinápticos), mediados tanto por mAChRs (Brown, 2010) como por nAChRs (Dani and Bertrand, 2007; Mansvelder et al., 2009; Marchi and Grilli, 2010). En línea con ello, diversos trabajos proponen un rol primariamente *modulador* para la transmisión colinérgica en diversos circuitos del SNC (ver Picciotto et al., 2012; Dannenberg et al., 2017), habiéndose postulado específicamente que la *modulación colinérgica* de los circuitos neurales implicados en la generación del S-REM constituye un elemento clave en el control de este estado (Saper and Fuller, 2017). Pese a ello, la modulación colinérgica de entradas sinápticas a la rPRF ha sido escasamente explorada. En tal sentido, un acotado número de trabajos tales como los de Heister et. al. (2009) y de Weng et. al. (2014) analizan *in vitro* los efectos de la aplicación de agonistas colinérgicos sobre la transmisión sináptica glutamatérgica y GABAérgica en la PRF. El primero de ellos pone de manifiesto que CCh produce una inhibición presináptica de la transmisión glutamatérgica sin afectar mayormente a la transmisión GABAérgica; el segundo muestra que CCh provoca una *facilitación* presináptica de la transmisión glutamatérgica. Estos trabajos fueron no obstante llevados a cabo en sectores

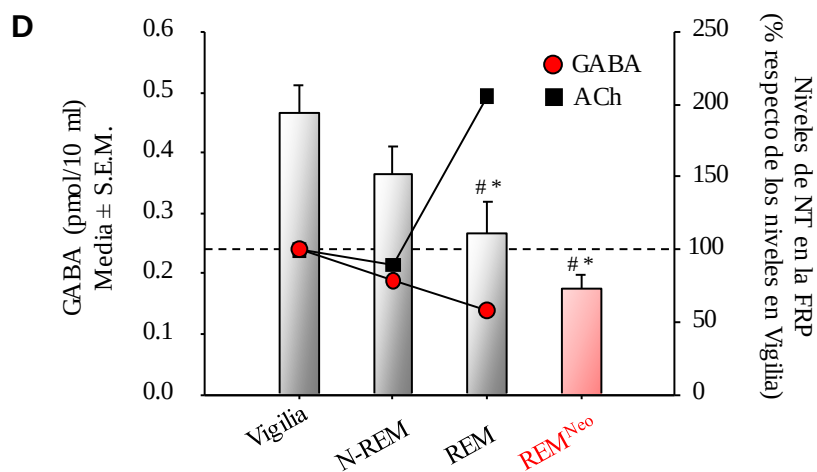
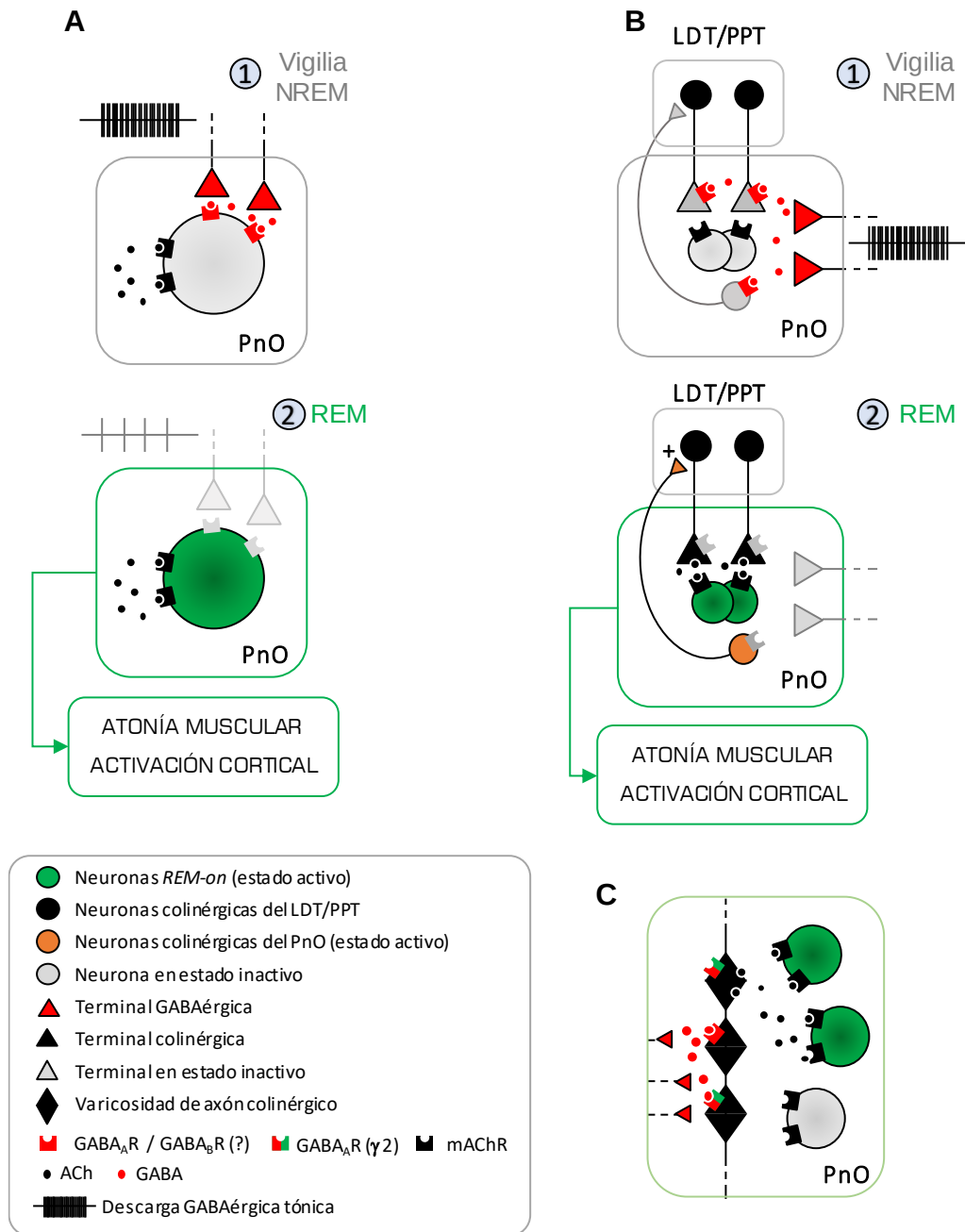
diferentes de la FRP; en ninguno de ellos se determinó asimismo el *origen de las aferentes GABAérgicas o glutamatérgicas* implicadas.

La modulación de la transmisión sináptica mediada por receptores para ACh localizados en *terminales presinápticas* no colinérgicas se define como *modulación heterosináptica* (Bailey et al., 2000; Getting, 1989). Fenómenos de modulación heterosináptica de entradas GABAérgicas a neuronas del PnO podrían explicar, por ejemplo, que la reducción de los niveles locales de GABA en la rPRF durante el S-REM se acompañen de un incremento en los de ACh, según lo expuesto en (5). Asimismo, la modulación colinérgica de entradas GABAérgicas al PnO podría estar implicada en la supresión del tono GABAérgico durante el S-REM propuesto en (1).

La existencia de mecanismos de modulación heterosináptica de entradas GABAérgicas a la rPRF podría así constituir una pieza de evidencia clave para la comprensión de los mecanismos implicados en el control colinérgico/GABAérgico del S-REM. Su estudio debe restringirse no obstante a una población identificable de entradas GABAérgicas sujetas a modulación. Asimismo, en virtud de la proximidad entre las estructuras *promotoras* y *supresoras* del S-REM del tronco encefálico en roedores, el estudio de los mecanismos de modulación colinérgica de entradas GABAérgicas a la PRF en estas especies debe llevarse a cabo en sectores acotados de dicha región, restringiendo consecuentemente el sitio de acción de los colinomiméticos ensayados. La preparación *in vitro* de la unión mesopontina desarrollada en nuestro Laboratorio y considerada en la siguiente sección satisface estos requerimientos.

>>

Fig.1. Mecanismos de interacción colinérgica-GABAérgica en la rPRF. (A). El control colinérgico de neuronas REM-on del PnO está sujeto a un *gating* GABAérgico (Xi et al., 2004). La inhibición tónica GABAérgica de estas neuronas (arriba) previene su activación por ACh durante la vigilia y el S-NREM (1). Durante la reducción o supresión de esta inhibición tónica (abajo), ACh promueve la activación de estas neuronas, determinando la ocurrencia de S-REM (2). (B). Arriba: entradas GABAérgicas inhiben a nivel presináptico las terminales colinérgicas procedentes del LDT/PPT (mediante la activación de receptores GABA_A), reduciendo los niveles locales de ACh durante la vigilia y el S-NREM (1). Los efectos podrían igualmente depender de una acción inhibitoria GABAérgica sobre neuronas de la rPRF que proyectan sobre las colinérgicas del LDT/PPT y cuya acción postsináptica es excitadora. La reducción de la actividad GABAérgica (abajo) resultaría tanto en una facilitación presináptica de las terminales colinérgicas como en una desinhibición de las neuronas excitadoras de la rPRF durante el S-REM (2), incrementando los niveles locales de ACh durante el S-REM. En A y B se indican algunos de los componentes del S-REM de los que depende la activación de las poblaciones REM-on del PnO. (C). Evidencias inmunohistoquímicas señalan la existencia de varicosidades colinérgicas en el PnO que expresan receptores GABA_A, sugiriendo el control presináptico de la liberación de ACh por GABA. (D). El gráfico de barras muestra los niveles promedio $\pm$ S.E.M de GABA (pmol/10ml, eje de ordenadas a la izquierda) en la PRF determinados por microdiálisis durante los estados de vigilia, sueño N-REM y S-REM, así como durante el S-REM provocado por la aplicación de neostigmina (REM^{Neo}) en la misma localización. Los símbolos # y * indican diferencias significativas respecto de la vigilia y del sueño NREM, respectivamente. Se superpone al gráfico los niveles de GABA (●) y ACh (■) expresados como porcentaje de los correspondientes a la vigilia (eje de ordenadas a la derecha). D, Modificado de Vanini et al., 2011.



1.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

1.2.1. PREPARACIÓN *IN VITRO* DE LA UNIÓN MESOPONTINA PARA EL ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN COLINÉRGICA DE ENTRADAS GABAérgicas AL PnO

Los núcleos tegmentales LDT y PPT previamente mencionados se presentan como agregados heterogéneos de neuronas colinérgicas (pertenecientes a los grupos *Ch5* y *Ch6*), GABAérgicas y glutamatérgicas. Estos agregados neuronales y sus proyecciones sinápticas descendentes a la rPRF integran una *red neural ponto-mesencefálica* críticamente implicada en la organización y control del S-REM y la vigilia (**Fig.2**, izquierda) (Boucetta et al., 2014; Boucetta and Jones, 2009; Cornwall et al., 1990; Ford et al., 1995; Kroeger et al., 2016; Maloney et al., 1999; Scammell et al., 2017; Semba et al., 1990; Steriade et al., 1990; Torterolo et al., 2001; Wang and Morales, 2009).

Previamente nuestro grupo ha desarrollado y caracterizado una preparación *in vitro* de la unión mesopontina del tronco encefálico de la rata (cepa *Wistar*, P7-P14), consistente en una rodaja de ~350 μm y que contiene al sector rostral de la PRF consignado como PnO en su porción más caudal (Paxinos and Watson, 1998), al *pedúnculo cerebeloso superior* (SCP), al sector más rostral del *núcleo motor del trigémino* (NM-V), y a los núcleos tegmentales LDT/PPT, situados en la vecindad del polo medial del SCP (ver **Fig. 3**). Evidencias *electrofisiológicas* y *farmacológicas* permiten sostener que la *red neural ponto-mesencefálica* integrada por el LDT/PPT y el PnO se halla estructural y funcionalmente preservada en la rodaja (ver Kunizawa 2016; Pino et al., 2017 y *Materiales y Métodos* para detalles). Esta preparación ha permitido: (i) analizar respuestas postsinápticas GABAérgicas en neuronas del PnO; (ii) seleccionar de manera precisa y reproducible el sitio de estimulación de las aferentes GABAérgicas (LDT/PPT); (iii) reclutar una población relativamente homogénea de aferentes, comparable entre experimentos; (iv) avanzar en el estudio de los fenómenos de modulación *colinérgica* de entradas GABAérgicas al PnO (ver siguiente sección).

En la rodaja mesopontina, la aplicación de estímulos eléctricos únicos (o pares) al LDT/PPT provoca *corrientes postsinápticas excitadoras glutamatérgicas* (EPSCs, por *excitatory* y *post-synaptic current*) e IPSCs GABAérgicas (por *inhibitory post-synaptic current*) en neuronas del PnO. La acción *inhibidora* de GABA en estas neuronas se confirmó mediante un diseño experimental consistente en el registro en condiciones de “*cell attached*” de neuronas del PnO y la aplicación yuxtacelular de GABA (1 mM) o muscimol (100 μM). En la **Tabla 1** se presentan algunos de los parámetros característicos de los IPSCs aislados *farmacológicamente* (perfusión con *ácido quinurénico* 5 mM), agrupados de acuerdo a si estos proceden del registro de neuronas **LTS** (por *low threshold spike*, i.e, que presentan *espiga de Ca^{2+} de bajo umbral*) o **no-LTS**,

fenotipos electrofisiológicos de las neuronas del PnO descritos por otros autores (Gerber et al., 1989; Ito et al., 2002; Núñez et al., 2002, 1997). Los contactos GABAérgicos activados por la estimulación del LDT/PPT son *monosinápticos* (ver criterios presuntivos en *Materiales y Métodos* de esta Tesis), e involucran exclusivamente receptores GABA_A. En estos no participan receptores GABA_B, careciendo asimismo de supresión de la inhibición inducida por despolarización o DSI (por “*Depolarization-Induced Suppression of Inhibition*”).

Parámetro	LTS	No-LTS
Amplitud de pico del IPSC (pA)	72.8 ± 10.9	73.8 ± 20.9
Latencia al pie del IPSC (ms)	8.9 ± 0.4	10.6 ± 0.7
τ_{on} (ms)	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2
τ_{off} (ms)	24.4 ± 1.9	24.2 ± 2.5
PPR ₁₅₀	1.36 ± 0.1	1.22 ± 0.08

Tabla 1. Principales características de los contactos sinápticos GABAérgicos activados por estimulación del LDT-PPT según el fenotipo electrofisiológico (LTS y No-LTS) de las neuronas del PnO registradas. τ_{on} y τ_{off} : constantes de tiempo de ascenso y de relajación de los IPSCs respectivamente; PPR: razón de las amplitudes medias del segundo IPSC (R_2) y el primero (R_1) provocadas por un par de estímulos aplicados al LDT-PPT (intervalo de 150 ms). Tomada de Kunizawa, 2016.

1.2.2. MODULACIÓN HETEROSINÁPTICA DE LOS CONTACTOS GABAérgicos EN EL PnO

In vitro, la aplicación yuxtacelular por presión de CCh (agonista colinérgico muscarínico-nicotínico, 1 mM) en el PnO resultó en una reducción de la amplitud media del primer IPSC (provocado por la estimulación del LDT/PPT con pares de pulsos) en un 60% de las neuronas registradas; en el 40% restante CCh provocó el efecto opuesto. La aplicación de ACh mostró resultados similares. El curso temporal de las modificaciones de la *eficacia sináptica* provocadas por estos colinomiméticos (duración 20-40 minutos) permitió su catalogación como fenómenos de depresión o facilitación sináptica persistente (**DSP_c** o **FSP_c**, respectivamente; el subíndice “c” es indicativo del mecanismo de inducción colinérgica). En todos los casos, las modificaciones de la eficacia sináptica provocadas por CCh o ACh estuvieron asociadas a una modificación del **PPR₁₅₀** (por “*paired pulse ratio*”), razón de las amplitudes medias de la segunda respuesta postsináptica (R_2) y la primera (R_1), provocadas por un par de estímulos idénticos a un intervalo dado (i.e.: $PPR = R_2/R_1$); el subíndice “150” indica el intervalo interestímulo seleccionado (en ms). Los cambios del PPR asociados a una modificación de la *eficacia sináptica* son indicativos del origen *presináptico* de dicha modificación. Específicamente, los *incrementos* o *reducciones* del PPR están asociados a la *reducción* o al *incremento*, respectivamente, de la *probabilidad de*

liberación de neurotransmisor (p_r) (Bekkers and Stevens, 1990; Davies et al., 1990; Debanne et al., 1996; Dobrunz and Stevens, 1997; Hess et al., 1987; Manabe et al., 1993; Metherate and Ashe, 1994; Schulz et al., 1994; Zucker, 1989, 1973). No obstante, mientras que el *incremento* del PPR_{150} tuvo lugar en el 40 % de los casos en los que CCh provocó DSP_c , en el restante 60 % de estos se evidenció una *reducción* de dicho índice. Por otro lado, mientras que el PPR_{150} se *redujo* en el 65 % de los casos en los que CCh provocó una FSP_c , en el restante 35 % se verificó un *incremento* de este índice.

El análisis farmacológico realizado mediante la aplicación de agonistas colinérgicos selectivos para mAChRs y nAChRs indicó que la modulación colinérgica de los contactos GABAérgicos involucra mecanismos tanto de *inhibición presináptica* atribuibles a la activación de mAChRs, como de *facilitación presináptica* dependientes de la activación de nAChRs. La aplicación yuxtacelular de *nicotina* (20 μ M) provocó sistemáticamente una FSP_c con *reducción* del PPR_{150} . La aplicación de *muscarina* (10 μ M) resultó en todos los casos en una DSP_c con *incremento* del PPR_{150} . De acuerdo con estos datos, los efectos moduladores *muscarínico* y *nicotínico* son *presinápticos* y de carácter *antagónico* sobre la eficacia del contacto.

En la **Fig. 2** (derecha) se esquematiza la *hipótesis de modulación colinérgica dual* (muscarínico-nicotínica), según la cual los receptores colinérgicos muscarínicos y nicotínicos se hallan *co-localizados en las terminales presinápticas GABAérgicas*; los efectos de la activación de estos receptores sobre la modulación de la eficacia sináptica obedecen a mecanismos funcionalmente independientes (i.e., que no presentan *oclusión*) y que admiten, de acuerdo con ello, la eventual *co-activación* de mAChRs y nAChRs. La *coactivación* de mAChRs y nAChRs provocada por colinomiméticos con actividad agonista muscarínico-nicotínica (e.g. ACh o CCh) podría dar cuenta de los resultados consistentes en la **DSP_c asociada a la reducción del PPR_{150}** (efecto *muscarínico* + *nicotínico*, respectivamente) o la **FSP_c asociada al incremento del PPR_{150}** (efecto *nicotínico* + *muscarínico*, respectivamente). Ahora bien, ¿cuáles son las consecuencias *funcionales* de un mecanismo de modulación colinérgica *dual* resultante de la eventual *co-activación* de receptores *presinápticos* (mAChRs y nAChRs) con efectos *antagónicos* sobre la *eficacia del contacto*?

La *eficacia sináptica* presenta característicamente incrementos o reducciones graduales resultantes de la *actividad presináptica repetitiva*. Estas modificaciones corresponden a las formas de *plasticidad sináptica de corto plazo* (**STP**, por *short-term plasticity*) definidas como *facilitación* y *depresión por frecuencia* (Creager et al., 1980; Schlapfer et al., 1976), y referidas en términos generales como *facilitación sináptica de corto plazo* (**STF**, por *short-term facilitation*) y *depresión sináptica de corto plazo* (**STD**, por *short-term depression*), respectivamente (Dittman et al., 2000; Fioravante and Regehr, 2011; Fortune and Rose, 2001; Tsodyks et al., 1998; Varela et al., 1997; Zucker, 1989; Zucker and Regehr, 2002). Mecanismos *presinápticos* subyacentes a la **STP** tales como la depleción del *pool* de vesículas de neurotransmisor listas para ser liberadas

(o RRP por *readily releasable pool*) (Kaesler y Regehr, 2017), la inactivación de sitios activos, o la facilitación de *corrientes* presinápticas de Ca^{2+} , son modulados por ACh en diversos circuitos centrales (Stone et al., 2014; Threlfell et al., 2010; Threlfell and Cragg, 2011; Hernández-Martínez et al., 2014). Algunos autores (Exley and Cragg, 2008; Threlfell et al., 2010; Threlfell and Cragg, 2011) sugieren que la *modulación colinérgica presináptica* (muscarínica o nicotínica) podría conferir al contacto propiedades de *filtro* para la transmisión de la información neural, modulando diversos *fenómenos plásticos dependientes de frecuencia*.

Datos aportados por Boucetta et al., (2014) y Boucetta y Jones (2009) ponen de manifiesto que neuronas GABAérgicas del LDT/PPT presentan frecuencias de descarga de ~ 15 Hz durante la vigilia (W, por *wake*) y el S-REM (neuronas “W/PS-max active”) o exclusivamente durante el S-REM (neuronas “PS-max active”). Si bien no se ha demostrado la existencia de proyecciones de estas neuronas sobre el PnO, los datos aportados por nuestro grupo, indicativos de la existencia de proyecciones GABAérgicas monosinápticas al PnO originadas en el LDT/PPT, permiten suponer que frecuencias de descarga de 15 Hz podrían constituir un patrón de actividad presináptica funcionalmente relevante para las entradas GABAérgicas.

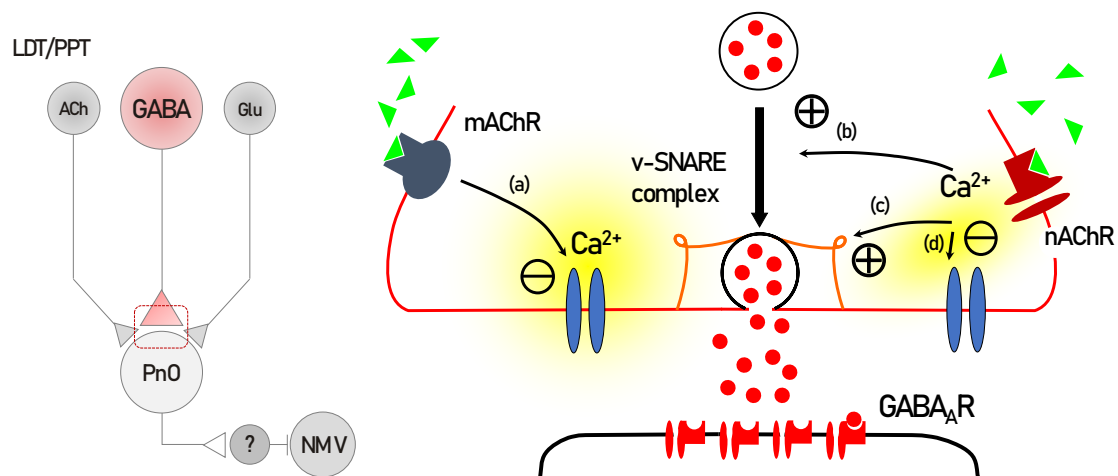


Fig.2. Red mesopontina en el preparado *in vitro* e hipótesis de la modulación dual (nicotínica-muscarínica) de los contactos GABAérgicos. A la izquierda se representan las poblaciones neuronales que integran al LDT/PPT según su fenotipo neurotransmisor. El esquema incluye neuronas GABAérgicas glutamatergicas y colinérgicas que proyectan directamente sobre el PnO. Se representa además la proyección caudal indirecta (probablemente disináptica) de neuronas del PnO sobre motoneuronas del NM V, presente en la preparación *in vitro* de la unión mesopontina. A la derecha se esquematiza el contacto GABAérgico sobre una neurona del PnO, representando la co-localización de nAChRs y mAChRs en las terminales GABAérgicas, con efectos de carácter antagónico sobre la eficacia del contacto. La activación de mAChRs asocia la inhibición de canales de Ca^{2+} (a). La activación de los nAChRs provoca el incremento localizado de la $[\text{Ca}^{2+}]$, resultando consecuentemente en: un incremento de la fracción de vesículas del RRP (b), la

promoción del proceso de exocitosis de las vesículas de neurotransmisor (**c**), o bien, un efecto modulador sobre conductancias de Ca^{2+} del terminal (**d**). Independientemente del mecanismo subcelular implicado, la activación de ambos receptores tiene efectos antagónicos sobre la eficacia sináptica, resultantes en el incremento (nAChR) o la reducción (mAChR) de la p_r . El esquema destaca asimismo la *no oclusión* de los mecanismos presinápticos dependientes de la activación de ambas clases de receptores colinérgicos. La *coactivación* de estos receptores daría cuenta de los efectos combinados evidenciados con CCh y ACh. Modificada de [Kunizawa, 2016](#).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aportar a la comprensión de los mecanismos sinápticos y circuitales mesopontinos implicados en la generación y control del S-REM, particularmente de aquellos que involucran la interacción GABAérgica y colinérgica en el *área ejecutiva* para el S-REM.

2.2. HIPÓTESIS

Tal como ha sido referido en la sección precedente, los efectos *muscarínico* y *nicotínico* presinápticos (evaluados en respuestas sinápticas provocadas por estímulos únicos), consisten en la *depresión* y la *facilitación* de la transmisión GABAérgica, respectivamente. Estos efectos deberán ser reevaluados empleando *patrones fisiológicos* de activación presináptica (i.e., activación repetitiva a 15 Hz), en virtud de la eventual expresión de *fenómenos plásticos de corto plazo* (STP) en los contactos sinápticos analizados.

Proponemos que, en tales condiciones *fisiológicas*, la modulación colinérgica promoverá modificaciones *específicas* en el *perfil de plasticidad de corto plazo* de los contactos, dependiendo del tipo (*muscarínico* o *nicotínico*) de receptor presináptico activado. Los efectos moduladores colinérgicos en tales condiciones podrían asimismo dar cuenta de la supresión de la entrada GABAérgica tónica a neuronas de esta región (“*gating*”) que tiene lugar durante el S-REM.

2.3. OBJETIVOS EXPERIMENTALES

- **OBJETIVO EXPERIMENTAL 1 (OE1)**

OE1a. Poner de manifiesto la expresión de **fenómenos plásticos de corto plazo** (STP) dependientes de la actividad presináptica en las aferentes GABAérgicas a neuronas del PnO.

OE1b. Llevar a cabo una **caracterización primaria** de las modificaciones de la eficacia sináptica resultantes de la activación presináptica repetitiva por trenes de estimulación de 15 Hz, a través de la descripción del **perfil de plasticidad de corto plazo** (STP_P), la

caracterización del **curso temporal** y la cuantificación de los **índices** de **plasticidad PPR** y **STPR** (ver Materiales y Métodos para su definición).

OE1c. Aportar complementariamente datos indicativos del origen *presináptico* de los mecanismos implicados en la expresión del fenómeno plástico.

- **OBJETIVO EXPERIMENTAL 2 (OE2)**

Analizar los efectos moduladores heterosinápticos de los agonistas colinérgicos *nicotina* y *muscarina* sobre la eficacia de la transmisión GABAérgica en condiciones de activación pre-sináptica repetitiva a 15 Hz de las entradas GABAérgicas a neuronas del PnO.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DE LA PREPARACIÓN *IN VITRO*

3.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizó ratas de la cepa *Wistar* entre P7 y P15. Los animales se obtuvieron de la Unidad de Reactivos y Biomodelos Experimentación (U.R.B.E.) de la Facultad de Medicina, UdelaR y los procedimientos utilizados fueron oportunamente aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación animal y la Comisión de Experimentación Animal de Facultad de Medicina (Exp. N° 071140-000654-10).

3.1.2. OBTENCIÓN DE LA RODAJA

Las ratas fueron decapitadas con guillotina procediendo luego a realizar una craneotomía ampliada, para acceder y remover rápidamente el *tronco encefálico*. Durante la disección, el SNC se bañó continuamente con solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) modificado: Sacarosa 213 mM, KCl 2.7 mM, H₂KO₄P 1.25 mM, MgSO₄·7H₂O 2 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 10 mM, CaCl₂ 2 mM a ~4°C. La sustitución equimolar del Na⁺ por *sacarosa* constituye una de las estrategias que ha sido utilizada para reducir la actividad neuronal de la pieza y con ello la actividad sináptica, buscando minimizar los procesos de excitotoxicidad y muerte neuronal (Aghajanian and Rasmussen, 1989). La pieza obtenida se fijó por su sector cefálico a la platina de un vibrátomo (Vibratome 1000 plus, Vibratome) sumergiéndola en LCRA modificado a 4°C.

Se realizó cortes transversales al eje mayor del tronco encefálico, para obtener secciones de 350-450 µm de espesor. La conservación de las estructuras clave de la red mesopontina implicada en el control del S-REM en la misma preparación constituye un objetivo fundamental del proceso de obtención del preparado. A los efectos de cumplir con este objetivo las secciones del tronco encefálico se obtuvieron de manera tal que el plano de corte formó un ángulo de 4-6° con respecto a los cortes coronales (Fig. 3A). Las rodajas de la unión ponto-mesencefálica obtenidas se transfirieron a un recipiente especialmente acondicionado conteniendo una mezcla (50%-50%) de solución de LCRA estándar (NaCl 126 mM, KCl 2.7 mM, H₂KO₄P 1.25 mM, MgSO₄·7H₂O 2 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 10 mM, CaCl₂ 2 mM) y LCRA modificado a temperatura ambiente (20 a 22°C). La mezcla de LCRA se reemplazó en forma paulatina hasta alcanzar el 100%

de solución LCRA estándar, proceso que insumió alrededor de 1 hora. Finalizado el cambio de solución, las rodajas fueron transferidas a la cámara de registro (cámara de inmersión), y se perfundieron en forma continua (1-3 ml/min) con solución LCRA normal a temperatura ambiente. Durante el procedimiento de obtención de la rodaja, así como a lo largo de la sesión de registro, el LCRA fue burbujeado continuamente con carbógeno (95% O₂-5% CO₂) a los efectos de estabilizar el pH (7.4) y promover la oxigenación.

Una vez finalizada la etapa de incubación y sustitución de soluciones, la rodaja se transfirió a la cámara de registro para rodajas sumergidas (volumen ~2 ml) que se montó en la platina de un microscopio (Nikon, Eclipse FN1) dotado de iluminación infrarroja (IR) para contraste diferencial de interferencia (DIC-IR por *differential interference contrast*) con objetivos 4 × y 40 × (inmersión en agua) para el reconocimiento de las diferentes estructuras de la rodaja y de los cuerpos neuronales. Tal como ha sido mencionado, los animales seleccionados para este trabajo se encuentran entre el séptimo y el decimocuarto día de vida postnatal, etapa en la cual la mielinización no ha alcanzado aun el desarrollo del adulto, aspecto que fue relevante a la hora de optimizar las condiciones de visualización de las neuronas a registrar. El microscopio dispone de una cámara digital (319CU 3.2M CMOS, Micrometrics) conectada a un ordenador lo cual permitió, mediante la utilización del software Micrometrics LE-v1.0.3, la visualización de las neuronas, la colocación de los electrodos de estimulación y registro y de las micropipetas para aplicación local de sustancias, así como la captura de imágenes.

3.1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL PREPARADO *IN VITRO*

En la Introducción se hizo referencia a que algunos autores consideran como central a la red mesopontina ubicada en el sector rostral de la PRF situada ventralmente al SCP, medial al sector más rostral del NM V y lateral a la línea media y al *núcleo pontino del rafe*. Específicamente, como área de trabajo hemos seleccionado el sector más rostral de lo que autores como Paxinos & Watson (1998) reconocen como PnO. El área delimitada se muestra en la **Fig. 3 B-D**. Dado que la rodaja de la unión ponto-mesencefálica se obtuvo inclinando el plano de corte respecto de la perpendicular al eje mayor del tronco a nivel del sector más rostral del NM V, el sector *tegmental* de nuestra rodaja se asemeja al sector ventral del corte - 8.72 mm del Bregma del atlas de Paxinos & Watson (1998) en tanto que el sector más *tectal* (y el perfil de la cavidad ventricular) es relativamente más rostral y sería similar al del corte (~ -8,30 mm del Bregma) del mismo atlas (**Fig. 3A**). De manera característica en nuestra rodaja se visualiza claramente el SCP que se dispone de manera oblicua de dentro a afuera y de dorsal a ventral. La presencia en la rodaja del SCP con las características citadas y del polo rostral del NM V, así como el perfil de la cavidad ventricular, se consideró indicativo de que tanto el nivel del corte como su inclinación fueron los adecuados para el desarrollo del trabajo.

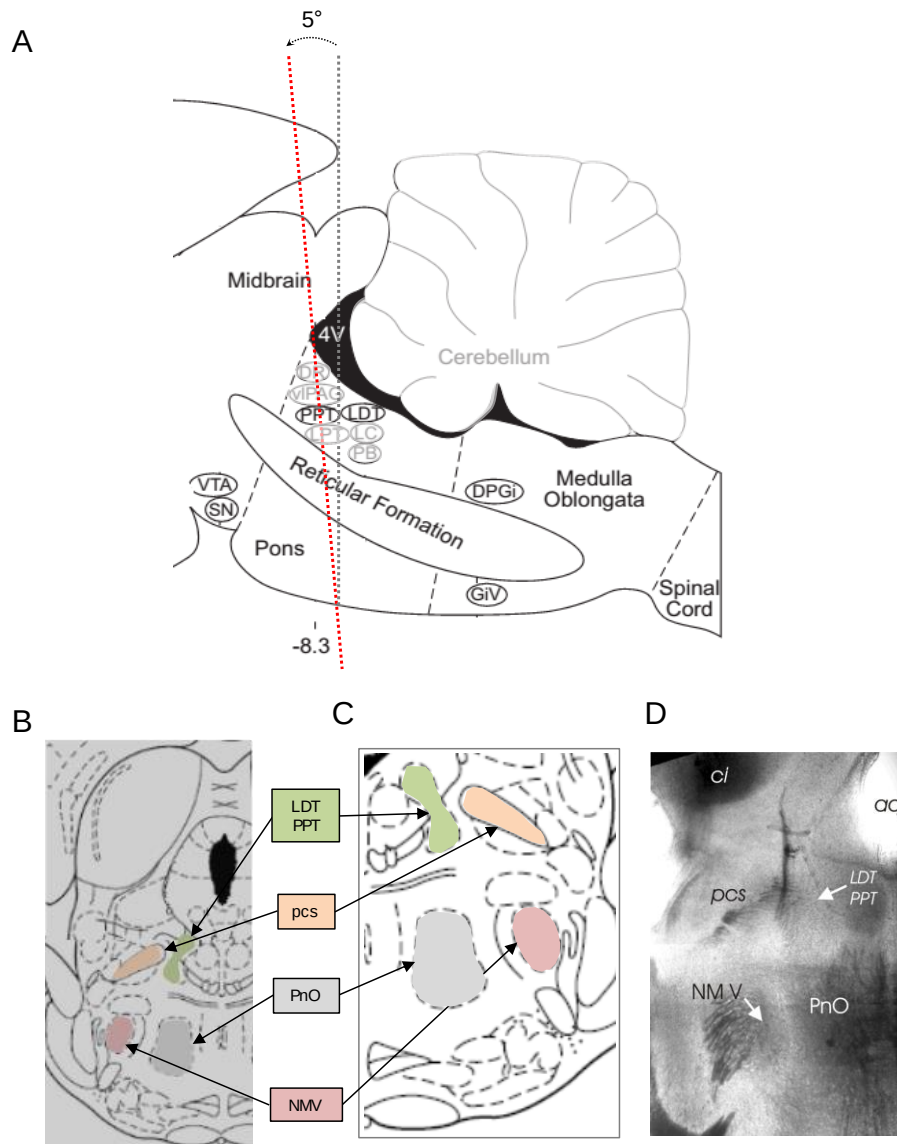


Fig.3. Estructuras del tronco encefálico de la rata implicadas en el control del ciclo de sueño-vigilia.

(A). Vista sagital del tronco encefálico ilustrando las principales estructuras a nivel mesencefálico, pontino y bulbar cuya actividad se ha vinculado al control del ciclo sueño y vigilia. Se indica la distancia del bregma -8.3 mm (según Paxinos & Watson, 1998). La línea punteada en rojo representa el nivel aproximado del corte realizado para la obtención de la rodaja de la unión ponto-mesencefálica utilizada en esta tesis. El plano de corte forma un ángulo aproximado de 5° respecto del plano habitualmente utilizado para la confección de los atlas estereotáxicos (línea punteada en negro). (Tomado y adaptado de Brown et al., 2012). A nivel pontino rostral el complejo LDT-PPT (en negro) se destaca por sobre los restantes núcleos implicados en el control del S-REM que no son objeto de análisis en el presente trabajo (en gris claro). **DR**, núcleo dorsal del rafe; **LC**, locus coeruleus; **LDT**, núcleo tegmental laterodorsal; **PnO**, núcleo *pontis oralis*; **PPT**, núcleo tegmental pedunculopontino; **vlPAG**, sustancia gris periaqueductal ventrolateral; **PB**, núcleo parabraquial. (B) y (C). Composición de cortes del tronco encefálico de la rata a partir de los que presenta el atlas de Paxinos & Watson (1998); el corte coronal 53 de este atlas corresponde al sector más dorsal (colicular) y el 55 al sector más ventral del corte (B). En C se destacan (sombreadas en distintos colores) las estructuras clave a nivel pontino objeto de estudio en la presente tesis (LDT-PPT y PnO) así como aquellas utilizadas como referencias anatómicas (SCP y NM V rosa). (D). Imagen de un área de la rodaja empleada en nuestro trabajo (fotografía de la preparación bajo microscopio con DIC-IR, objetivo 4X), en la que se reconocen las mismas estructuras señaladas en B y C. **ci**: colículo inferior. **aq**: acueducto. A-C, modificado de Brown et al. 2012.

3.2. ESTÍMULO ELÉCTRICO DEL LDT/PPT

Para la estimulación eléctrica del LDT/PPT, se empleó electrodos monopolares contruidos a partir de micropipetas de vidrio de *patch* de $\sim 5 \mu\text{m}$ de diámetro, fabricadas con un estirador P-87 (Sutter Instruments Co.) a las que se llenó con solución fisiológica (NaCl 0,9 %), e introdujo un electrodo metálico de *Ag* conectado a una SIU (por *Stimulus Isolation Unit*) controlada por una señal de tipo TTL (ISO-Flex, A.M.P.I. Jerusalem, Israel) por medio de la salida digital de la tarjeta de conversión (Digidata 1322).

Los parámetros de estimulación fueron controlados por el software (*Clampex 8, paquete pClamp, Axon Instruments*). A los efectos de obtener resultados comparables entre experimentos, el electrodo de estimulación se colocó sistemáticamente en una relación topográfica precisa con el extremo medial del SCP, y a una distancia aproximada de $1000 \mu\text{m}$ de las neuronas registradas en el PnO.

Se aplicó **trenes de 5 estímulos** con intervalos interestímulo de **$\sim 66,67 \text{ ms}$ (15 Hz)**, que emulan el patrón de descarga promedio descrito *in vivo* para neuronas GABAérgicas “*PS-max active*” durante el S-REM ($\sim 16,85 \pm 2,27 \text{ Hz}$) (Boucetta et al., 2014). El intervalo entre dos trenes de estimulación consecutivos fue de 10 s; en estas condiciones, el régimen de estimulación resultó neutral para el contacto sináptico, no advirtiéndose modificaciones persistentes de la eficacia introducida por este procedimiento. Para cada experimento se ajustó la intensidad del estímulo (pulso monofásico de corriente) hasta obtener una respuesta sináptica (IPSC) de *amplitud media* y *latencia* con valores similares a los observados en los experimentos referidos en la sección de *Antecedentes Específicos* (aprox. $70 \pm 10 \text{ pA}$ y $8 \pm 2 \text{ ms}$, respectivamente), de modo de trabajar con una población relativamente homogénea de respuestas postsinápticas. La magnitud de la corriente de estimulación inyectada para obtener IPSCs con las amplitudes mencionadas fue de 10-500 μA ; la duración de los estímulos del tren se fijó en valores de entre 0.3 y 0.4 ms.

3.3. REGISTRO INTRACELULAR

Las neuronas del PnO se seleccionaron para el estudio por inspección con el objetivo 40X dentro de un área comprendida entre el NM-V (a $\sim 250 \mu\text{m}$ de su límite medial) y a $\sim 250 \mu\text{m}$ de la línea media en el eje horizontal. En el eje dorsoventral, el centro del PnO se topografía a una distancia media de $\sim 1250 \mu\text{m}$ del límite ventral de la rodaja, quedando ligeramente ventral al centro aproximado del NM V en el mismo corte.

El registro electrofisiológico de las neuronas se realizó mediante electrodos de *patch* (resistencia 4-8 $\text{M}\Omega$) fabricados con un estirador de pipetas (P-87 Sutter Instruments Co.) en su configuración de célula entera (o de *whole cell*) optando por la modalidad de fijación de corriente

(CC, por *current clamp*)³ y/o de voltaje (VC, por *voltage clamp*)⁴ según las necesidades específicas del experimento. Los protocolos específicos en ambas modalidades de registro (VC y CC) fueron aplicados utilizando el software CLAMPEX 8.0 (pClamp, Axon Instruments). Las señales bioeléctricas registradas se digitalizaron a 40 kHz (Digidata 1322A Data Acquisition System, Axon Instruments). Para el registro de las corrientes sinápticas se aplicó un filtro pasa-bajas de 5 kHz (FL-4, DAGAN Corporation).

Los microelectrodos de *patch* fueron llenados con solución intracelular conteniendo KCl 150 mM, MgCl₂ 4.6 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, CaCl₂ 0.1 mM, ATP-Na 4 mM, GTP-Na 0.3 mM. Los electrodos se posicionaron mediante un micromanipulador hidráulico (Narishige MHW-13) y se conectaron a un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments). Estos fueron aproximados al soma de la neurona seleccionada, aplicando durante el descenso una presión positiva y monitorizando la resistencia del electrodo en condiciones de fijación de voltaje, mediante la aplicación de un pulso de comando (10 mV, 20 ms) (Hamill et al., 1981). Cuando por control visual (formación de un “*dimple*”) y eléctrico (incremento de la resistencia) pudo determinarse que el electrodo se hallaba situado en contacto estrecho con la membrana neuronal, se retiró la presión positiva y se monitorizó la resistencia hasta la formación del “*Gigasello*” ($R > 1 \text{ G}\Omega$, condición denominada “*cell attached*”), al tiempo que se llevó el potencial de mantenimiento (V_h) a un valor de $\sim -70 \text{ mV}$. Una vez estabilizado el sello se aplicó una leve presión negativa hasta su apertura, evidenciándose el incremento abrupto de la corriente capacitiva y la aparición de una corriente de pérdida durante la aplicación del comando de voltaje, indicativas de la obtención de acceso eléctrico a la neurona. Una vez abierto el sello y obtenido un registro intracelular estable (luego de ~ 5 minutos) se consignó el valor de potencial de reposo de la neurona y se pasó a condiciones de fijación de corriente (CC) a los efectos de llevar a cabo la caracterización electrofisiológica de la neurona.

De manera sistemática, la *resistencia de entrada* de las neuronas (R_{en}) se evaluó mediante protocolos de CC, consistentes en la aplicación de una serie de pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes (típicamente 1 nA) de 800 ms de duración. En Clampfit (pClamp 8) se midieron la corriente inyectada (I_m) y el potencial de membrana (V_m) resultantes para cada pulso, mediante cursores colocados en el instante (típicamente a 50 - 70 ms del inicio del pulso) correspondiente al máximo de la respuesta para el pulso hiperpolarizante de mayor magnitud. Los valores obtenidos se representaron gráficamente (gráfico $V_m = f(V_m)$ o simplemente V vs. I) y la R_{en} se calculó como la pendiente de la recta obtenida por ajuste de los puntos del sector lineal del gráfico (típicamente entre 0 y -60 mV).

Los pulsos aplicados mediante estos protocolos fueron suficientes para provocar

³ También referido como “*bridge recording*” o “*voltage-follower recording*”

⁴ cSEVC, por *continuous single electrode voltage-clamp*

hiperpolarizaciones del potencial de membrana de entre -100 y -110 mV y despolarizaciones que superan el nivel de disparo ($\sim +40$ mV) de potenciales de acción en estas neuronas. No se ensayó de manera sistemática la aplicación de protocolos específicos para poner de manifiesto la presencia de LTS u otras respuestas mediadas por conductancias de membrana operadas por voltaje en estas neuronas, excepto en una serie seleccionada de experimentos a la que se hará referencia en la **sección 4.1** del capítulo de *Resultados*.

Para el estudio de las *corrientes sinápticas GABAérgicas* (IPSCs) provocadas por estimulación eléctrica del LDT/PPT (en condiciones de VC), se empleó el medio intracelular referido, conteniendo una elevada concentración de Cl^- (150 mM) con el fin de controlar el potencial electroquímico de esta especie iónica (calculado en ~ 3 mV para dicha concentración de Cl^-), y optimizar la relación señal-ruido de los registros bioeléctricos. De esta manera, en el potencial de reposo (potencial de mantenimiento, $V_h = -70$ mV) la corriente sináptica GABAérgica fue de entrada y fácilmente detectable. Los IPSCs GABAérgicos fueron aislados farmacológicamente mediante la perfusión del preparado con ácido quinurénico (KYN) 5 mM, antagonista de los receptores AMPA/kainato de Glu (*4-Hydroxyquinoline-2-carboxylic acid*, PM = 189,17 g/mol, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich), preparado por disolución en LCRA. El comando de voltaje aplicado a la neurona incluyó un pulso breve (~ 20 ms) de -10 mV de amplitud al final de cada trazado, utilizado rutinariamente para monitorizar la *resistencia serie* (R_s). En los casos en que la R_s se modificó por encima de un 20% en el curso de un experimento, el registro fue descartado (Cabezas and Buño, 2006). La R_s se estimó como el cociente

$$R_s = \frac{10 \text{ mV}}{|I_m|}$$

Solo se incluyó en el estudio de los fenómenos de plasticidad sináptica de los contactos GABAérgicos aquellos IPSCs registrados en neuronas que presentaron respuestas monosinápticas a la estimulación del LDT-PPT, según los criterios de [Rose y Metherate \(2005\)](#) adaptados a nuestro diseño experimental: (i) reducida variabilidad de la latencia (*“jitter”*) con intensidades de estimulación submáximas, (ii) modificación menor a 1 ms con incrementos de la intensidad de estimulación y (iii) estabilidad de la latencia para frecuencias de estimulación de 15 Hz.

3.4. APLICACIÓN YUXTACELULAR DE AGONISTAS COLINÉRGICOS

Para el análisis de la modulación de la entrada sináptica GABAérgica a las neuronas del PnO se procedió a la aplicación yuxtacelular de soluciones de agonistas de los nAChRs y mAChRs. Para ello se empleó un sistema de inyección de microvolúmenes por presión (Picospritzer III, Parker Instrumentation). Se utilizó pipetas de *patch* conteniendo las soluciones de

agonistas disueltas en solución salina (NaCl 0,9 %). Bajo control visual las pipetas de inyección se posicionaron a distancias que oscilaron entre los 50 y 100 μm de la neurona registrada. Usualmente los volúmenes inyectados no excedieron los 30 pl (estimados empleando el diámetro de la gota en el aire ante pulsos de presión de entre 50 - 150 ms de duración y presiones inferiores a los 30 psi).

Específicamente se aplicó por microinyección *muscarina* (10 μM) y *nicotina* (20 μM) (concentraciones en la pipeta de inyección). Estas concentraciones se obtuvieron por dilución en NaCl (0.9%) de soluciones *stock* preparadas en H₂O destilada. Las concentraciones de agonistas empleadas corresponden a las ensayadas anteriormente por nuestro grupo y se sitúan en el rango de las aplicadas por otros autores en preparaciones *in vitro* (ver *Material Suplementario, Tabla S1*).

3.5. ANÁLISIS DE LAS CORRIENTES SINÁPTICAS

Las respuestas sinápticas fueron analizadas con el software Clampfit 9. Las medidas se realizaron en promedios de 20-60 respuestas consecutivas a trenes de 5 estímulos (con una frecuencia de estimulación de 15 Hz) aplicados a intervalos de 10 segundos. Aun cuando en algunos experimentos las respuestas se registraron en condiciones de CC, en la mayoría de los casos se analizaron en condiciones de VC (potencial de mantenimiento $V_h = -70\text{mV}$). Como se mencionó más arriba, las corrientes GABAérgicas se estudiaron adecuando el potencial de equilibrio electroquímico del ion cloro de tal manera de que al V_h las corrientes sinápticas fueron de entrada.

3.5.1. PARÁMETROS EMPLEADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS IPSCs GABAérgicos Y DE LOS FENÓMENOS PLÁSTICOS

1.a) Amplitud al pico del IPSC (pA). Su cuantificación se llevó a cabo en *Clampfit 10.7 (Molecular Devices)*. Puesto que los IPSCs corresponden a corrientes de entrada (a las que convencionalmente se representa con signo negativo) y a los efectos de simplificar la lectura de los resultados, en todos los casos se presenta el *valor absoluto* de esta variable. Se midió la amplitud al pico de cada uno de los IPSCs provocados por un tren de 5 estímulos (IPSC₁...IPSC₅) en un trazado. Se calculó luego la *media* y el *desvío estándar* (SD) de cada *i-ésimo* IPSC (*Sigma Plot 11.0, Systat Software*) a partir de $n = 20-100$ trazados consecutivos obtenidos en idénticas condiciones.

1.b) Eficacia sináptica. Puesto que la amplitud media de cada *i-ésimo* IPSC fue calculada incluyendo los *fallos* (i.e., incluyendo aquellos trazados en los que la estimulación presináptica no fue capaz de desencadenar una respuesta distinguible del ruido), la magnitud referida como

“amplitud media del IPSC” en el inciso anterior (simbolizada de aquí en adelante por R_i , $i=1 \dots 5$) corresponde *estrictamente* a la *eficacia sináptica* de la *i-ésima* respuesta (Cabezas and Buño, 2006)⁵.

1.c) La **probabilidad de fallos** de R_1 ($p_{f(R_1)}$) se estimó como el cociente entre el número de IPSCs (distinguibles del ruido) y el número de estímulos aplicado en un ensayo.

2) Cuantificación de $1/CV^2$ de R_i . El coeficiente de variación (CV , o coeficiente de variación de *Spearman*) constituye una medida de la dispersión relativa (*adimensional*) de un conjunto de datos respecto de la media. Se calculó en este trabajo para cada *i-ésima* respuesta postsináptica ($R_1 \dots R_5$) como

$$CV_R = \frac{\sqrt{\sigma_R^2}}{R_i}$$

Donde R_i corresponde, como ya se ha definido a la amplitud de los n IPSCs incluidos los fallos ($n \equiv$ número de trazados), σ_R^2 corresponde a la varianza de R_i y por tanto $\sqrt{\sigma^2}$ al desvío estándar (SD o *desviación típica*) de R_i . A partir de este valor se calculó el parámetro $\frac{1}{CV_R^2}$.

Clásicamente se asume que la liberación de neurotransmisor desde la terminal presináptica obedece a un proceso estocástico descrito por un *modelo binomial simple* (del Castillo and Katz, 1954), de acuerdo con el cual la amplitud media de R_i resulta del producto

$$R_i = \dot{n}_T \cdot p_r \cdot q$$

siendo $\dot{n}_T$ el número total de sitios activos del terminal, p_r la probabilidad de liberación del neurotransmisor y q (o *tamaño cuantal*) la amplitud media de la respuesta postsináptica⁶ provocada por la liberación de un *cuanto* de neurotransmisor. De acuerdo con este modelo, es posible demostrar que (para desarrollo ver Debanne et al., 1996; Faber and Korn, 1991; Malinow and Tsien, 1990)

$$CV_R = \sqrt{\frac{1 - p_r}{\dot{n}_T \cdot p_r}}$$

y por lo tanto

$$\frac{1}{CV_R^2} = \frac{\dot{n}_T \cdot p_r}{1 - p_r}$$

⁵ La **eficacia sináptica** se distingue de la **potencia sináptica**, para cuya cuantificación únicamente se incluye a los **éxitos** (i.e., la generación de respuestas de amplitud $\neq 0$) de cada ensayo.

⁶ Podría corresponder a *potenciales postsinápticos excitadores o inhibidores (EPSPs o IPSPs, respectivamente)*, o a *corrientes postsinápticas excitadoras o inhibitoras (EPSCs o IPSCs, respectivamente)*.

Al producto $\dot{n}_T \cdot p_r$ se lo denomina *contenido cuantal*. De este modo, el parámetro calculado como el inverso del cuadrado del coeficiente de variación de la respuesta R_i ($\frac{1}{CV_R^2}$) varía proporcionalmente con el contenido cuantal, proporcionando un estimador indirecto de la función o estado presináptico. **Las modificaciones de la eficacia sináptica de origen presináptico (resultantes de variaciones en p_r y/o $\dot{n}_T$) se asocian a cambios en $\frac{1}{CV_R^2}$, indicativos así de este origen.**

3) Latencia (ms). La latencia al *pie de la respuesta sináptica* se midió sobre el promedio de respuestas (sin la inclusión de los fallos) con el programa Clampfit (pClamp 9, Axon Instruments), detectándose aquel como el punto de intersección entre la línea de base (corriente de mantenimiento) y una recta que pasa por dos puntos, correspondientes aproximadamente al 20 y al 80% del máximo de la amplitud de pico del IPSC.

4) Tau on y tau off (ms). El **curso temporal de la corriente sináptica**, tanto en sinapsis centrales *glutamatérgicas* (Jonas, 2000) como *GABAérgicas* (Mody and Pearce, 2004) depende de un conjunto de factores tanto *pre* como *postsinápticos* (Eyre et al., 2012), y es considerado una de las características distintivas de un contacto sináptico dado. Por ello, tanto la fase de ascenso al pico como la de relajación a la corriente de mantenimiento de las respuestas promedio ($n=10-40$ trazados, sin incluir los fallos) se ajustaron a una única exponencial (Clampfit 9), según una función de la forma:

$$y = Ae^{-t/\tau_i}$$

a partir de la cual se obtuvo el parámetro τ_i , correspondiente a la *tau on* (τ_{on}) o la *tau off* (τ_{off}) según correspondiera el ajuste a la fase de ascenso o relajación de la corriente, respectivamente.

5) Índice de facilitación o depresión por pares de pulsos o PPR (por “*paired pulse ratio*”): Los contactos sinápticos con valores del **PPR** mayores a 1 se definen como contactos con *facilitación por pares de pulsos* (o **PPF**, por *paired-pulse facilitation*), al tiempo aquellos con valores del **PPR** menores a 1 se definen como contactos con *depresión por pares de pulsos* (o **PPD**, por *paired-pulse depression*); la **PPF** y la **PPD** se asocian, respectivamente, a una baja o alta probabilidad de liberación de neurotransmisor (p_r) desde la terminal presináptica.

El **PPR** se evaluó para el primer par de respuestas provocadas por la estimulación con trenes de 5 pulsos a 15 Hz según la fórmula

$$PPR_{66.7} = R_2/R_1$$

donde R_2 y R_1 corresponden a la **eficacia sináptica** del primer y segundo IPSCs del tren, respectivamente; el subíndice indica la duración del intervalo interestímulo (~ 66.67 ms).

6) Perfil de la plasticidad sináptica de corto plazo (STP_p por short term plasticity profile) y STPR (por short-term plasticity ratio): A los efectos de caracterizar la **STP** de un contacto sináptico, diversos autores han introducido la descripción del **perfil de la STP** (o **STP_p**, por *short-term plasticity profile*) (Barroso-Flores et al., 2015; Dittman et al., 2000; Mukunda and Narayanan, 2017; Yasui et al., 2005).

6.a) El **STP_p** corresponde al perfil o **curso temporal de la eficacia sináptica**. De forma característica, este es evaluado mediante la normalización de las amplitudes medias de cada una de las respuestas sinápticas (R_i) provocadas por la aplicación de un número definido de estímulos presinápticos (habitualmente trenes de entre 5-15 estímulos) a la amplitud media de la respuesta provocada por el primero de ellos (R_1). Esta herramienta descriptiva es particularmente valiosa para el estudio de los fenómenos plásticos de corto plazo dependientes de la frecuencia (e.g., STD, STF, PTP, etc.). En esta tesis se evaluó el comportamiento dinámico de los IPSCs ante protocolos de estimulación de 5 estímulos a 15 Hz (intervalo de ~ 66.67 ms); el **STP_p** se representó gráficamente como el valor de la eficacia sináptica de cada R_i **normalizado** al valor de R_1 en función del número de estímulo correspondiente (1...5). Por razones prácticas, se reserva para la sección **4.2.** del capítulo de Resultados la presentación de una herramienta complementaria para la descripción de este perfil, consistente en la cuantificación de la **constante de tiempo** ($\tau_{15\text{Hz}}$) que caracteriza la **evolución temporal de la eficacia sináptica durante la activación repetitiva**.

6.b) El **STPR** es análogo al **PPR** y permite una descripción cuantitativa del **STP_p**. Se calculó de acuerdo con la fórmula

$$STPR = \frac{\frac{1}{3} \sum_{i=3}^5 R_i}{R_1}$$

donde R_3 , R_4 y R_5 corresponden a la eficacia sináptica del tercer, cuarto y quinto IPSC, respectivamente, y R_1 corresponde al mismo parámetro que en el referido para el cálculo del PPR (Dittman et al., 2000; Mukunda and Narayanan, 2017; Yasui et al., 2005). Los valores de R_i en la fórmula correspondieron siempre a la amplitud de pico promedio ($n = 20-100$ trazados) incluyendo los fallos en la generación de un IPSC por la estimulación presináptica.

7) Carga inhibitoria neta transferida (Q_{inh} , $pA \cdot ms$): Se cuantificó la *carga inhibitoria transferida* (Q_{inh}) (Gardner, 1980; Hessler et al., 1993; Rinzel and Rall, 1974) a las neuronas del PnO durante la activación presináptica repetitiva de las aferentes GABAérgicas. La Q_{inh} permite estimar la **magnitud total de la inhibición postsináptica** resultante de un tren de IPSCs provocados por la estimulación presináptica (Lu and Trussell, 2000; Nusser et al., 2001; Rosenmund and Stevens, 1996).

La carga eléctrica (pA.ms) transferida a la neurona se cuantificó como el área bajo el trazado de *corriente en función del tiempo* ($I_m = f(t)$) comprendida entre un instante $t = 0$ y un instante $t = 0 + \Delta t$ (Fig. 4). de acuerdo con:

$$Q_{inh} = \int_{t=0}^{t=0+\Delta t} I_m dt$$

El intervalo Δt se definió **para cada neurona registrada** entre el instante $t = 0$ correspondiente al pie de R_1 (establecido por un criterio similar al descrito para la medición de la *latencia*) y un instante definido como aquel en el que el trazado $I_m = f(t)$ corta la recta horizontal que pasa por la curva en $t = 0$ (línea entrecortada horizontal en la Fig. 4). Este método tuvo como objetivo **minimizar el efecto de la suma temporal de los IPSCs dentro de un tren**.

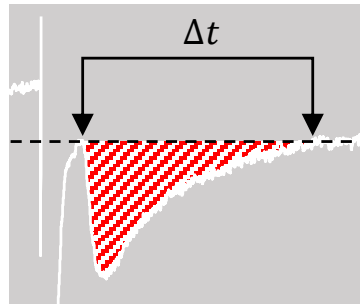


Fig. 4. Esquema ilustrativo del método aplicado para la cuantificación del área bajo el trazado de la corriente sináptica. El área rayada en rojo corresponde a la Q_{inh} de un IPSC. Explicación en el texto.

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El procesamiento estadístico de los datos se llevó a cabo en *Sigma Plot 11.0* (Systat Software). La significación estadística de las diferencias relativas a un parámetro de interés entre dos grupos dados se determinó de acuerdo con el siguiente procedimiento. Los parámetros de interés (e.g. *amplitud de R_1 , latencia de R_1 , R_{en} , PPR, STPR, τ_{off} , etc.*) fueron cuantificados en cada neurona registrada. Se halló para cada parámetro su correspondiente valor medio a partir de los n valores obtenidos en cada neurona. Se definió una población de interés (A, B, C, etc.) de estos valores medios de tamaño N_A , N_B , etc. Salvo que se indique específicamente lo contrario, los valores de los parámetros cuantificados se presentan en el texto como la **media** de la población de tamaño $N \pm$ el **error estándar de la media (SEM)**.

La prueba de contraste de bondad de ajuste a una *distribución normal* de la **población de**

valores medios de tamaño N seleccionada fue la de *Shapiro-Wilks* ($N \leq 50$). Siempre que las muestras de datos superaron las pruebas de normalidad, la significación estadística de las diferencias entre dos poblaciones (N_A vs N_B) se determinó con **test de t** (*t-test*) o **test de t para datos apareados** (*paired t-test*) según correspondiera. En caso contrario se empleó la **prueba U de Mann-Whitney** (*Mann-Whitney rank sum test*) (datos no apareados) o bien la **prueba de los rangos con signo de Wilcoxon** (*Wilcoxon signed rank test*), test no paramétrico que compara la mediana de dos muestras (datos apareados), según correspondiera. La prueba no paramétrica de **Kruskal-Wallis** (*Kruskal-Wallis one way Analysis of Variance on ranks*, KW-ANOVA) constituye una extensión de la prueba U de Mann-Whitney y se empleó para comparar 3 o más grupos con números de muestras diferente y que no superaron la prueba de normalidad. El método de Dunn (*Dunn's Method*)⁷ fue empleado para establecer la significación estadística de la diferencia entre los grupos ($p > 0.05$). Para la comparación de **proporciones** se empleó la prueba-Z (**z-test**), basada en la aproximación normal de la distribución binomial.

La representación gráfica de datos que no presentaron una distribución normal se realizó mediante gráficos de caja y línea (*box plots*). Los límites inferior y superior de la caja representan los percentiles 25° y 75° (P_{25° , P_{75°), respectivamente; las barras de error representan los percentiles 10° (P_{10° , inferior) y 90° (P_{90° , superior); la línea horizontal dentro de la caja representa la **mediana** (correspondiente al percentil 50°, P_{50°); los puntos ubicados por encima y por debajo representan valores no comprendidos entre los percentiles P_{10° y P_{90° (*outlying points*).

La significación estadística se representa como “*” ($p < 0.05$), “**” ($p < 0.01$) y “***” ($p < 0.001$).

⁷ Test *post hoc* que no asume una distribución particular de los datos de la muestra.

4. RESULTADOS

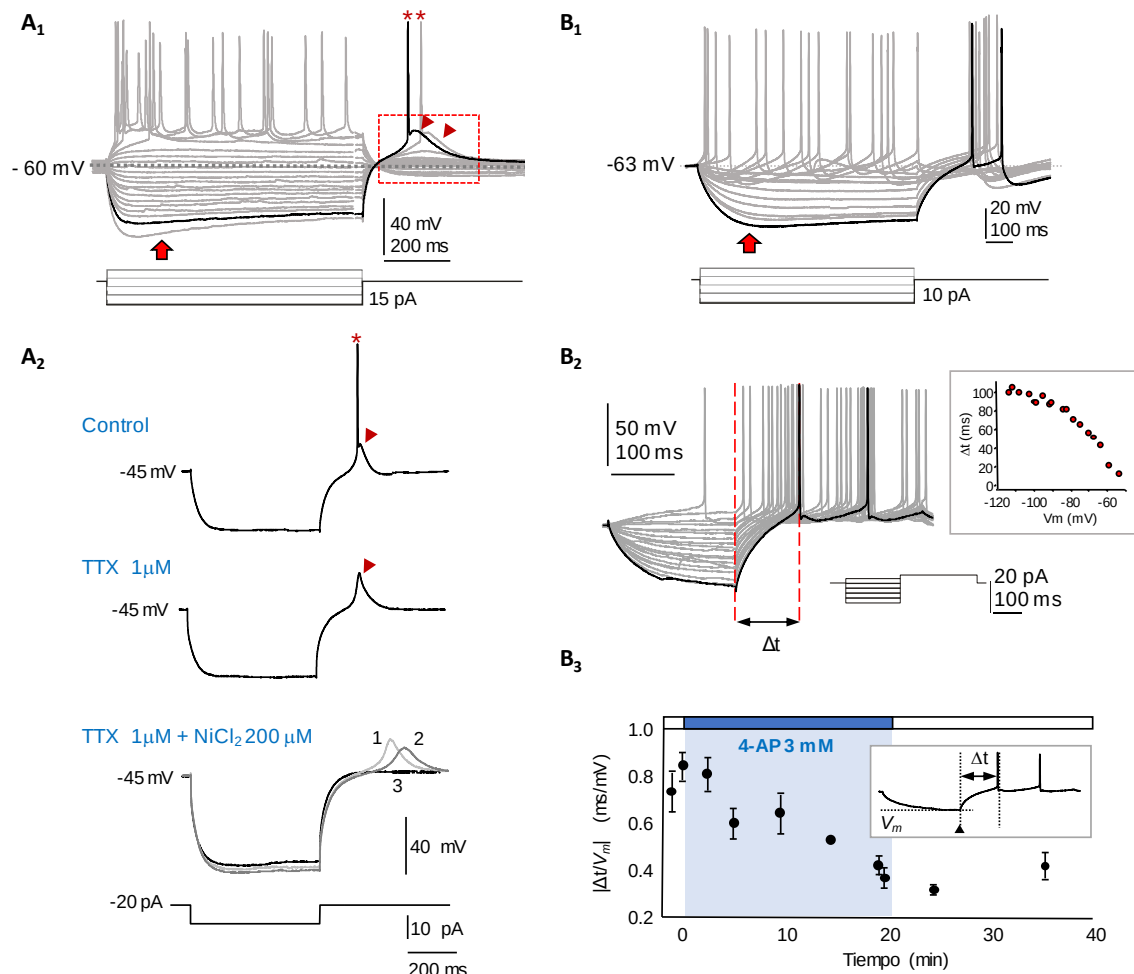
4.1. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS DEL PnO

Las características electrofisiológicas de las neuronas del PnO registradas en este trabajo señalan la presencia de los fenotipos **LTS** (i.e., neuronas que presentan *espiga de Ca^{2+} de bajo umbral*, mediada por la activación de la corriente de Ca^{2+} transitoria I_T ; **Fig. 5A₁** y **5A₂**) y **no-LTS** (i.e., neuronas que carecen de **LTS**; **Fig. 5B₁**). En estas neuronas se registró asimismo respuestas del potencial de membrana a la inyección de pulsos de corriente compatibles con la expresión de las *corrientes de potasio de tipo A* (**Fig. 5B₁** y **5B₂**) y *catiónica activada por hiperpolarización de tipo I_h* (**Fig. 5A₁** y **5B₁**). Estos resultados guardan razonable similitud con los reportados por otros autores (ver por ejemplo Gerber et al., 1989; Greene et al., 1989; Ito et al., 2002; Núñez et al., 2002, 1997; Nuñez et al., 1998) y con los obtenidos anteriormente por nuestro grupo (Kunizawa, 2016; Pino et al., 2017). La R_{en} se cuantificó en **N=82** neuronas del PnO (35 rodajas); su valor medio fue de $310 \pm 25 \text{ M}\Omega$, resultado similar al que reportara anteriormente Kunizawa (2016) ($292.17 \pm 22.41 \text{ M}\Omega$). La caracterización electrofisiológica de las neuronas del PnO no representó un *objetivo específico* de este trabajo, por lo que no se llevó a cabo la aplicación de protocolos electrofisiológicos específicamente orientados a la detección de la LTS u otras corrientes voltaje-dependientes en estas neuronas. La LTS fue detectada en el 22 % de las neuronas a las que se aplicó los protocolos empleados para la cuantificación de la R_{en} ; estos incluyeron pulsos de corriente capaces de provocar hiperpolarizaciones del V_m de entre -100 y -110 mV (aprox.). En la **Fig. 5A₂** se presenta los resultados obtenidos en una serie de experimentos seleccionados (N=3) para evidenciar la participación de la corriente I_T en la generación de la LTS. La expresión de corrientes de tipo I_A en estas neuronas fue explorada asimismo en otra serie de experimentos seleccionados (N=3, **Fig. 5B₂** y **5B₃**).

>>

Fig. 5. Características electrofisiológicas de las neuronas del PnO. (A₁) Neurona representativa del fenotipo **LTS**. Familia de respuestas del V_m (trazados superiores) provocadas por la aplicación de pulsos de corriente (esquemáticos en la parte inferior) de 800 ms de duración, desde -20 pA a 17,5 pA, $\Delta = 1,5 \text{ pA}$, $I_{hold} = -14,0 \text{ pA}$. La flecha señala la rectificación de entrada (*sag*), característica de la activación de la corriente de tipo I_h . Note a la salida del pulso hiperpolarizante (recuadro en línea entrecortada) la ocurrencia de respuestas despolarizantes lentas (puntas de flecha) de tipo todo o nada, con características compatibles con las de espigas de Ca^{2+} de bajo umbral, en cuya fase de ascenso se desencadenan potenciales de acción de Na^+ (*). **(A₂)** Resultado obtenido en experimentos seleccionados (N=3), mostrando una respuesta de tipo LTS a la salida de la hiperpolarización (punta de flecha) provocada por el pulso ilustrado en el inserto, sobre la que se produce una espiga rápida de Na^+ (**Control**). En tanto la perfusión de TTX $1 \mu\text{M}$, no afecta a la LTS (punta de flecha, **TTX $1 \mu\text{M}$**) esta se bloquea si se añade $NiCl_2$ $200 \mu\text{M}$ a la solución de perfusión (**TTX $1 \mu\text{M}$ + $NiCl_2$ $200 \mu\text{M}$**), indicando la participación de la I_T en la generación de esta espiga. Los trazados 1, 2 y 3 en el sector inferior corresponden a los obtenidos tras 15, 20 y 30 minutos de iniciada la perfusión

con NiCl_2 respectivamente. A_1 y A_2 corresponden a neuronas diferentes. **(B₁)** Neurona representativa del fenotipo **no-LTS**. La aplicación de un protocolo similar al de A_1 no es capaz de provocar la ocurrencia de respuestas del tipo de la LTS. La flecha señala la rectificación de entrada (*sag*). **(B₂)**. La latencia a la primera espiga (Δt , medida entre las líneas entrecortadas verticales) provocada por un pulso despolarizante, varía con el valor máximo del V_m alcanzado durante la aplicación de prepulsos hiper y despolarizantes (protocolo esquematizado en la parte inferior, integrado por una familia de prepulsos hiperpolarizantes al cierre de los cuales se aplica un pulso despolarizante capaz de provocar la descarga de potenciales de acción). Inserto, gráfico de la latencia a la primera espiga (Δt) en función del valor de V_m alcanzado durante los prepulsos. Estos resultados son indicativos de la expresión de corrientes de K^+ de tipo I_A activadas por despolarización (usualmente > -60 mV), presentando inactivación característicamente en el rango comprendido entre -60 y -40 mV. **(B₃)**. La activación de esta corriente provoca característicamente el retraso de la descarga de potenciales de acción en respuesta al pulso despolarizante, de modo tal que la *latencia a la primera espiga* (Δt) guarda una relación inversa con la magnitud del *prepulso*. Se representa el valor absoluto del cociente $\Delta t/V_m$ ($|\Delta t/V_m|$, ordenadas, empleado como estimador de la magnitud de la corriente de tipo I_A , en función del tiempo (minutos, abscisas), antes, durante y después de la perfusión del preparado con 4-aminopiridina (4-AP, 3 mM; el curso del experimento se ilustra en la barra horizontal sobre el gráfico). La reducción del cociente $\Delta t/V_m$ alcanzó significación estadística (*Mann-Whitney U-test*, $p < 0.001$). En el inserto, esquema de una respuesta típica en la que se indican la latencia a la primera espiga (Δt) y el instante en el que se mide el V_m al final del prepulso (punta de flecha). Cada punto del gráfico representa el valor medio $\pm$ SD de este cociente obtenido en 20 trazados sucesivos a intervalos regulares. La reducción de $|\Delta t/V_m|$ que tiene lugar durante la aplicación de 4-AP pone de manifiesto la contribución de la corriente de tipo I_A en la determinación de la latencia a la primera espiga en esta neurona.



4.2. PLASTICIDAD SINÁPTICA DE CORTO PLAZO (STP) EN LAS AFERENTES GABAérgicas AL PnO

Tal como fuera expuesto en la sección de *Antecedentes Específicos*, los IPSCs provocados por la estimulación de aferentes GABAérgicas mediante pares de pulsos aplicados al LDT/PPT con un intervalo interestímulo (IIE) de 150 ms, presentaron un valor medio del PPR_{150} que fue mayor a 1 (ver **Tabla 1**); la mayor parte de los IPSCs analizados en estas condiciones presentó facilitación por pulsos pareados (PPF), advirtiéndose no obstante la ocurrencia de depresión por pares de pulsos (PPD) en una proporción menor (ver [Kunizawa, 2016](#)). Como primera aproximación a la descripción de los mecanismos plásticos de los contactos GABAérgicos dependientes de la estimulación presináptica a 15 Hz (IIE 66.7 ms), se procedió al análisis de la eficacia del primer par de respuestas (R_1 , R_2) provocadas por el tren de 5 estímulos. El diseño experimental empleado se ilustra en la **Fig. 6E**.

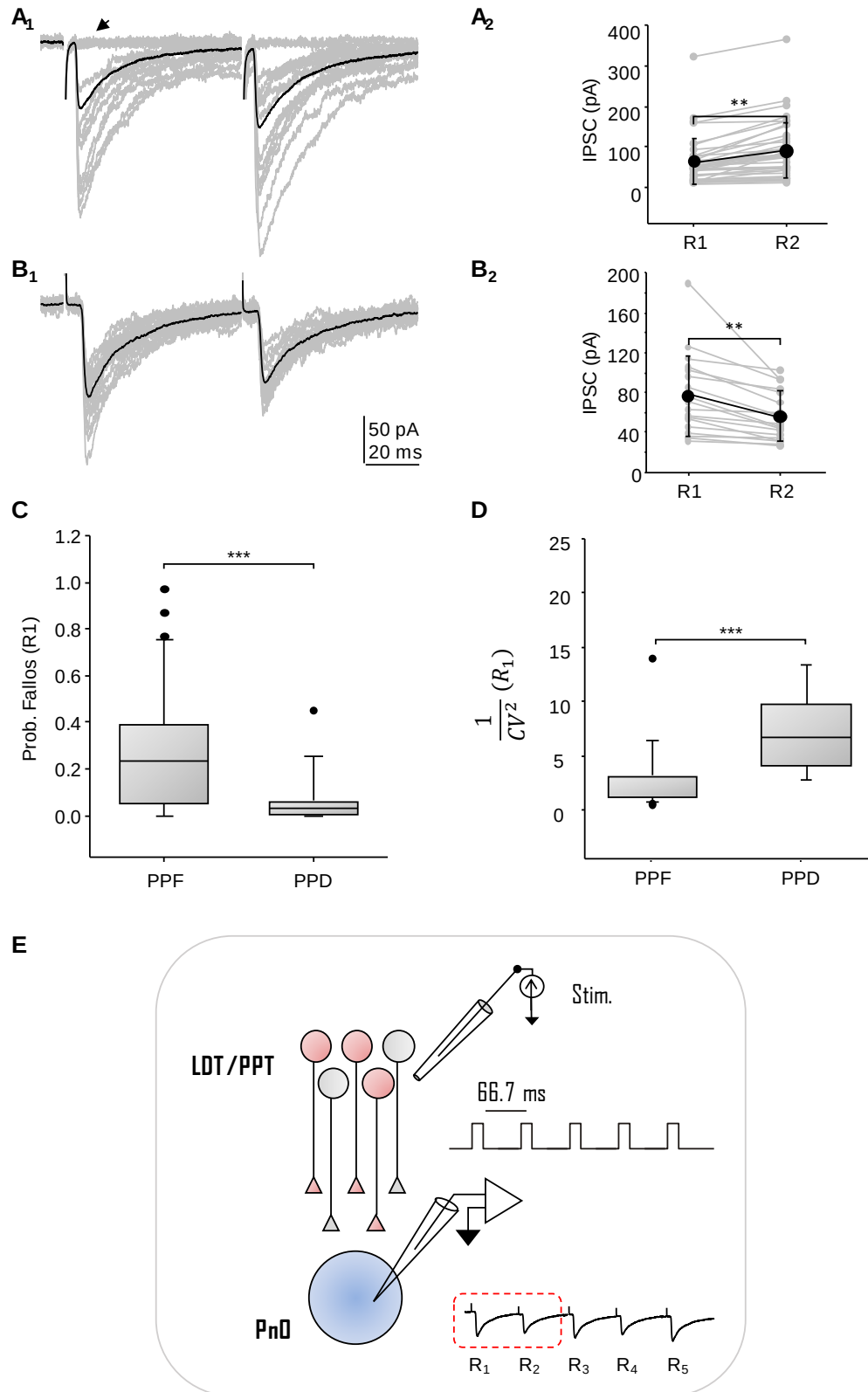
La cuantificación del $PPR_{66.7}$ permitió identificar dos grupos de aferentes activadas en estas condiciones. En un 69 % de las neuronas registradas, las respuestas postsinápticas mostraron **PPF** (**Fig. 6A**) con un valor medio del $PPR_{66.7} = 1.582 \pm 0.149$ ($N=40$). En este grupo, las amplitudes R_2 (90.85 ± 10.88 pA) fueron significativamente mayores que las amplitudes de R_1 (64.09 ± 9.14 pA) (**Fig. 6A₂**). En el restante 31 % de las neuronas del PnO registradas se observó en cambio **PPD** (**Fig. 6B₁**), con un valor medio del $PPR_{66.7} = 0.763 \pm 0.031$. En este grupo, las amplitudes medias de R_2 (55.96 ± 5.92 pA) fueron significativamente menores que las de R_1 (76.56 ± 9.58 pA) (**Fig. 6B₂**). Los valores del $PPR_{66.7}$ para ambos grupos (**PPF** vs **PPD**) mostraron una diferencia que alcanzó significación estadística (*Mann-Whitney Rank Sum Test*, $p < 0.001$).

Característicamente las respuestas postsinápticas con **PPF** mostraron una **probabilidad de fallos de R_1** (p_{f1}) significativamente mayor que las respuestas en las que se verificó **PPD** (**Fig. 6C**). La elevada p_{f1} evidenciada en este grupo se correspondió asimismo con valores de $1/CV^2$ para R_1 significativamente más bajos que en el grupo que exhibió **PPD** (**Fig. 6D**).

>>

Fig. 6. Caracterización del primer par de respuestas (R_1 , R_2) provocadas por la estimulación a 15 Hz de las aferencias GABAérgicas. (A₁). Respuestas sinápticas en una neurona del PnO representativa del grupo en el que los IPSCs provocados por estimulación del LDT/PPT a 15 Hz presentaron **PPF** ($PPR_{66.7} > 1$), donde se superponen $n=60$ trazados (gris) y el promedio de éstos (negro). Puede observarse la ocurrencia de fallos en R_1 (flecha), fenómeno característico de este tipo de contactos. En el ejemplo seleccionado también ocurren fallos de R_2 . **(A₂).** Amplitudes medias de la primera y la segunda respuesta para cada una de las neuronas del grupo que exhibió **PPF** (gris), y el valor promedio de la población de neuronas de este grupo (negro) (*Wilcoxon Signed Rank Test*, $p < 0.01$, $N=40$). **(B₁)** y **(B₂)** corresponden a los mismos elementos representados en **A₁** y **A₂**, respectivamente, pero para el grupo que presentó **PPD** (*Wilcoxon Signed Rank Test*, $p < 0.01$, $N=18$). **(C).** Gráficos de caja y línea que representan la **probabilidad de fallos de R_1** para cada uno de los grupos (**PPF** y **PPD**). **(D).** Gráficos de caja y línea en los que se representan los valores de $1/CV^2$ para el primer IPSC (R_1) correspondientes a cada uno de los grupos (**PPF** y **PPD**). **C** y **D:** *Mann-Whitney Rank Sum Test*, $p < 0.001$. **(E).** Esquema que representa el diseño experimental empleado para la

estimulación del LDT/PPT (*Stim.*) y el registro de IPSCs en neuronas del PnO. Se esquematiza el tren de pulsos aplicado indicando el IIE. En el LDT/PPT se esquematizan neuronas GABAérgicas (rojo) y no GABAérgicas (gris). Los IPSCs GABAérgicos fueron aislados farmacológicamente (KYN 5 mM). En el sector inferior se esquematiza un trazado con 5 IPSCs ($R_1 \dots R_5$), señalando con un recuadro en línea entrecortada el primer par de IPSCs analizados en la sección 4.2.



Las diferencias funcionales entre ambos grupos (**PPF** vs **PPD**) no se asociaron a diferencias en los parámetros identitarios de los IPSCs GABAérgicos. Las **latencias** de R_1 (PPF: 7.54 ± 0.37 ms; PPD: 7.83 ± 0.56 ms; **Fig. 7A**), los valores medios de la **amplitud de R_1** (PPF: 64.09 ± 9.14 pA; PPD: 76.56 ± 9.58 pA; **Fig. 7B**), de la τ_{off} del primer IPSC (PPF: 17.86 ± 1.09 ms; PPD: 18.96 ± 1.03 ms; **Fig. 7C**) y las R_{en} de las neuronas registradas (PPF: 291.38 ± 27.75 M Ω ; PPD: 256.65 ± 36.03 M Ω ; **Fig. 7D**) no presentaron diferencias entre los grupos. Adicionalmente, las proporciones de neuronas LTS detectadas de acuerdo con lo referido en la sección 4.1., correspondientes a 22.2 % en el grupo con **PPF** y 17.6 % en el grupo con **PPD**, tampoco presentaron diferencias significativas entre ambos grupos (2 sample z-test; $z = 0.0497$; $p = 0.960$).

En suma, el análisis del primer par de IPSCs provocados por la estimulación del LDT/PPT a la frecuencia de **15 Hz** permite la categorización de las aferentes GABAérgicas activadas en dos grupos, en los que tiene lugar la asociación de (i) $\text{PPR} < 1$ (**PPD**) + baja $p_f(R_1)$ + elevado $\frac{1}{CV^2}(R_1)$, o bien (ii) $\text{PPR} > 1$ (**PPF**) + alta $p_f(R_1)$ + bajo $\frac{1}{CV^2}(R_1)$. Estos grupos no presentaron diferencias significativas en los parámetros identitarios de los IPSCs GABAérgicos caracterizados en este trabajo.

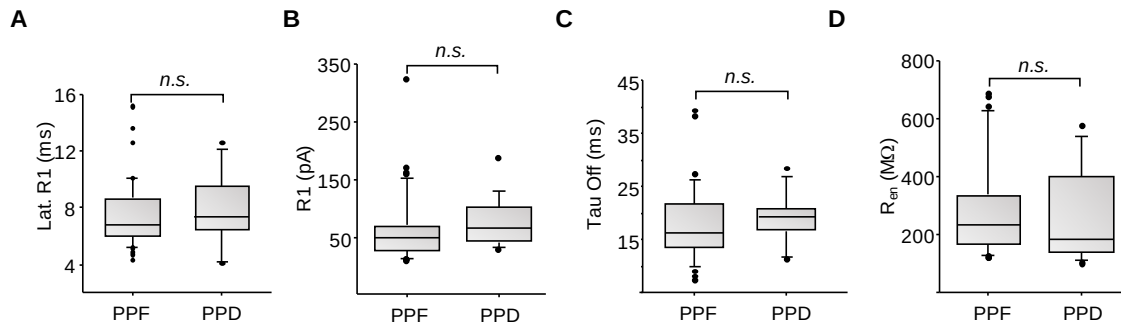


Fig. 7. Comparación de las características identitarias de los contactos GABAérgicos entre los grupos con PPD y PPF. (A). Latencias promedio de R_1 (ms) **(B).** Amplitudes promedio de R_1 (pA) **(C).** Constantes de tiempo (ms) de la relajación de la corriente sináptica (τ_{off}). **(D).** Resistencias de entrada de las neuronas registradas (M Ω). *n.s.*: diferencia no significativa (Mann-Whitney Rank Sum Test; A: $p = 0.460$; B: $p = 0.091$; C: $p = 0.195$; D: $p = 0.368$).

El análisis de las 5 respuestas postsinápticas ($R_1 \dots R_5$) provocadas por la estimulación pre-sináptica a 15 Hz aportó datos indicativos de la existencia de **fenómenos de plasticidad sináptica de corto plazo (STP) dependientes de actividad en los contactos GABAérgicos** (Dittman et al., 2000; Fioravante and Regehr, 2011; Zucker and Regehr, 2002). Estos se expresan en el curso de la activación repetitiva de las aferentes GABAérgicas a 15 Hz como **depresión o facilitación por frecuencia**, existiendo asimismo un perfil de plasticidad bifásico (STB) en el que la eficacia

de la población de aferentes reclutada muestra un curso temporal más complejo. La cuantificación de los índices **PPR_{66.7}** y **STPR** de las respuestas postsinápticas a los trenes de estimulación aplicados permitió definir el **perfil de plasticidad sináptica de corto plazo (STP_P)** de la población de aferentes activada en cada experimento. Los valores de estos índices para las respuestas registradas en N=58 neuronas se resumen en la [Fig. 8A](#). De acuerdo con el **STP_P**, las entradas GA-BAérgicas pudieron ser divididas en tres grupos:

1. Un grupo mayoritario (52 % de las neuronas registradas, N=30) presentó **facilitación por frecuencia (STF)**, i.e., un **incremento gradual de la eficacia sináptica de R₁ a R₅**. Las respuestas postsinápticas incluidas en esta categoría corresponden a aquellas en las que tanto los valores del **PPR_{66.7}** (1.649 ± 0.195) como del **STPR** (2.178 ± 0.411) fueron mayores que 1; el **STPR** fue en este grupo significativamente mayor que el **PPR_{66.7}** (*Wilcoxon Signed Rank Test*, $p < 0.001$).
2. El 28 % (N=16) presentó **depresión por frecuencia (STD)**, i.e., una **reducción gradual de la eficacia sináptica de R₁ a R₅**; los valores del **PPR_{66.7}** (0.755 ± 0.0356) y del **STPR** (0.619 ± 0.0357) fueron menores que 1, siendo asimismo el **STPR** significativamente menor que el **PPR_{66.7}** (*Wilcoxon Signed Rank Test*, $p < 0.001$)⁸.
3. En el restante 20 % de las neuronas registradas (N=12), los valores de los índices estimados no correspondieron estrictamente a ninguna de las categorías anteriores, verificándose en general un incremento de la eficacia de **R₁ a R₂₋₃**, con una reducción ulterior (**R₂₋₃ a R₅**). El **STP_P** de este grupo se definió como **bifásico (STB)**, por *short-term biphasic plasticity* en concordancia con la terminología empleada por otros autores ([Barroso-Flores et al., 2017, 2015](#); [Yasui et al., 2005](#)). Así, mientras que los grupos **STF** y **STD** presentaron entre sí diferencias significativas tanto en el **PPR_{66.7}** como en el **STPR**, los grupos **STF** y **STB** mostraron diferencias significativas únicamente en el **STPR**; los grupos **STD** y **STB** presentaron diferencias significativas para ambos índices (ver [Fig. 8A](#)).

La existencia de tres **STP_P** definidos por los índices **PPR_{66.7}** y **STPR** se observa de modo más evidente en la [Fig. 8B](#). En esta figura, cada *k*-ésimo perfil evaluado (i.e., el **STP_P** de las respuestas postsinápticas en cada neurona registrada, $k = 1 \dots k = 58$) es representado como un punto definido en el plano cartesiano de ejes $x \equiv \text{PPR}_{66.7}$, $y \equiv \text{STPR}$, por el par de coordenadas (PPR_k ; STPR_k). Este gráfico permite observar que los puntos correspondientes al perfil **STF** se

⁸ De las 16 neuronas incluidas en este grupo, una presentó un $\text{PPR}_{66.7} = 1.015$ y un $\text{STPR} = 0.713$. En virtud de que el **STPR** es sensiblemente inferior a 1 y de que el **PPR** es en cambio apenas distinto de 1 (en efecto, la diferencia R_1 - R_2 para esta neurona no es significativa, *paired t-test*, $p = 0.928$), esta neurona se incluyó en el grupo **STD** y no en el **STB**.

situían predominantemente en una región en la que se verifica $STPR > PPR > 1$, los puntos correspondientes al **STD** lo hacen en la región en la que se verifica $STPR < PPR < 1$, mientras que los del perfil **STB** se distribuyen de modo menos restringido, aunque predominantemente en la región en la que se verifica $STPR < PPR > 1$.

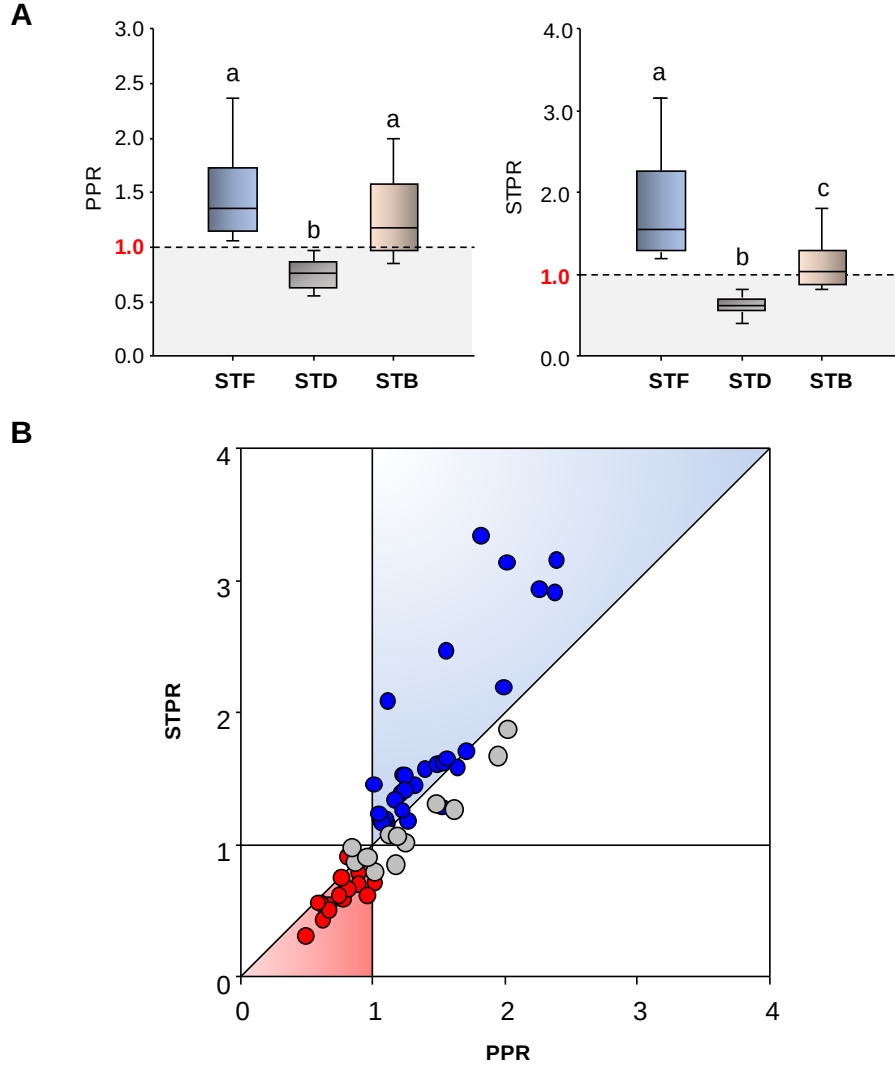


Fig. 8. Caracterización de los perfiles de STP. (A). Gráficos de caja y línea donde se representan las magnitudes del $PPR_{66.7}$ (izquierda) y del STPR (derecha) para los tres grupos de contactos (STF, STD, STB), indicando la significación estadística de las diferencias entre los grupos (*Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks*; letras iguales: no significativo; letras diferentes: $p < 0.05$). (B). Diagrama en el que se representa los perfiles de plasticidad en un plano cartesiano de ejes $x = PPR_{66.7}$, $y = STPR$. Para cada neurona registrada ($N=58$), el perfil de plasticidad de las respuestas postsinápticas se representa como un punto al que corresponden las coordenadas $PPR_{66.7}$ (abscisas) y STPR (ordenadas). STF (●), STD (●), STB (●). La línea vertical corresponde a $PPR_{66.7}=1$, la horizontal a $STPR=1$, y la diagonal a la identidad $PPR_{66.7}=STPR$. Las regiones sombreadas corresponden a aquellas en las que se verifica $STPR > PPR_{66.7} > 1$ (azul) y $STPR < PPR_{66.7} < 1$ (rojo). Nótese la distribución menos regular de los contactos con perfil de tipo STB.

En la **Fig. 9A₁₋₃** se presenta el registro de las respuestas postsinápticas de neuronas representativas de cada uno de los tres grupos anteriormente definidos. Como puede observarse, la eficacia sináptica se incrementa gradualmente de R₁ a R₅ en un contacto del grupo **STF** (**Fig. 9A₁**), advirtiéndose en cambio una reducción gradual de la eficacia sináptica de R₁ a R₅ en un contacto del grupo **STD** (**Fig. 9A₂**). Finalmente, un comportamiento más complejo, que se caracteriza en el ejemplo presentado en la **Fig. 9A₃** por un incremento de la eficacia de R₂ respecto a R₁, con una ulterior reducción de la eficacia desde R₂ a R₅ es evidenciado en los contactos del grupo **STB**. El **STP_p** promedio de las aferentes pertenecientes a cada grupo se representa gráficamente en la **Fig. 9B**, donde el valor medio de cada *i*-ésima respuesta (R₁₋₅ con *N* = 30, 16 o 12 según el grupo) ha sido normalizado al valor del primer IPSC provocado.

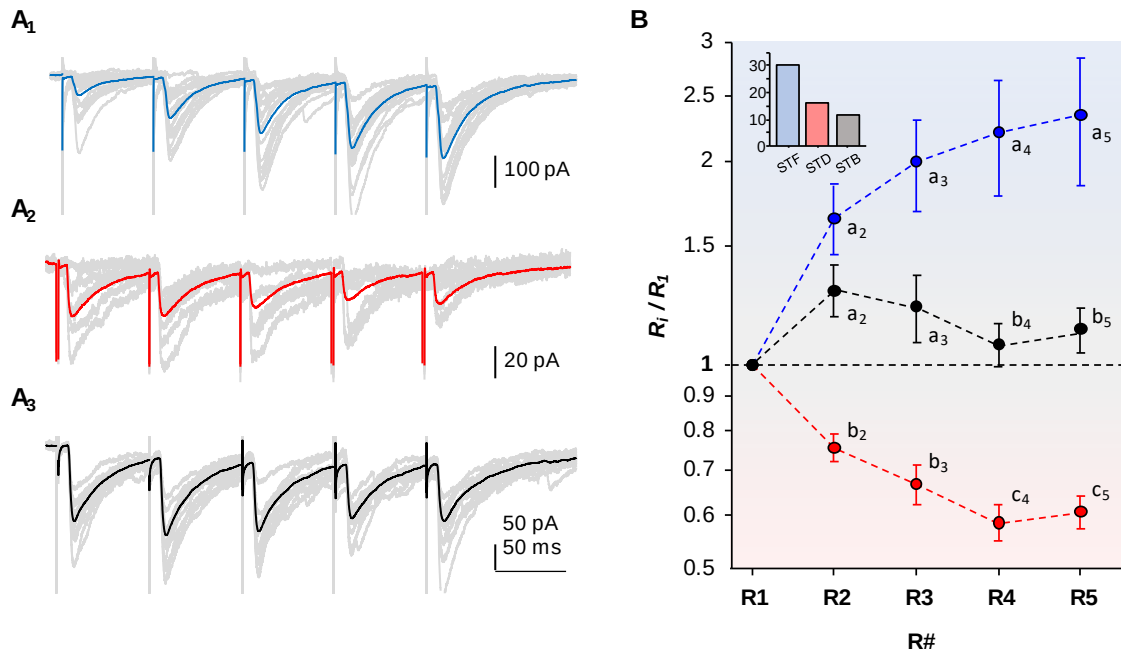
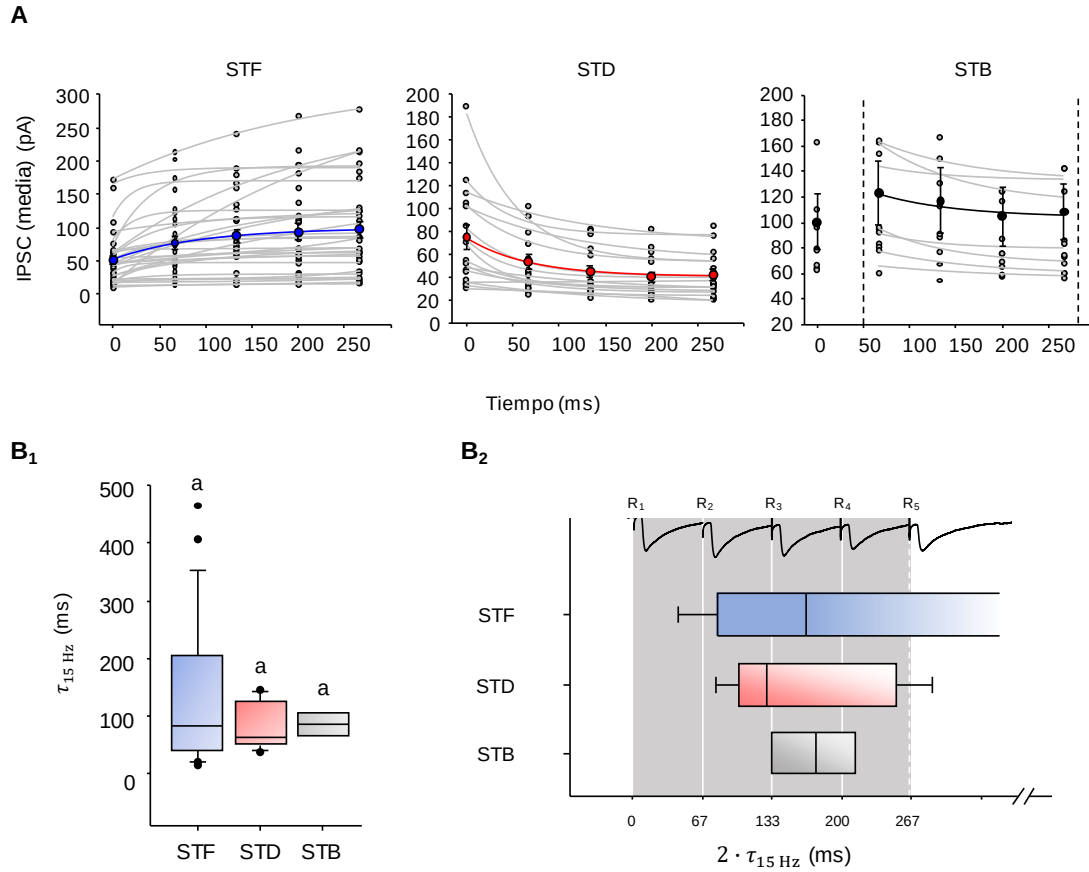


Fig. 9. Perfiles de plasticidad sináptica de corto plazo (STP) en los contactos GABAérgicos. (A). Trazados representativos de respuestas postsinápticas a trenes obtenidos en 3 neuronas del PnO, en las que el curso temporal de la eficacia sináptica de las aferentes GABAérgicas reclutadas por estimulación del LDT/PPT tuvo un perfil facilitador (**STF**, **A₁**), un perfil depresor (**STD**, **A₂**) y un perfil bifásico (**STB**, **A₃**). Se superpone en cada caso 20 trazados consecutivos (gris) y el trazado promedio con línea más gruesa (azul: **STF**; rojo: **STD**; negro: **STB**). **(B).** Perfiles de plasticidad de corto plazo (**STP_p**) de los contactos GABAérgicos. En el gráfico se representan los valores medios $\pm$ SEM de los *i*-ésimos IPSCs (R₁ a R₅) para cada grupo normalizados al valor medio del primer IPSC (R_i/R₁), en función del número de IPSC (R₁...R₅): **STF** (●), *N*=30; **STD** (●), *N*= 16; **STB** (●), *N*= 12. Las líneas entrecortadas que unen los puntos no representan ajustes, sino que se han trazado al solo efecto de facilitar la visualización de los perfiles; con igual objetivo se ha empleado una escala logarítmica en el eje de ordenadas. Las letras con igual subíndice (*i*= 2...5) indican la significación estadística de la comparación del R_i correspondiente (*Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks*; letras iguales: no significativo; letras distintas: *p*<0.05). En el inserto se muestra mediante un gráfico de barras la frecuencia absoluta de contactos (ordenadas) correspondientes a cada uno de los grupos.

En concordancia con los resultados expuestos, la cuantificación conjunta del **PPR_{66.7}** y el **STPR** permite una categorización no ambigua del **STP_P** de un contingente de aferentes en las condiciones de activación ensayadas en los grupos **STF**, **STD** y **STB**, tal como ponen de manifiesto la representación gráfica presentada en la **Fig. 8B** y el no solapamiento de los **STP_P** presentados en el gráfico de la **Fig. 9B**.

Se graficó para cada neurona la **eficacia sináptica** (R : amplitud media de cada i -ésimo IPSC provocado por el tren incluyendo fallos) en función del tiempo (i.e., $R = f(t)$), ajustándose una exponencial de la forma $y = Ae^{-t/\tau} + C$ en cada caso (**Fig. 10A**). La constante τ de esta exponencial puede definirse como la *constante de tiempo del curso temporal de la eficacia sináptica* en condiciones de activación repetitiva a 15 Hz ($\tau_{15 \text{ Hz}}$) para la población de aferentes reclutada ([Barroso-Flores et al., 2017, 2015](#)). Las $\tau_{15 \text{ Hz}}$ no mostraron diferencias entre los grupos STF, STD y STB (**Fig. 10B₁**). En todos los casos el coeficiente de regresión r^2 para el ajuste fue ≥ 0.821 ; la adecuación de este ajuste indica que para un tiempo t suficientemente prolongado ($t \gg \tau_{15 \text{ Hz}}$), la magnitud de la eficacia sináptica del contacto tenderá a alcanzar un estado estacionario de magnitud constante R_∞ (i.e., cuando $t \gg \tau_{15 \text{ Hz}}$, $R \rightarrow R_\infty$). La duración de los trenes de estimulación aplicados ($\sim 266.7 \text{ ms}$) fue superior a $2 \cdot \tau_{15 \text{ Hz}}$ para el 75% o más de los casos en los grupos **STB** y **STF**, y en más del 50% de los casos en el grupo **STD**, resultando entonces suficiente para que la magnitud de la eficacia sináptica alcanzada sea $\geq 85\%$ de R_∞ (**Fig. 10B₂**). Estos resultados indican que, en las condiciones experimentales ensayadas, **la magnitud de la eficacia sináptica de estos contactos tiende a alcanzar un estado estacionario**, a cuyo valor se aproximó la eficacia del último IPSC (R_5) provocado por el tren en la mayor parte de los ensayos llevados a cabo.

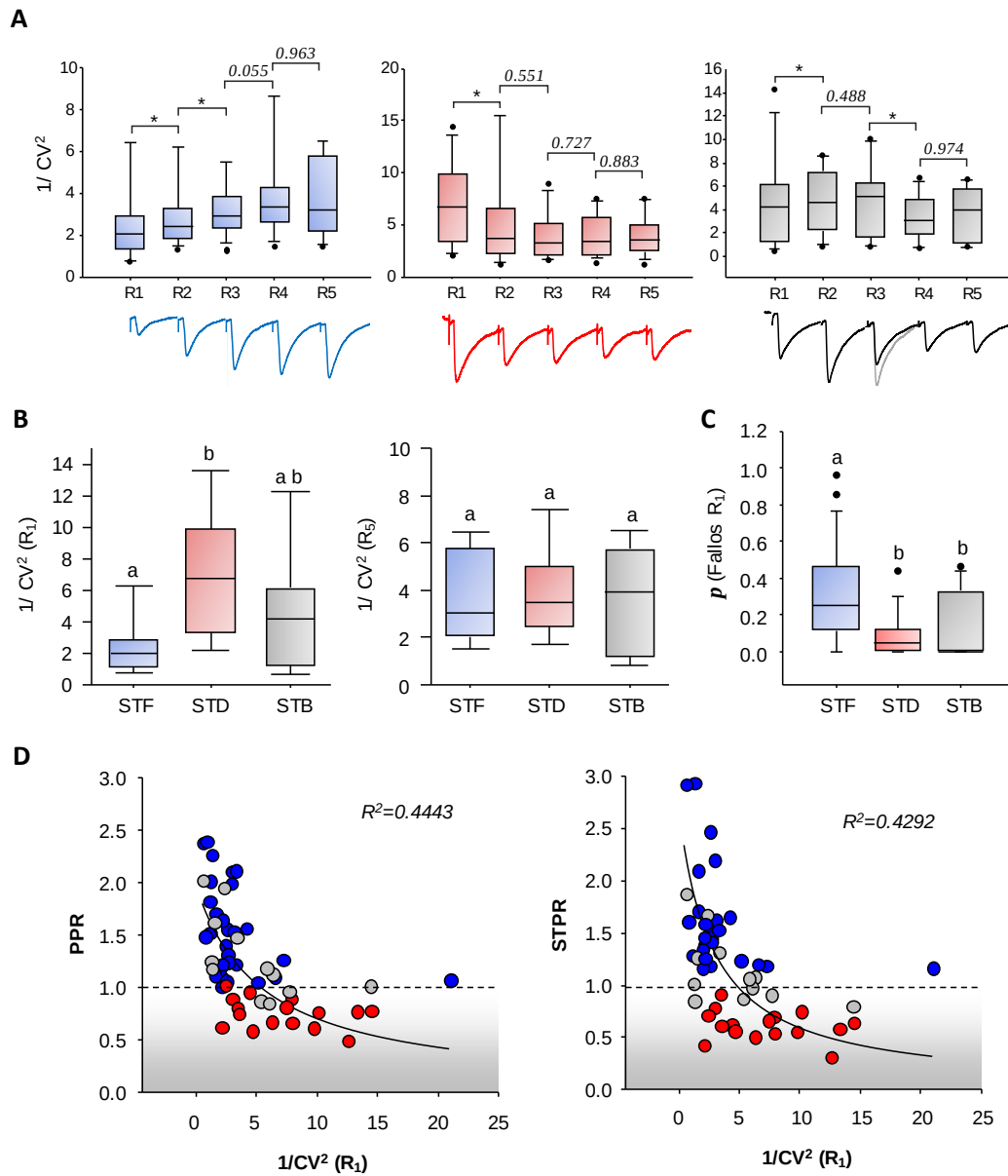
Fig. 10. Curso temporal de la eficacia sináptica de las aferentes GABAérgicas. (A). Gráficos de $R = f(t)$ para todas las neuronas registradas. Puesto que los intervalos interestímulo son de duración constante ($1/15 \text{ Hz} \times 1000 \text{ ms}$), el número de IPSC ($1 \dots 5$) pudo transformarse en el instante de ocurrencia del evento postsináptico (siendo $t = 0$ el instante de aplicación del primer estímulo), obteniendo la representación de R en función del tiempo, resultando $f(0) = R_1$, $f(66.67 \text{ ms}) = R_2 \dots f(266.67 \text{ ms}) = R_5$. En cada gráfico (STF, STD, y STB), los puntos alineados en un mismo instante ($\bullet$) corresponden a la amplitud media (incluyendo fallos) del i -ésimo IPSC ($R_{1 \dots 5}$) registrado en una neurona ($n = 20\text{-}60$ trazados consecutivos). Para los perfiles **STF** y **STD** se ajustó a los 5 puntos del gráfico una exponencial de la forma $y = Ae^{-t/\tau} + C$, mientras que para el perfil **STB** se ajustó una exponencial de igual forma a los puntos correspondientes a $R_2 \dots R_5$. Las líneas entrecortadas verticales en el gráfico del grupo con perfil STB indican el intervalo en el cual el ajuste exponencial fue realizado. Con fines ilustrativos, se representa en los mismos gráficos el valor medio *grupal* de cada R_i ($\bullet$ STF; $\bullet$ STD; $\bullet$ STB) $\pm$ SEM, y la curva de ajuste exponencial correspondiente. La constante de tiempo de estos tres ajustes promedio tuvo los siguientes valores: $99.66 \pm 7.90 \text{ ms}$ (STF), $67.24 \pm 9.24 \text{ ms}$ (STD) y $85.30 \pm 96.90 \text{ ms}$ (STB). **(B₁).** Gráficos de caja y línea de los valores de las $\tau_{15 \text{ Hz}}$ para los tres grupos, indicándose la no existencia de diferencias significativas (*Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks; letras iguales: no significativo, $p = 0.874$*). Los **valores medios** de la $\tau_{15 \text{ Hz}}$ ($\tau_{15 \text{ Hz}}^*$) correspondieron a $132.83 \pm 25.09 \text{ ms}$ (STF), $80.61 \pm 10.4 \text{ ms}$ (STD) y $87.91 \pm 10.2 \text{ ms}$ (STB)). **(B₂).** Gráficos de caja y línea en los que se muestran los valores de $2 \times \tau_{15 \text{ Hz}}$ para cada grupo, junto con los instantes de aplicación de los estímulos que provocan las respuestas postsinápticas $R_1 \dots R_5$, esquematizadas en la parte superior del gráfico. El área sombreada corresponde a la duración del tren, poniendo de manifiesto que la misma es superior a $2 \cdot \tau_{15 \text{ Hz}}$ para el 75% o más de los casos en los grupos STB y STF, y para más del 50 % de los contactos pertenecientes al grupo STF.



Los cambios en la eficacia sináptica de los grupos STF, STD y STB se acompañaron de cambios correlativos en la magnitud de $1/CV_R^2$ (de R1 a R5) (**Fig. 11A**). Puesto que este parámetro constituye un estimador indirecto del **estado funcional presináptico** (ver *Materiales y Métodos*), estos datos sugieren un **origen presináptico** de la STP ([Kraushaar and Jonas, 2000, 2000](#); [Pedroarena and Schwarz, 2003](#); [Silver, 2003](#)). Así, el grupo de aferentes con **STF** mostró un incremento significativo de $1/CV_R^2$ entre R1-R2 y entre R2-R3, mientras que este parámetro no se modificó más allá de R3 en los sucesivos pares de respuestas postsinápticas. Para el grupo de aferentes con **STD** se observó una progresión de $1/CV_R^2$ de carácter opuesto al anterior, evidenciándose una reducción significativa de este parámetro entre R1-R2 sin cambios que alcanzaran significación estadística entre los sucesivos pares más allá de R2. El grupo con perfil **STB** presentó un incremento significativo de $1/CV_R^2$ entre R1-R2, sin diferencias entre R2-R3; en la parte inferior del gráfico correspondiente se esquematiza un trazado de este perfil donde se señala que R3 mostró, tal como ha sido mencionado, niveles variables facilitación respecto de R2. El valor de $1/CV_R^2$ se redujo para este grupo entre R3-R4, sin mostrar diferencias entre R4-R5.

Los grupos **STF** y **STD** mostraron diferencias significativas en los valores de $1/CV_R^2$ para **R₁**, mientras que ninguno de los grupos presentó diferencias con el **STB** (**Fig. 11B**, izquierda). Asimismo, los grupos **STD** y **STB** no se diferenciaron por el valor de $p_f(R_1)$, mientras que ambos lo hicieron del grupo **STF** (**Fig. 11C**). En la **Fig. 11D** se representa adicionalmente los valores

del **PPR_{66.7}** (izquierda) y del **STPR** (derecha) en función de los valores de $1/CV_R^2$ para **R₁**. Los datos fueron adecuadamente ajustados por una *función hiperbólica* de la forma $y = (a/x) + b$, indicando la relación inversa entre los valores de estos parámetros y el de $1/CV_R^2$. Finalmente, no se halló significación estadística para las diferencias en los valores de $1/CV_R^2$ evaluados en **R₅** entre los grupos (**Fig. 11B**, derecha $p = 0.894$). Conjuntamente estos resultados sugieren que el **perfil de plasticidad** de un grupo de aferentes (particularmente la expresión de STF o STD) depende del valor inicial de $1/CV_R^2$ (estimador indirecto de $p_{r(t=0)}$), y que, asimismo, los tres **STP_p** alcanzan **estados presinápticos similares en condiciones estacionarias**.



<<

Fig. 11. Estimación de la función presináptica de las aferentes GABAérgicas y su evolución en el curso de la activación repetitiva. (A). Gráficos de caja y línea donde se representan los valores de $1/CV_R^2$ de los sucesivos R_i ($R_1 \dots R_5$) correspondientes a los grupos **STF** (izquierda), **STD** (centro) y **STB** (derecha). Debajo de cada gráfico se muestra un trazado promedio representativo del perfil de plasticidad de cada grupo. Para el grupo **STB** se superpone dos trazados a los efectos de ilustrar que R_3 presenta niveles variables de facilitación respecto de R_2 . En cada gráfico se indica la significación estadística (*paired t-test* *: $p < 0.05$) de la comparación entre los sucesivos pares de respuestas ($R_i; R_{i+1}$); para los pares entre los que no se evidenció una diferencia significativa se indica el valor de p sobre el gráfico. (B). Gráficos de caja y línea para los valores de $1/CV_R^2$ de R_1 (izquierda) y $1/CV_R^2$ de R_5 (derecha) en los grupos **STF**, **STD** y **STB**. (C). Probabilidades de fallos (p_f) en R_1 para los tres grupos. B y C: *Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks*; letras iguales: no significativo; letras distintas: $p < 0.05$. (D). Gráficos de los valores del **PPR**_{66.7} (izquierda) y del **STPR** (derecha) en función del valor de $1/CV_R^2$ de R_1 para las respuestas analizadas en $N=58$ neuronas. Los colores indican el perfil de plasticidad correspondiente a cada punto (● **STF**; ● **STD**; ● **STB**). Las curvas superimpresas corresponden al ajuste de una hipérbola $y = (a/x) + b$ (Debanne et al., 1996); se muestra en cada gráfico el valor correspondiente del coeficiente de correlación resultante. Obsérvese que los valores del **PPR**_{66.7} y del **STPR** se localizan por encima (**STF**) y por debajo (**STD**) de 1 en ambos gráficos. A los perfiles **STF** y **STD** correspondieron asimismo los valores más bajos y más altos, respectivamente, de $1/CV_R^2$, mientras que para el perfil **STB** la distribución es menos acotada.

4.3. MODULACIÓN NICOTÍNICA Y MUSCARÍNICA DE LOS FENÓMENOS PLÁSTICOS DE CORTO PLAZO EN AFERENTES GABAérgicas AL PnO

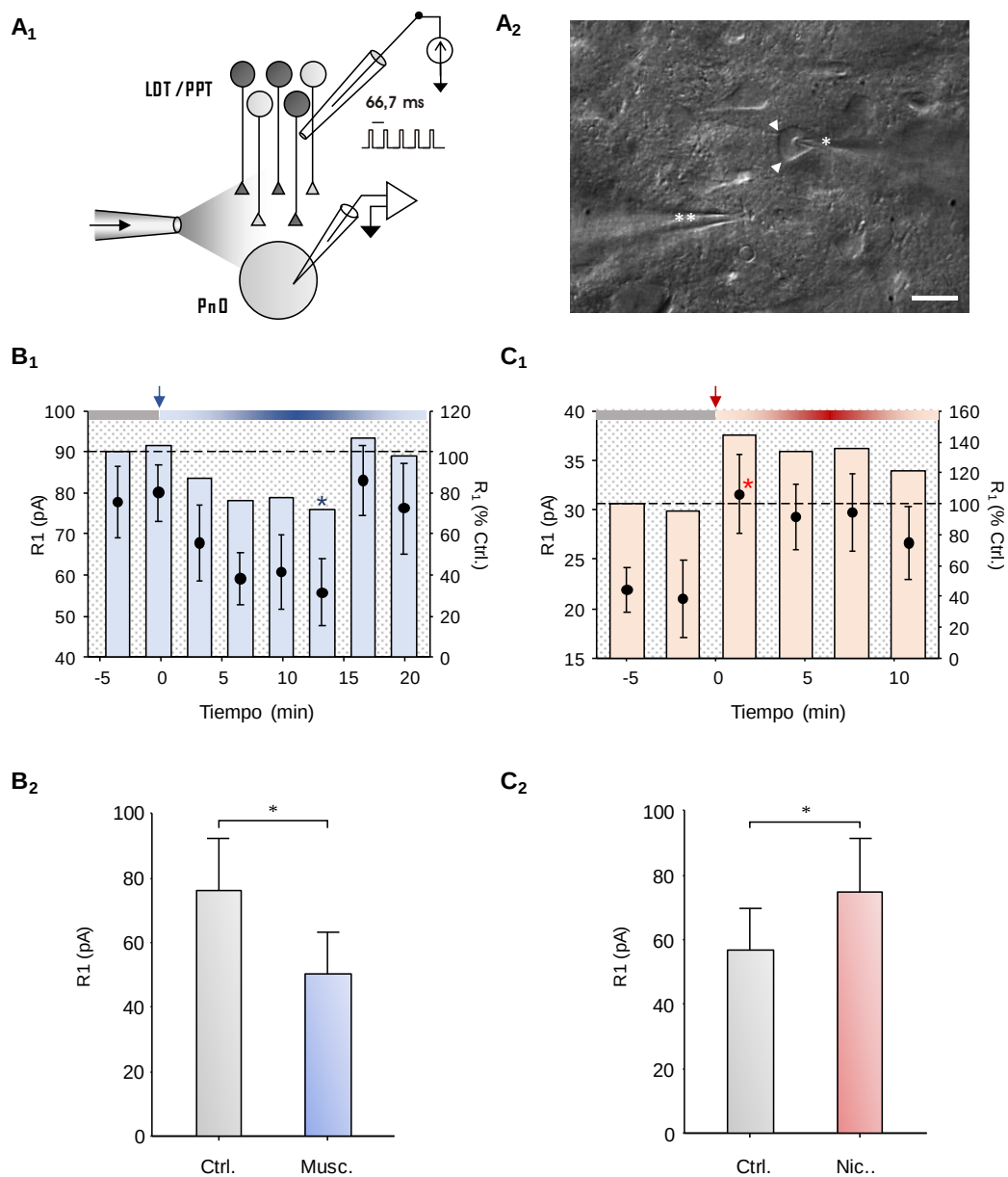
Se llevó a cabo dos series de experimentos empleando el diseño que se esquematiza en la **Fig. 12A**, registrando los IPSCs provocados por la estimulación del LDT/PPT (trenes de 5 estímulos a 15 Hz) en neuronas del PnO, **antes** y **luego** de la inyección local de los agonistas colinérgicos *nicotina* y *muscarina*. Se obtuvo entre 20 y 100 trazados en condiciones *control* (correspondientes a entre ~3.33 y ~10 min.). Los registros obtenidos tras la aplicación del agonista tuvieron una duración media de 17.03 ± 2.99 min.⁹ En una primera serie se procedió a la aplicación yuxtacelular (ver *Materiales y Métodos*) del agonista colinérgico *muscarina* (20 μ M; $N = 7$); en la segunda serie se aplicó *nicotina* (10 μ M; $N = 6$). Se evaluó en primer lugar las modificaciones en la magnitud de la *eficacia sináptica* del primer IPSC (R_1) provocadas por la aplicación de los agonistas. R_1 se cuantificó a intervalos de 3.33 minutos, sobre los promedios de 20 trazados consecutivos en los que fueron incluidos los fallos. Los efectos del agonista aplicado sobre los índices **PPR**_{66.7}, **STPR**, o los parámetros $1/CV^2$ y Q_{inh} (ver más adelante) fueron evaluados en el período correspondiente al cambio máximo de R_1 .

En la **Fig. 12B₁** se representa gráficamente la magnitud de R_1 (pA) en función del tiempo (min.) para un experimento en el que se aplicó *muscarina*, evidenciándose una *reducción* de dicha

⁹ Los 13 experimentos incluidos en esta sección son exclusivamente aquellos en los que no se constató modificaciones de la R_s ($\geq 20\%$) u otros elementos indicativos del deterioro de las condiciones de registro, tales como modificaciones de la corriente inyectada (I_{hold}) para el mantenimiento de un $V_m = -70$ mV.

variable tras la inyección del agonista. En todos los experimentos de la serie *muscarina* provocó una reducción de R_1 (35.5 ± 9.5 %; $N=6$) que alcanzó significación estadística ($p<0.05$; Fig. 12B₂). El efecto máximo tuvo lugar a los 7.54 ± 1.59 minutos tras la aplicación del agonista.

La aplicación de *nicotina* provocó los efectos que se muestran en la Fig. 12C. En todos los casos se produjo un incremento de R_1 (32.3 ± 5.9 %, $N = 6$) que alcanzó significación estadística ($p<0.05$; Fig. 12C₂). El efecto máximo de *nicotina* se alcanzó a los 2.75 ± 0.84 min. de realizada la inyección. Los efectos de ambos agonistas sobre R_1 fueron reversibles (ver Figs. 12B₁ y C₁); el valor inicial de R_1 se recuperó en períodos variables que no superaron los ~15 min.



<<

Fig. 12. Efecto depresor (muscarínico) y facilitador (nicotínico), evidenciados como modificaciones de la eficacia sináptica de R_1 . (A₁). Esquema que representa el diseño experimental empleado para la estimulación del LDT/PPT y el registro de IPSCs en neuronas del PnO. Se esquematiza el tren de pulsos aplicado indicando el IIE. En el LDT/PPT se esquematizan neuronas GABAérgicas (gris oscuro) y no GABAérgicas (gris claro). Los IPSCs GABAérgicos fueron aislados farmacológicamente (KYN 5 mM). Se representa la pipeta para microinyección de agonistas por presión (flecha). (A₂). Imagen 40X (DIC-IR) donde se muestra una neurona del PnO en la que puede advertirse dos prolongaciones (puntas de flecha), indicándose la posición de la pipeta de registro (*) y la de inyección (**). Cal.: 25 μ m. (B₁). Amplitud de R_1 (media $\pm$ SEM, eje de la izquierda) en función del tiempo; el gráfico de barras sobreimpreso (eje de la derecha) representa los valores de R_1 como porcentajes del primer punto (la línea entrecortada horizontal indica el 100%). Cada valor se obtuvo promediando 20 trazados. La flecha vertical ($t = 0$) indica el instante de aplicación de *muscarina* 10 μ M (700 ms, 20 psi). El asterisco señala el efecto máximo sobre R_1 . La línea entrecortada horizontal señala la amplitud media de R_1 en condiciones *control*. (B₂) Gráfico que muestra los valores medios de R_1 antes (Ctrl.) y durante el efecto máximo de *muscarina* (Musc.; *paired t-test*, $N=7$). (C_{1, 2}). Mismas representaciones que en B_{1,2} (respectivamente) pero para la aplicación de *nicotina* 20 μ M (300 ms, 10 psi). *Paired t-test*, $N=6$.

En todos los experimentos realizados, los efectos muscarínico y nicotínico sobre R_1 asociaron modificaciones del $PPR_{66.7}$. *Muscarina* provocó un **incremento del $PPR_{66.7}$** del $25.86 \pm 4.5 \%$. Los valores del $PPR_{66.7}$ durante el efecto máximo del agonista (1.30 ± 0.17) fueron significativamente mayores que los valores de este índice en condiciones control (1.02 ± 0.11 , Fig. 13A₂). *Nicotina* provocó por el contrario una **reducción del $PPR_{66.7}$** ($35.12 \pm 7.27 \%$). Los valores del $PPR_{66.7}$ durante el efecto máximo del agonista (0.93 ± 0.09) fueron significativamente menores que los valores de este índice en condiciones control (1.50 ± 0.18 ; Fig. 13B₂). De acuerdo con estos resultados, *muscarina* y *nicotina* provocaron modificaciones de la **eficacia sináptica (R_1)** que, por asociarse a cambios consecuentes del $PPR_{66.7}$, poseen un origen **presináptico**: mientras *muscarina* produjo una *depresión presináptica*, *nicotina* provocó una *facilitación presináptica*.

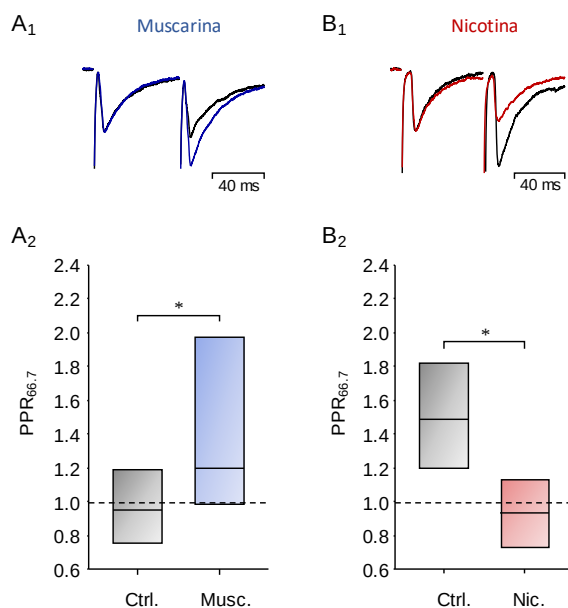


Fig. 13. Modificaciones del $PPR_{66.7}$ durante los efectos máximos nicotínico y muscarínico. Promedios de $n=20$ trazados mostrando el primer par de respuestas postsinápticas (R_1 - R_2) a la estimulación de aferentes GABAérgicas obtenidos en condiciones control (gris) y durante el efecto máximo de *muscarina* (A₁, trazado en azul) y *nicotina* (B₁, trazado en rojo) en experimentos representativos de cada serie. Los trazados se presentan normalizados a la amplitud media del valor de R_1 en condiciones *control*, poniendo de manifiesto las modificaciones del PPR inducidas por los agonistas. (A₂). Gráficos de caja y línea donde se representan los valores del $PPR_{66.7}$ en condiciones control (Ctrl.) y durante el efecto máximo de *muscarina* (Musc.) *Wilcoxon Signed Rank Test*; $N=7$. (B₂). Mismos gráficos que en (A₂), pero para experimentos en los que se aplicó *nicotina*. *Wilcoxon Signed Rank Test*, $N=6$.

Seguidamente nos preguntamos si la *modulación de la eficacia sináptica* provocada por *muscarina* y *nicotina* era capaz de modificar de manera específica el **perfil de plasticidad sináptica de corto plazo** de los contactos GABAérgicos. En la **Fig. 14A₁** se representa el **STP_P** control y durante el efecto máximo de *muscarina* en tres experimentos representativos. Los casos corresponden a *perfiles control* de tipo **STF**, **STB** y **STD**. Siguiendo el mismo esquema, en la **Fig. 14A₂** se presentan tres **STP_P** control y los correspondientes al efecto máximo de *nicotina* en tres experimentos seleccionados. Los ejemplos presentados sugieren que los agonistas colinérgicos ensayados modifican de modo específico el **STP_P**.

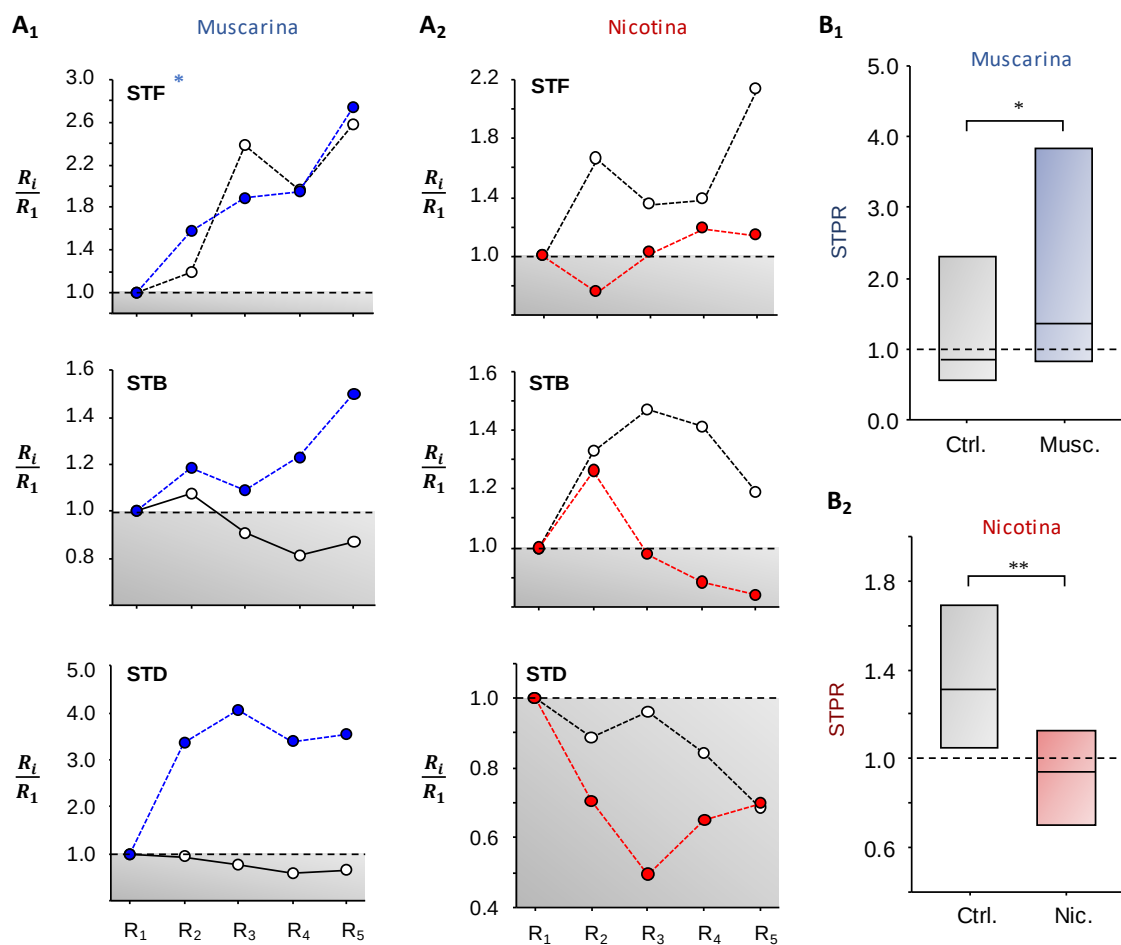


Fig. 14. Modulación muscarínica y nicotínica del perfil de plasticidad sináptica de las aferentes GABAérgicas. (A₁, A₂). En los gráficos se representan los **STP_P** (R_i/R_1 en función del número de evento post-sináptico, $R_1 \dots R_5$) en condiciones control (○) y durante los efectos máximos de *muscarina* (●, A₁) y *nicotina* (●, A₂). Para ambas series experimentales se han seleccionado ejemplos en los que las respuestas en condiciones control mostraron perfiles de tipo **STF** (arriba), **STB** (centro) y **STD** (abajo). (B₁). Gráficos de caja y línea donde se representan los valores del **STPR** en condiciones control (Ctrl.) y durante el efecto máximo de *muscarina* (Musc.) (Wilcoxon Signed Rank Test, N=7). (B₂). Misma representación que en B₁, pero para la aplicación de *nicotina* (Nic.); Wilcoxon Signed Rank Test, N=7.

Se analizó posteriormente las modificaciones del índice **STPR** provocadas por ambos agonistas, a los efectos de obtener una descripción de carácter *cuantitativo* de las modificaciones del perfil de plasticidad de los contactos. La aplicación de muscarina provocó un **incremento significativo del STPR**, desde un valor medio de 1.33 ± 0.39 (*control*) a 2.12 ± 0.57 durante el *efecto máximo* del agonista (**Fig. 14A₂**, $N=7$). La aplicación de *nicotina* estuvo por su parte asociada a una **disminución significativa del STPR** en los 6 experimentos realizados (**Fig. 14B₂**; *control*: 1.35 ± 0.16 ; *efecto máximo*: 0.92 ± 0.09).

En las **Figs. 15A y B** se muestra un resumen de los efectos *muscarínico* y *nicotínico* sobre los índices **PPR_{66.7}** y **STPR**, mediante una representación análoga a la introducida previamente en la **Fig. 8B**. Los resultados presentados en esta sección y resumidos en la figura referida ponen de manifiesto que:

1. *Muscarina* y *nicotina* provocaron modificaciones específicas y de carácter opuesto en el perfil de plasticidad sináptica de las aferentes GABAérgicas (caracterizado por los índices **PPR_{66.7}** y **STPR**).

2. Mientras que muscarina produjo un efecto modulador tendiente a la facilitación en el curso de la activación presináptica repetitiva a 15 Hz (i.e., *facilitación por frecuencia*), nicotina tuvo un efecto tendiente a la *depresión por frecuencia* en estas condiciones.

3. Puesto que tanto en los experimentos en los que se aplicó *muscarina* como en aquellos en los que se aplicó *nicotina* las coordenadas (**PPR_{66.7}**; **STPR**) en condiciones control se ubicaron en diversos cuadrantes del plano (compárese con el diagrama de la **Fig. 8B**), los efectos moduladores de estos agonistas parecen no depender del **STPR** preexistente en los contactos analizados.

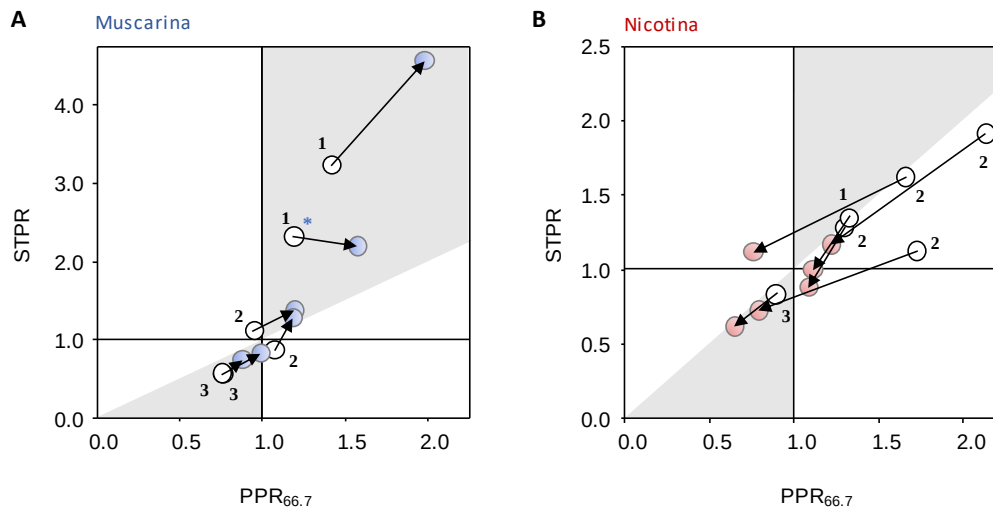


Fig. 15. (A). Diagrama en el que se representa los perfiles de plasticidad en un plano cartesiano de ejes $x = \text{PPR}$, $y = \text{STPR}$. Cada experimento se representa por dos puntos en el plano cartesiano de ejes $x = \text{PPR}$, $y = \text{STPR}$, correspondiendo a cada uno un punto inicial, definido por los valores del PPR y el STPR en condiciones control (PPR_{Ctrl} ; $\text{STPR}_{\text{Ctrl}}$, ●) y un punto final, definido por los valores de estos índices durante el efecto máximo de *muscarina* ($\text{PPR}_{\text{Emáx}}$; $\text{STPR}_{\text{Emáx}}$, ●). La correspondencia entre los valores inicial y final

en cada experimento se ilustra mediante vectores sobreimpresos. Se indica con un asterisco (*) una neurona en la que tuvo lugar una ligera reducción del STPR durante el efecto máximo muscarínico, y que corresponde al primer ejemplo de la **Fig. 14A₁**. Los números indican perfiles STF (1), STB (2) y STD (3). Se ha omitido un experimento en el que el incremento del PPR fue de un 306 % y el del STPR de un 466 %, a los efectos de facilitar la visualización de la representación gráfica. **(B)**. Mismo diagrama que en **A**, pero mostrando los efectos de *nicotina* (●).

Los resultados precedentemente expuestos no permiten inferir sin embargo los efectos muscarínico y nicotínico *netos* sobre la *magnitud de la inhibición GABAérgica*, resultantes de la reducción de **R₁** asociada a **STF** (provocada por *muscarina*) o del incremento de **R₁** asociado a **STD** (provocado por *nicotina*). A los efectos de avanzar en la dilucidación de esta interrogante, se cuantificó la **carga inhibitoria** transferida (***Q_{inh}***) a las neuronas del PnO durante la activación presináptica repetitiva de las aferentes GABAérgicas, antes (*control*) y durante el *efecto máximo* de los agonistas colinérgicos ensayados en cada serie experimental. La cuantificación de este parámetro constituye una forma de estimar la **magnitud total de la inhibición postsináptica provocada por el tren de respuestas postsinápticas** (Lu and Trussell, 2000; Nusser et al., 2001; Rosenmund and Stevens, 1996). -23.657 28.237 10.673

Muscarina provocó una reducción significativa ($23.66 \pm 10.7 \%$, $p < 0.05$) del área total bajo el trazado $I_m = f(t)$ (**Fig. 16**, izquierda). En 1 de los 7 experimentos se verificó un ligero incremento ($< 10 \%$) de dicha magnitud. Estos resultados ponen de manifiesto que el efecto *neto* de *muscarina* es el de una *reducción* en la *magnitud de la inhibición postsináptica* de tales contactos en las condiciones de actividad presináptica ensayadas. *Nicotina* provocó una reducción de un $13.74 \pm 3.9 \%$ de la ***Q_{inh}***, (**Fig. 16**, derecha). La reducción de la ***Q_{inh}*** provocada por *nicotina* concuerda con el efecto promotor de *depresión por frecuencia* (i.e., la reducción gradual de la eficacia de la transmisión GABAérgica) de este agonista.

Estos resultados sugieren finalmente que, en condiciones de activación presináptica repetitiva a 15 Hz, **ambos agonistas** promueven una **disminución en la magnitud de la inhibición postsináptica**, i.e., de la ***Q_{inh}***, aun cuando tales agonistas exhiban efectos de carácter *antagónico* sobre el **STP_P** de las aferentes GABAérgicas. La confirmación de esta proposición requiere de experimentos adicionales, tal como será referido en la sección de *Conclusiones y Perspectivas*.

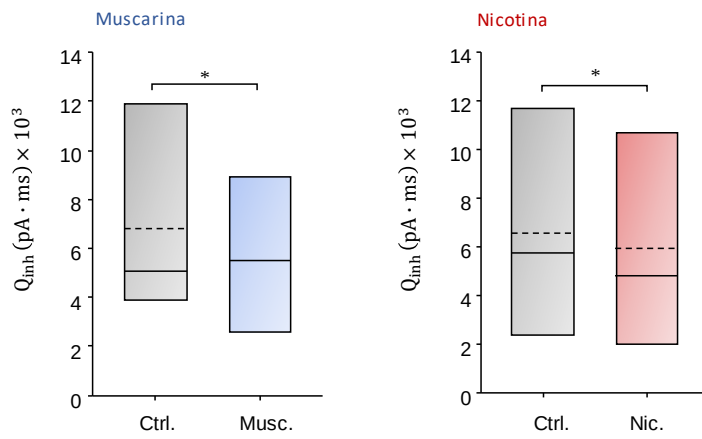


Fig. 16. Reducciones de la Q_{inh} provocadas por la aplicación de muscarina y nicotina. Los gráficos de barras muestran los valores medios de las áreas bajo los trazados de corriente o Q_{inh} (pA.ms) en condiciones control (Ctrl.) y durante el efecto máximo de *muscarina* (Musc. N = 7) y *nicotina* (Nic., N = 6). *Wilcoxon Signed Rank Test*.

5. DISCUSIÓN

La transmisión sináptica constituye un proceso dinámico, cuya eficacia se halla sujeta a cambios *plásticos* dependientes de la *actividad presináptica*. Las formas de *plasticidad de corto plazo* correspondientes a la STF y a la STD desempeñan un importante papel en el control de la *transmisión* y el *procesamiento de la información neural* (Markram et al., 1998; Tsodyks et al., 1998; Zucker and Regehr, 2002). La *capacidad operativa de un circuito neural* se incrementa significativamente como consecuencia de la *modulación* de los *mecanismos subcelulares* que subyacen a la STP. Esta clase de *modulación* (que incluye a la *modulación heterosináptica*) es considerada una forma de *metaplasticidad*¹⁰ (Zhao et al., 2011) capaz de *controlar las propiedades plásticas intrínsecas* de un contacto sináptico (Fischer et al., 1997; Baimoukhametova et al., 2004; Sakurai and Katz, 2009; Zhao et al., 2011).

En el PnO, núcleo del sector rostral de la PRF implicado en la ejecución de los componentes fundamentales del S-REM, tiene lugar una *compleja interacción entre los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y colinérgico* (Maloney et al., 1999; Marks et al., 2008; Pollock and Mistleberger, 2003; Sanford et al., 2003; Xi et al., 2001, 1999). Se evaluó *in vitro* las modificaciones de la *eficacia sináptica resultantes de la activación presináptica repetitiva* de aferentes GABAérgicas a neuronas del PnO empleando patrones *fisiológicos* de estimulación del LDT/PPT (15 Hz, Boucetta et al., 2014), y su *modulación por agentes colinomiméticos*. Mediante la aplicación local en el PnO de los agonistas *muscarina* (10 μ M) y *nicotina* (20 μ M), se procedió a una *reevaluación de los efectos moduladores colinérgicos sobre la eficacia sináptica* de dichas entradas GABAérgicas, activadas repetitivamente a frecuencias de 15 Hz. Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que:

(I). Las *sinapsis GABAérgicas* entre aferentes activadas por la estimulación del LDT/PPT y neuronas del PnO, exhiben diferentes *perfiles de plasticidad sináptica de corto plazo* (STP_p): 52% de los casos presentó *facilitación por frecuencia* (STF); 28 % presentó *depresión por frecuencia* (STD); en el restante 20 % de los casos analizados la *eficacia sináptica* presentó una evolución de carácter más complejo, con elementos *sugestivos* de una combinación de *mecanismos facilitadores y depresores* (ver más adelante), categorizándose esta forma de plasticidad como *bifásica* (STB).

¹⁰ El término *metaplasticidad*, (introducido por Abraham y Bear [1996]), refiere en su concepción original a la *modificación de la capacidad de un contacto sináptico para la inducción o expresión de fenómenos plásticos tales como la LTP (por "long-term-potentiation") o la LTD (por "long-term-depression")*, como resultado de la *actividad neuronal o sináptica previa*. En sentido más general el término se emplea para hacer referencia a lo que Abraham y Bear definieron como "*plasticidad de la plasticidad [sináptica]*"; la metaplasticidad corresponde así a un *orden superior de plasticidad*, capaz de modificar los procesos intrínsecos de *inducción y/o expresión* de un fenómeno plástico en un contacto sináptico.

(II). En las condiciones de activación presináptica ensayadas, la aplicación local en el PnO de los agonistas colinérgicos *muscarina* y *nicotina*, es capaz de promover modificaciones características del STP_P de los contactos GABAérgicos. El efecto *muscarínico* consistió en una reducción de la eficacia de la primera respuesta al tren de estímulos, con el aumento concomitante de los índices PPR_{66.7} y STPR. El efecto *nicotínico*, por el contrario, consistió en un incremento de la eficacia sináptica de la primera respuesta, asociada a la reducción de los índices PPR_{66.7} y STPR. Estos efectos fueron *independientes* del STP_P inicial de los contactos.

(III). Independientemente asimismo del STP_P inicial de los contactos, ambos agonistas provocaron una *reducción de la magnitud de la inhibición postsináptica GABAérgica (Q_{inh})* durante la activación repetitiva de las aferentes con patrones fisiológicos de estimulación.

(IV). Los datos presentados indican asimismo que tanto el fenómeno plástico resultante de la activación presináptica repetitiva de las aferentes GABAérgicas (STP) como su modulación heterosináptica mediada por la activación de nAChRs y mAChRs, dependen de *mecanismos presinápticos*.

Conjuntamente, los resultados aportados por el presente trabajo concuerdan con la existencia de fenómenos *metaplásticos* sobre la STP de sinapsis GABAérgicas en el PnO, y resultantes de mecanismos *moduladores colinérgicos dependientes de la activación de receptores nicotínicos y muscarínicos presinápticos*.

5.1. LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS IPSCs REGISTRADOS CONCUERDAN CON LA ACTIVACIÓN DE UNA POBLACIÓN RELATIVAMENTE HOMOGÉNEA DE AFERENTES GABAérgicas.

En la *Introducción* se hizo referencia a trabajos en los que se pone de manifiesto la existencia de efectos moduladores colinérgicos sobre entradas glutamatérgicas y GABAérgicas en diversas regiones de la PRF ([Heister et. al. 2009](#); [Weng et. al. 2014](#)). Tal como ha sido anteriormente mencionado, el *origen de las aferentes GABAérgicas o glutamatérgicas* implicadas no fue determinado en estos trabajos. En el presente estudio, la población de entradas GABAérgicas analizada se restringió a la de aquellas originadas presumiblemente en el LDT/PPT¹¹ (sitio donde se localizó el electrodo de estimulación), obteniéndose el registro de las respuestas postsinápticas exclusivamente en neuronas pertenecientes a un área circunscripta de la rPRF, correspondiente al PnO ipsilateral al sitio de estimulación seleccionado. Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas registradas en esta región (**Fig. 5**) guardan razonable similitud con las previamente

¹¹ Para evidencias adicionales de la existencia de proyecciones monosinápticas directas del LDT/PPT al PnO ver [Kunizawa, 2016](#); [Pino, E et al., 2017](#)

identificadas en dicha región por nuestro grupo (ver por ejemplo [Pino, et al., 2017](#)) y reportadas asimismo por otros autores. Estas características fenotípicas incluyen la presencia de *espiga de bajo umbral* (LTS), así como la presencia de respuestas del V_m a pulsos inyectados de corriente (I_m) compatibles con la activación de las corrientes de K^+ de tipo I_A y la *corriente catiónica activada por hiperpolarización* (I_h) ([Gerber et al., 1989](#); [Ito et al., 2002](#); [Núñez et al., 2002, 1997](#))¹².

Los IPSCs GABAérgicos registrados en estas neuronas presentaron características identitarias similares a las previamente consignadas por nuestro grupo (ver **Tabla 1**); específicamente, las τ_{off} de estos IPSCs no presentaron diferencias entre grupos *funcionalmente distinguibles* según los valores adoptados por el **PPR_{66.7}** (**Fig. 7**, ver además siguiente sección). Las latencias al pie de los IPSCs (7.63 ± 0.31 ms) mostraron una variabilidad relativamente baja (ver *Material Suplementario*, **Fig. S1**), dato indicativo de que las aferentes GABAérgicas activadas por estimulación del LDT/PPT establecen contactos *monosinápticos* con las neuronas del PnO ([Doyle and Andresen, 2001](#); [McDougall et al., 2008](#); ver asimismo criterios explicitados en *Materiales y Métodos*). La reducida variabilidad de las latencias, así como la ausencia de eventos postsinápticos *múltiples* en respuesta a los estímulos aplicados (ver por ejemplo **Fig. 9**) se hallan además en línea con la *activación sincrónica* de aferentes GABAérgicas, que exhiben *velocidades de conducción* de magnitud comparable (estimada en 0.17 m/s, ver [Kunizawa, 2016](#)).

En conjunto, los datos reseñados concuerdan con la proposición de que en las condiciones ensayadas tiene lugar el reclutamiento de un conjunto *relativamente homogéneo e identificable* de aferentes GABAérgicas, originadas en una única población neuronal localizada en el LDT/PPT. Cabe no obstante señalar que los IPSCs registrados en las neuronas del PnO corresponden a eventos postsinápticos *compuestos* ([Jonas et al., 1998](#); [Kasyanov et al., 2000](#)), resultantes de la activación de una *población* de contactos GABAérgicos como consecuencia de la estimulación eléctrica del LDT/PPT. El *número* y *origen* preciso de las *aferentes* GABAérgicas activadas, el *número* y la *distribución espacial* ([Armstrong and Gilly, 1992](#); [Poleg-Polsky and Diamond, 2011](#); [Richter et al., 1996](#)) de las *terminales* GABAérgicas sobre el elemento postsináptico (localización *perisomática o dendrítica distal* [[Freund and Katona, 2007](#)]), así como el *número de sitios de liberación/zonas activas por terminal* ([Branco and Staras, 2009](#)), no han sido específicamente determinados; la *heterogeneidad* de los caracteres *morfológicos* de las entradas sinápticas podría no obstante asociarse a diferencias significativas en las características *funcionales* de las respuestas postsinápticas compuestas ([Cox et al., 1997](#)). Los elementos previamente consignados así como la eventual *no uniformidad* de los parámetros *cuantales* de las terminales presinápticas que componen a la población reclutada en cada ensayo (*modelo binomial compuesto*) restringen la interpretación de los resultados ([Clements, 2003](#); [Dobrunz and Stevens, 1997](#); [Silver,](#)

¹² Las neuronas del sector de la PRF implicado en la ejecución de los signos cardinales del S-REM han sido clasificadas por estos autores en dos categorías (Tipo I y Tipo II) de acuerdo con la presencia (Tipo II) o ausencia (Tipo I) de rectificación mediada por la corriente I_h .

2003; Walmsley et al., 1988). En virtud del carácter *compuesto* de los IPSCs analizados, la descripción *cuantitativa* de la *eficacia sináptica* a través del valor medio del *i-ésimo* IPSC (incluyendo fallos), los índices $PPR_{66.7}$ y STPR, la *probabilidad de fallos* o la cuantificación de $1/CV^2$, así como la definición de un “*estado funcional*” de las aferentes considerada a continuación, se restringe al comportamiento *promedio* de una *población de contactos* (Debanne et al., 1996; Dobrunz and Stevens, 1997).

5.2. LAS AFERENTES GABAérgicas ACTIVADAS PRESENTAN AL MENOS DOS ESTADOS FUNCIONALES.

La **PPF** y la **PPD** se asocian a una baja o alta p_r , respectivamente (Bekkers and Stevens, 1990; Dobrunz and Stevens, 1997; Hess et al., 1987; Schulz et al., 1994; Stevens and Wang, 1995; Zucker, 1989, 1973). El $PPR_{66.7}$ de las respuestas GABAérgicas registradas fue mayor a 1 en un 69 % de los casos (**PPF**); en el 31 % restante se verificó **PPD** (**Fig. 6**). Estos resultados sugieren la existencia de dos *estados funcionales* de las aferentes GABAérgicas, i.e., un estado de elevada p_r (**PPD**) y uno de reducida p_r (**PPF**). Las diferencias en la p_{f1} y en los valores de $1/CV^2$ del primer IPSC entre ambos grupos (**Fig. 6**) apoyan asimismo esta hipótesis (Debanne et al., 1996; Faber and Korn, 1991; Malinow and Tsien, 1990).

Mientras que el $PPR_{66.7}$ permitió definir *dos grupos funcionales* (i.e., **PPD** y **PPF**), el análisis de la *eficacia sináptica* de las respuestas provocadas por la estimulación del LDT/PPT con trenes de 5 pulsos a 15 Hz reveló la existencia de tres clases de *fenómenos plásticos de corto plazo* en los contactos GABAérgicos (**Figs. 8 y 9**). Estos consisten en la *facilitación por frecuencia* (**STF**, donde $STPR > PPR_{66.7} > 1$), la *depresión por frecuencia* (**STD**, donde $STPR < PPR_{66.7} < 1$), así como un **STP_p** de carácter más complejo, con elementos que *sugieren* una combinación de mecanismos facilitadores y depresores, referido como perfil *bifásico* (**STB**, verificándose en general $STPR < PPR_{66.7} > 1$).

Diversos modelos explican los fenómenos de **STF** y **STD** en términos de los cambios dinámicos de la probabilidad de liberación (p_r), la fracción disponible de sitios activos ($\dot{n}/\dot{n}_T$, siendo $\dot{n}$ el número de sitios disponibles) o la disponibilidad de vesículas pertenecientes al **RRP** (ver para revisión Fioravante and Regehr, 2011); la compensación mutua entre los procesos dinámicos de facilitación y depresión dependientes de frecuencia, determina que durante la activación presináptica repetitiva, la eficacia del contacto alcance un valor estable o de estado estacionario (Turecek et al., 2016). Las modificaciones correlativas de $1/CV_R^2$ y R_i evidenciadas en el curso de la activación presináptica de las aferentes GABAérgicas en este trabajo (**Fig. 11A**) son compatibles con la participación de mecanismos presinápticos (e.g., la modificación gradual de la p_r durante la actividad repetitiva) en la expresión de **STF**, **STD** o **STB** en las aferentes

GABAérgicas estudiadas. Asimismo, tal como se muestra en la **Fig. 10**, la eficacia sináptica en los tres grupos de aferentes (STF, STD y STB) alcanzó un estado estacionario en las condiciones de activación ensayadas, resultado compatible con la hipótesis de la *compensación mutua* entre procesos de facilitación y depresión, previamente señalada.

Modelos de **STP** tales como los referidos en el párrafo anterior proponen la existencia de una *relación causal* entre la expresión de **STF** o **STD** y el *estado presináptico inicial* de los contactos sinápticos (ver por ejemplo [Dittman et al. 2000](#); [Jackman and Regehr, 2017](#); [Turecek et al., 2016](#)). La *facilitación por frecuencia* ocurre en contactos con una baja p_r inicial ($p_{r(t=0)} \ll 1$), mientras que contactos sinápticos con una elevada $p_{r(t=0)}$ exhiben característicamente **STD**. Los grupos **STF** y **STD** de aferentes GABAérgicas presentaron diferencias significativas en los valores de $1/CV^2$ para R_1 (estimador indirecto de la $p_{r(t=0)}$) y del $PPR_{66.7}$, concordantes con estos modelos ([Debanne et al., 1996](#); [Faber and Korn, 1991](#); [Malinow and Tsien, 1990](#)). El grupo **STB**, en cambio, no mostró diferencias con los demás en cuanto al valor de $1/CV^2$ para R_1 , presentando valores de un rango intermedio entre los correspondientes a los grupos **STF** y **STB**, y un $PPR_{66.7}$ con valores que se diferenciaron del grupo **STD**, pero no del **STF**. Adicionalmente, los grupos **STD** y **STB** no se diferenciaron por la probabilidad de fallos de R_1 , mientras que ambos lo hicieron del grupo **STF**, en el que se presentaron los valores más elevados para este parámetro (**Fig. 11B y C**). Por último, en la figura **Fig. 11D** se pone de manifiesto que la magnitud de los índices $PPR_{66.7}$ y $STPR$ (parámetros que definen el STP_p , ver **Fig. 8B**) varía inversamente con el valor inicial de $1/CV_R^2$. Estos resultados concuerdan con la existencia de un *estado funcional presináptico de baja eficacia inicial* (i.e., de baja $p_{r(t=0)}$), y del que resulta la expresión de **STF**, y un estado de *elevada eficacia inicial* (i.e., de elevada $p_{r(t=0)}$), del que resulta la expresión de **STD**; la **STB** podría ser consecuencia de la existencia de un estado de *eficacia inicial de magnitud intermedia*, en el que característicamente ocurre una **PPF** inicial.

La *coexistencia* de mecanismos facilitadores y depresores en contactos GABAérgicos *unitarios* ha sido evidenciada por otros autores (ver por ejemplo [Pedroarena and Schwarz, 2003](#)); ello está en línea con la proposición de que, en las condiciones experimentales ensayadas, la estimulación del LDT/PPT activa una *población única de aferentes GABAérgicas* (i.e., a una población *homogénea* en cuanto a sus características estructurales y origen, ver sección anterior), la que puede presentar sin embargo diferentes *estados funcionales* y, consecuentemente, expresar diversos perfiles de **STP**. Particularmente, en el curso de la activación a 15 Hz, la *coexistencia* de mecanismos facilitadores y depresores podría resultar en la **STF** inicial subseguida de una fase en la que predomina la **STD**, determinando así un perfil *bifásico* de la **STP** ([Barroso-Flores et al., 2015](#); [Catterall et al., 2013](#); [Dittman et al., 2000](#); [Hennig, 2013](#); [Pedroarena and Schwarz, 2003](#)). El perfil **STB** puede interpretarse, alternativamente, como aquel en el que la eficacia sináptica promedio de la población de aferentes reclutada no exhibe **STF** o **STD** de modo predominante

(i.e., el estímulo recluta un número comparable de aferentes de ambos grupos), de lo que resulta una *combinación* de ambos comportamientos.

5.3. MODULACIÓN COLINÉRGICA DE LA EFICACIA SINÁPTICA EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN REPETITIVA DE LAS AFERENTES GABAérgicas

Los efectos *depresor* (muscarínico) y *facilitador* (nicotínico) sobre la eficacia sináptica de las entradas GABAérgica al PnO, evidenciados respectivamente como una *reducción* o un *incremento* reversibles de la magnitud de la primera respuesta postsináptica al tren de estimulación (R_1) (**Fig. 12**), concuerdan con los resultados previamente reportados por nuestro grupo (Kuniyawa H, 2016). Los efectos colinérgicos estuvieron asimismo asociados al incremento (*muscarínico*) o a la reducción (*nicotínico*) estadísticamente significativa del $PPR_{66.7}$ (**Fig. 13**); estos constituyen datos indicativos del *origen presináptico* (*depresor* o *facilitador*) del efecto modulador (ver además *Material Suplementario, Fig. S2*). *Muscarina* provoca, de acuerdo con esta interpretación, una reducción de $p_{r(t=0)}$, mientras que *nicotina* tiene el efecto opuesto sobre este parámetro (Bekkers and Stevens, 1990; Dobrunz and Stevens, 1997; Hess et al., 1987; Schulz et al., 1994; Zucker, 1989, 1973).

Muscarina produjo un incremento del **STPR** en 6 de los 7 experimentos realizados (**Fig. 14**), poniendo de manifiesto así un efecto *promotor* de la *facilitación por frecuencia* en las aferencias GABAérgicas activadas a 15 Hz. Este efecto parece asimismo no depender del perfil de plasticidad que exhiben las aferentes antes de la exposición al agonista (**Fig. 15**). Los efectos *muscarínicos* podrían depender de la activación de los receptores presinápticos de tipo **M2** o **M4** (metabotrópicos), cuya consecuencia es la inhibición (mediada por proteína G_i) de los canales de Ca^{2+} (“N” o “P/Q”), con la consiguiente reducción de $p_{r(t=0)}$ (Brown, 2010; Threlfell et al., 2010; Zhang and Warren, 2002).

La activación de los receptores presinápticos *nicotínicos* para ACh (resultante de la aplicación local de 20 μ M de *nicotina*), tuvo como consecuencia una reducción significativa del $PPR_{66.7}$ así como del **STPR** en todos los experimentos realizados (**Figs. 13 y 14**). Así, la activación de los **nAChRs** modula el **STP_P** de las aferentes GABAérgicas *favoreciendo* o *promoviendo* la **STD** durante la activación presináptica a 15 Hz (**Figs. 14 y 15**). Esta modulación parece además ser independiente del perfil de plasticidad inicial del contacto (**Fig. 15**). La expresión de **nAChRs** presinápticos en terminales GABAérgicas ha sido reportada por otros autores (ver por ejemplo Hernández-Vázquez et al., 2014). Los efectos *nicotínicos* *facilitadores* presinápticos podrían depender de **nAChRs** conteniendo las subunidades $\alpha 7$ o $\alpha 4\beta 7$ cuya activación tiene como consecuencia (por mecanismos *directos* o *indirectos* [mediados por despolarización presináptica],

respectivamente) un incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} y consecuentemente de $P_{r(t=0)}$ (Albuquerque et al., 2009; Alkondon and Albuquerque, 1993; Dani and Bertrand, 2007; Mansvelder et al., 2009; Marchi and Grilli, 2010; Picciotto et al., 2012; Wonnacott, 1997; Zhang and Warren, 2002). Los mecanismos *subcelulares* de la acción de los **nAChRs** presinápticos no se conocen completamente, proponiéndose (entre otros) la participación de procesos dependientes de la *liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR)* desde el retículo endoplasmático (Hernández-Vázquez et al., 2014). El incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico resultante de la activación nAChRs podría provocar tanto un incremento de la *fracción de vesículas del RRP* como la *modulación* de algunos de los componentes proteicos de la *maquinaria de liberación de neurotransmisor*, facilitando en última instancia el proceso de *exocitosis* (Barclay et al., 2005; Shen and Yakel, 2009; Turner, 2004).

5.4. MODULACIÓN DUAL MUSCARÍNICO-NICOTÍNICA

En la sección de *Antecedentes Específicos* se presentó la hipótesis de *modulación colinérgica dual* mediada por nAChRs y mAChRs co-localizados en las terminales GABAérgicas, propuesta anteriormente por nuestro grupo. La *colocalización* de ambos nAChRs y mAChRs a nivel presináptico ha sido puesta de manifiesto recientemente por otros autores en terminales GABAérgicas del *estriado* (Grilli et al., 2009); estos autores mostraron asimismo que en *sinaptosomas* dopaminérgicos del *núcleo accumbens*, el sub-tipo $\alpha 4\beta 2$ de receptor nicotínico para ACh ejerce un rol *permisivo* sobre la modulación colinérgica de la liberación de DA mediada por receptores muscarínicos M5, con los que se hallan co-localizados en estas terminales (Grilli et al., 2008).

De acuerdo con la hipótesis de *co-localización presináptica* de los receptores muscarínicos y nicotínicos, los colinomiméticos con actividad agonista muscarínico-nicotínica como la ACh o el CCh serían entonces capaces de modular la eficacia de un contacto a través de: (i) la activación exclusiva (o predominante) de **mAChRs**, resultante en una disminución de la eficacia del contacto acompañada del incremento del **PPR** y del **STPR** (i.e., una acción promotora de **STF**); (ii) la activación exclusiva (o predominante) de **nAChRs**, resultante en cambio en un incremento de la eficacia acompañado de la reducción del **PPR** y del **STPR** (i.e., una acción promotora de **STD**); (iii) una *combinación* de los efectos muscarínico y nicotínico (*coactivación*).

Cabe destacar, finalmente, que la modulación colinérgica dependiente de la activación de receptores *muscarínicos* y *nicotínicos* podría tener lugar (en concordancia con lo señalado precedentemente) por mecanismos intracelulares independientes y *no ocluyentes*. La *coactivación* de **mAChRs** y **nAChRs** podría dar cuenta de los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo tras la aplicación de ACh o CCh en el PnO (ver *Antecedentes Específicos*), en los que tuvo lugar

una *inhibición presináptica* o DSPc (efecto prevalente *muscarínico*) asociado a una reducción del PPR (efecto característicamente nicotínico) o bien, una *facilitación presináptica* (efecto prevalente nicotínico) asociado en cambio a un incremento del PPR (efecto característicamente *muscarínico*). La combinación de efectos *muscarínicos* y *nicotínicos* podría configurar así un ejemplo de convergencia de múltiples mecanismos de modulación mediados por diferentes clases de receptores co-localizados en la terminal presináptica, en concordancia con lo propuesto por otros grupos (ver para revisión [Marchi and Grilli, 2010](#)).

5.5. LA MODULACIÓN COLINÉRGICA DE LA EFICACIA SINÁPTICA GABAérgica COMO ESTRATEGIA NEURAL CAPAZ DE CONTROLAR LA OPERATIVA DEL CIRCUITO MESOPONTINO IMPLICADO EN LA GENERACIÓN DEL S-REM.

Las consecuencias funcionales sobre la eficacia de los contactos GABAérgicos resultantes de la eventual *coactivación* de los receptores *muscarínicos* y *nicotínicos* no resultan *a priori* evidentes. En la sección 4.3. se aporta sin embargo un elemento que podría contribuir a la comprensión de un diseño circuital como el propuesto por la hipótesis de control *dual*. Tanto *muscarina* como *nicotina* provocaron reducciones significativas de la Q_{inh} (ver **Fig. 16**); ambos agonistas producen así una *reducción* en la *magnitud de la inhibición postsináptica* de los contactos GABAérgicos en estudio. Los resultados referidos sugieren entonces que, pese a que los efectos mediados por ambos receptores presinápticos son *opuestos* sobre el $PPR_{66.7}$ y el STPR del contacto, la *coactivación* de estos receptores podría reducir de modo concertado la *eficacia del contacto*.

Si bien el STP_P resultante de la eventual *coactivación de nAChRs y mAChRs en el curso de la descarga presináptica repetitiva a 15 Hz* no puede inferirse directamente a partir de los resultados consignados en este trabajo, en la **Fig. 17** se presenta esquemáticamente la hipótesis de que la *combinación* de los efectos moduladores dependiente de la *co-activación* podría resultar en una reducción de la eficacia tanto en condiciones *iniciales* (i.e., reducción de R_1 por un efecto modulador *muscarínico*), como en condiciones *estacionarias*, consecuentes con la reducción del PPR y del STPR (i.e., inducción *nicotínica* de un perfil predominantemente de tipo STD). La combinación de efectos moduladores resultaría finalmente en una *reducción o supresión de carácter tónico* de la eficacia sináptica GABAérgica. La ocurrencia de PPD (y STD) por efecto modulador *nicotínico* en presencia de una reducida eficacia inicial del contacto (efecto *muscarínico*) contraviene sin embargo los modelos clásicos de STD referidos en secciones anteriores, en virtud de los cuales dicho fenómeno resulta fundamentalmente de la *depleción del RRP*, requiriendo por tanto una elevada $p_r(t=0)$. Sin embargo, la ocurrencia de PPD y STD por mecanismos *independientes de la liberación* (“*release-independent depression*”) y que implican eventualmente mecanismos

de inactivación (dependientes de la $[Ca^{2+}]_i$) de corrientes presinápticas de Ca^{2+} mediadas por canales de tipo *N* y *P/Q* (conteniendo las subunidades α_{1B-a} , β_{1b} , $\alpha_{2b}\delta$ [McNaughton et al., 1998]) ha sido evidenciada por otros autores tanto en neuronas *glutamatérgicas* como *GABAérgicas* (Thomson, 2003, 2000; Thomson et al., 1996; Thomson and Bannister, 1999).

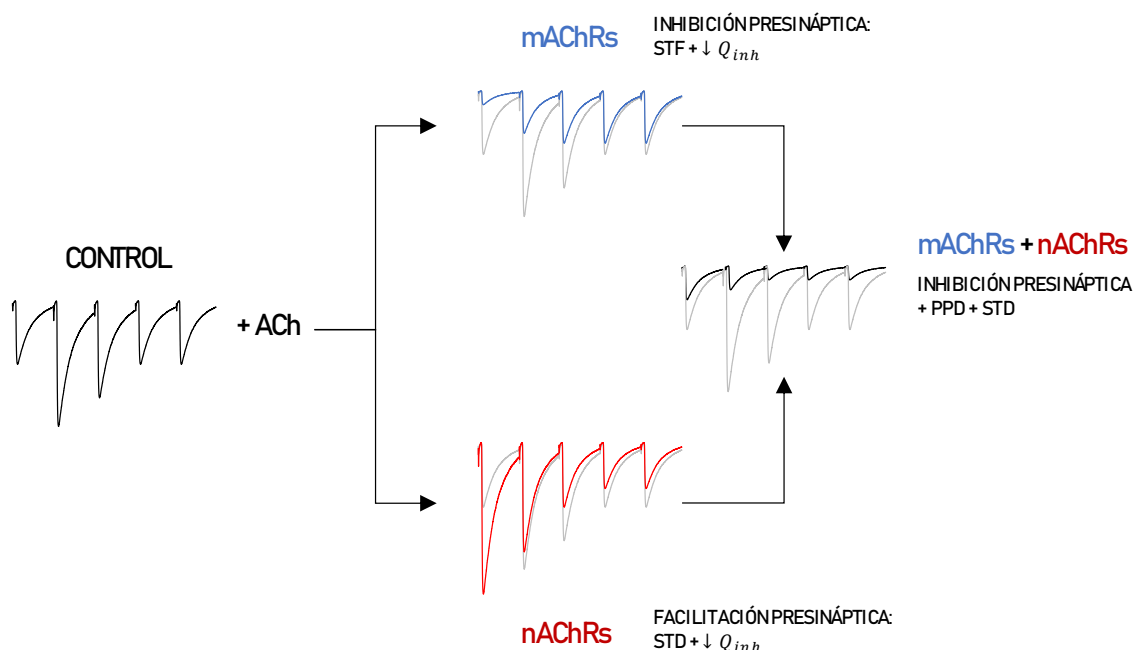


Fig. 17. Efectos sinérgicos de los receptores presinápticos para acetilcolina. La activación de los **mAChRs** promueve la **STF** del contacto por un mecanismo dependiente de la *inhibición presináptica*, asociada sin embargo a una reducción de la *carga inhibitoria transferida* por un tren de IPSCs. La activación de los **nAChRs** promueve en cambio **STD**, resultante de una *facilitación presináptica*, asociando igualmente una reducción de la Q_{inh} . El efecto resultante de la *coactivación* (**mAChRs + nAChRs**) promueve *sinérgicamente* una reducción de la eficacia del contacto, resultante de una *inhibición presináptica* asociada a la reducción del PPR y del STPR.

Anteriormente se hizo referencia a trabajos en los que se pone de manifiesto que la aplicación de antagonistas para el receptor $GABA_A$ en el PnO promueve la irrupción de episodios de S-REM, mientras que la aplicación de *muscimol* promueve un estado indistinguible de la vigilia (Xi et al., 2001, 1999). La proposición de la existencia de un *tono GABAérgico* sobre poblaciones neurales del PnO sustentada en estos resultados (y cuya supresión es necesaria para la generación los componentes cardinales de dicho estado de acuerdo con la hipótesis del “*gating GABAérgico*”, Xi et al., 2004), parece contradecir, no obstante, la suposición de que neuronas *GABAérgicas* del LDT/PPT que presentan frecuencias máximas de descarga durante este estado (“*PS-max active*”, $\sim 16,85 \pm 2,27$ Hz) (Boucetta et al., 2014; Boucetta and Jones, 2009) proyecten directamente sobre las poblaciones neurales *REM-on* del PnO.

La hipótesis presentada en la [Fig. 17](#), no obstante, podría dar cuenta de la existencia de un *diseño circuital en el que proyecciones GABAérgicas del LDT/PPT al PnO (cuyas terminales presinápticas coexpresen nAChRs y mAChRs) presenten asimismo frecuencias máximas de descarga (~15 Hz) durante el S-REM*. La remoción del tono GABAérgico durante el S-REM (*gating*) tendría lugar como consecuencia de la *supresión colinérgica de la eficacia sináptica*, resultante de la *coactivación* de los receptores para ACh en las terminales GABAérgicas pertenecientes a tales proyecciones.

Esta hipótesis concuerda asimismo con los resultados que sustentan que durante el S-REM tiene lugar en la rPRF un incremento significativo de los niveles de ACh, concomitantemente con una reducción (igualmente significativa) de los niveles de GABA en dicha región ([Leonard and Lydic, 1997](#); [Vanini et al., 2011](#)). Además de la inervación colinérgica procedente del LDT/PPT, otros autores han evidenciado la presencia de varicosidades conteniendo VACHT en el PnO ([Liang and Marks, 2014](#)). Estas terminales podrían representar el sustrato estructural para la modulación colinérgica *in vivo* de las poblaciones neuronales “REM-on” del PnO, dependiente de la *transmisión de volumen* de ACh; esta modalidad *no sináptica* de transmisión colinérgica ha sido evidenciada por técnicas tanto *morfológicas* como *neuroquímicas* en varias regiones del SNC (ver por ejemplo [Bennett et al., 2012](#); [Lendvai and Vizi, 2008](#); [Yamasaki et al., 2010](#)).

Neuronas colinérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas “PS-max active” del LDT/PPT proyectan a la PRF y a otras regiones del SNC, que incluyen (entre otras) al *tálamo* y al *hipotálamo*, formando parte del *sistema reticular activador ascendente* (SRAA) ([Jones, 2017](#)). [Semba et al. \(1990\)](#) demostraron que aproximadamente entre un 5-21% de las neuronas colinérgicas del tegmento mesopontino proyectan de modo *divergente* sobre la PRF y el *tálamo* ([Semba et al., 1990](#)). La existencia de un control *colinérgico* local en la PRF del tipo propuesto en los párrafos precedentes, posibilitaría que neuronas GABAérgicas “PS-max active” del LDT/PPT, y que proyectaran de modo igualmente *divergente* sobre el PnO y otras regiones (ver por ejemplo [Jinno et al., 2007](#); [Melzer et al., 2012](#)), tuvieran efectos postsinápticos diferenciales en sus neuronas blanco durante el S-REM (e.g., inhibiendo a neuronas talámicas pero no a las del PnO).

La *co-expresión* de nAChRs y mAChRs no excluye, sin embargo, la posibilidad de que tenga lugar la modulación colinérgica de las terminales GABAérgicas por activación *predominante* de uno u otro, lo que por su parte podría depender del *estado funcional* del contacto. Así, el efecto de la modulación predominantemente *muscarínica* resultaría en STF durante la *activación tónica* del terminal GABAérgico, mientras que la modulación predominantemente *nicotínica* resultaría en una *facilitación fásica* del contacto subseguida de la depresión por frecuencia (STD) en tales condiciones. La actividad reciente del contacto, así como la exposición previa a moduladores de otra clase (vinculados por ejemplo a *estados comportamentales* definidos), podría condicionar el resultado *neto* (muscarínico o nicotínico) de la modulación colinérgica. Fenómenos de este tipo podrían asimismo contribuir a la comprensión de los resultados mencionados en la

sección 1.1.3., que señalan la *dependencia* entre los *efectos de la inyección de colinomiméticos en el PnO* y la *fase del ciclo sueño-vigilia* en la que la misma es realizada (López-Rodríguez et al., 1994), así como la irrupción de un estado similar a la vigilia (con incremento de la actividad muscular), resultante de la inyección de agonistas colinérgicos en dicha región (Boissard et al., 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto *características funcionales* (consistentes en la expresión de STP) de una población de contactos GABAérgicos que integran presumiblemente la red *mesopontina* conformada por el LDT/PPT y el PnO, así como su *modulación colinérgica*. En virtud de estas propiedades los contactos GABAérgicos analizados podrían resultar decisivos para el control operativo de dicha red y, consiguientemente, para la generación y control de los componentes fundamentales del S-REM. Aun cuando evidencias adicionales tanto *morfológicas* como *funcionales* sean requeridas (e.g., confirmar la existencia de proyecciones GABAérgicas al PnO pertenecientes a las poblaciones “PS-max active” del LDT/PPT o bien, la determinación de los efectos moduladores colinérgicos resultantes de la aplicación en el PnO de agonistas *no selectivos* para n/mAChRs como ACh o CCh), nuestros datos sustentan la existencia de un *mecanismo modulador específico y dual*, capaz de *incrementar la capacidad operativa* de la red neural considerada, tanto por efectos prevalentemente *muscarínicos*, prevalentemente *nicotínicos*, así como por una *combinación* de tales efectos. *In vivo*, el resultado *neto* de la acción moduladora colinérgica sobre la eficacia de estos contactos podría resultar en un fenómeno dependiente del *estado comportamental*, contribuyendo eventualmente a la ocurrencia de fenómenos de *reconfiguración circuital* de esta red (Getting, 1989; Harris-Warrick and Marder, 1991; Hooper, 2004). El presente trabajo constituye finalmente una primera etapa en el análisis de la *interacción entre los sistemas colinérgico-GABAérgico en la rPRF* incorporando específicamente la *modulación de la eficacia sináptica* como elemento crítico en el control de la operativa circuital, y analizando por primera vez la ocurrencia de fenómenos de *modulación colinérgica dependientes de actividad* en entradas GABAérgicas a la rPRF.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. La activación presináptica repetitiva a 15 Hz de aferentes GABAérgicas que establecen contactos monosinápticos con neuronas del PnO, provoca respuestas postsinápticas compuestas cuya *eficacia* exhibe modificaciones compatibles con la expresión de fenómenos plásticos de corto plazo (**STP**).
2. La **STP** de las entradas GABAérgicas puede ser descrita a través de los índices **PPR_{66.7}** y **STPR**, demostrándose la existencia de contactos que exhiben formas particulares de *facilitación* y *depresión sináptica de corto plazo*, consistentes en la *facilitación* y la *depresión por frecuencia*, respectivamente. La *eficacia sináptica* tiende en todos los casos a alcanzar un *estado estacionario* en el curso de la estimulación mediante trenes de 5 pulsos.
3. La expresión de un determinado *perfil de plasticidad* en los contactos GABAérgicos analizados (**STF** o **STD**) se correlaciona con el *estado funcional presináptico* del contacto, en concordancia con los modelos generalmente aceptados de **STP**. Los cambios asociados en el valor de $1/CV^2$ de las sucesivas respuestas indican que tanto la **STF** como la **STD** poseen un origen *presináptico*.
4. El *perfil de plasticidad* caracterizado por los índices **PPR_{66.7}** y **STPR** es modulado de modo *específico* por los agonistas colinérgicos para los receptores *muscarínicos* y *nicotínicos*. La modulación *muscarínica* promueve la **facilitación por frecuencia** de la eficacia de estos contactos, incrementando el valor de ambos índices durante su efecto máximo; la modulación *nicotínica* promueve la **depresión por frecuencia** del contacto, reduciendo correspondientemente los valores de dichos índices.
5. Los efectos moduladores *muscarínico* y *nicotínico* resultan presumiblemente de mecanismos *presinápticos*, asociando a la *depresión* o *facilitación* sináptica reversible de la primera respuesta (R_1), un incremento o una reducción, respectivamente, del **PPR_{66.7}**.
6. Ambos agonistas promueven una reducción de la *carga inhibitoria* (**Q_{inh}**) de la entrada sináptica.
7. El análisis de la *eficacia sináptica* de los contactos GABAérgicos empleando patrones fisiológicos de actividad presináptica permite evidenciar no solo la ocurrencia de *fenómenos plásticos intrínsecos* de los contactos (STP), sino que además revela aspectos de eventual *relevancia funcional* para el circuito neural mesopontino y que podrían eventualmente dar cuenta de la supresión del tono GABAérgico (“*gating*”) durante el S-REM, inadvertidos bajo otras condiciones de estudio.

A los efectos de avanzar en la consolidación de los aportes realizados por el presente trabajo, nos proponemos en una siguiente etapa contrastar la hipótesis propuesta en la sección 5.5. (**Fig 17**). Se ensayará para ello la aplicación de los agonistas *no selectivos* ACh (1 mM) y CCh (1 mM) en condiciones de activación presináptica repetitiva a 15 Hz de las aferentes GABAérgicas, determinando así la ocurrencia de efectos compatibles con la *coactivación muscarínico-nicotínica* y de un efecto *supresor* de carácter *tónico* sobre la eficacia de estos contactos. Asimismo, en dicha etapa se profundizará en el análisis *farmacológico* de la modulación colinérgica, indagando los subtipos de nAChRs y mAChRs implicados. Específicamente podrán ser ensayados en esta etapa:

(i) para receptores **muscarínicos M2** metoctramina (2 μ M) (Baghdoyan, 1997); (ii) para receptores **muscarínicos M1** pirenzepina (1 μ M); (iii) para receptores **nicotínicos tipo IA** ($\alpha 7$) MLA (methylllylcaconitine, 10 nM); (iv) para receptores **nicotínicos no- $\alpha 7$** (nAChRs tipo III), mecamlamina (MMA, 10 μ M, selectividad $\beta 2, \beta 4 > \alpha 7$) (Zhang and Warren, 2002).

Complementariamente al abordaje ensayado en este trabajo, nos proponemos avanzar en la implementación de técnicas de estimulación tales como la de *estimulación mínima* (i.e., estimulación de una única aferente) (Allen and Stevens, 1994; Raastad, 1995; Raastad et al., 1992), con el objetivo de reducir el número de indeterminaciones discutidas en la sección 5.1., inherentes al carácter *compuesto* de los IPSCs estudiados. En el Laboratorio hemos avanzado en la implementación de esta técnica (ver Fig. 18), obteniendo resultados preliminares consistentes con el reclutamiento de una aferente única. La implementación de estos abordajes permitirá, por un lado, profundizar en la descripción y análisis del fenómeno plástico de corto plazo, al tiempo que permitirá avanzar en el análisis de la modulación colinérgica de la STP, específicamente en la obtención de datos indicativos de la *coactivación* de los receptores presinápticos para ACh.

A los efectos de incrementar la rigurosidad del análisis presentado en este trabajo, nos proponemos adicionalmente:

(i). Determinar si en las condiciones de estimulación del LDT/PPT ensayadas tiene lugar la activación concomitante de aferentes *colinérgicas* originadas en el LDT/PPT y, consecuentemente, la ocurrencia de efectos moduladores colinérgicos de las aferentes GABAérgicas, de origen *endógeno*. Cabe recordar los resultados mencionados en la sección de *Antecedentes Específicos*, indicativos de que la activación de estas aferentes requiere la aplicación de trenes de estimulación prolongados (500 ms) y de alta frecuencia (30 Hz). A los efectos de confirmar que la estimulación a 15 Hz no desencadena modulación colinérgica por activación de tales aferentes, se procederá a la evaluación de la eficacia sináptica en experimentos de control en los que se perfundirá la preparación con antagonistas para mAChRs (*atropina*) y nAChRs (MLA+MMA, ver más adelante), evaluando los efectos sobre los parámetros de función sináptica ya analizados.

(ii). Realizar el *marcage retrógrado* de las aferentes GABAérgicas (aplicación iontoforética de *neurobiotina* 2% en $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ 4 M en el PnO combinada con inmunohistoquímica para GABA o GAD [*descarboxilasa del ácido glutámico*]). Ello permitiría la confirmación *morfológica* de proyecciones GABAérgicas del LDT/PPT al PnO, pieza de información relevante para la interpretación de resultados realizada en la sección 5.2.3.

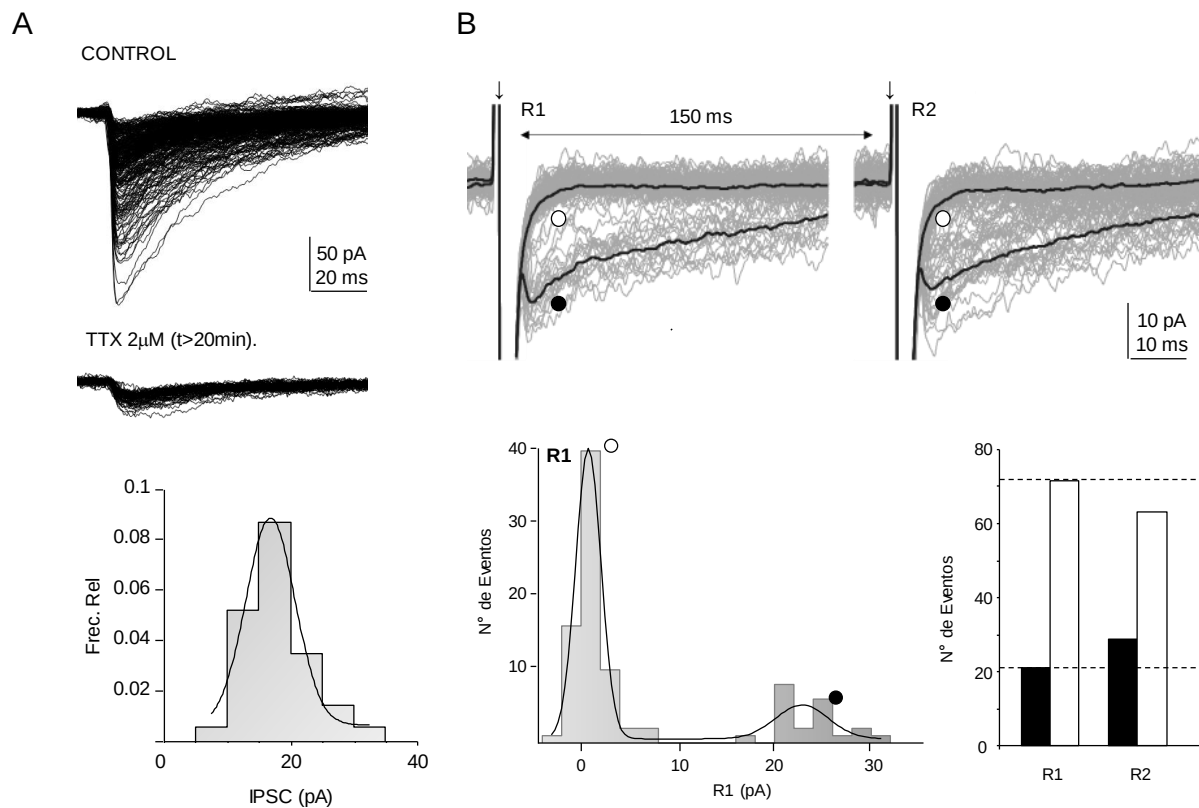


Fig. 18. Estimulación mínima de aferentes GABAérgicas: resultados preliminares. **(A).** Arriba: IPSCs espontáneos registrados en condiciones control (trazados superiores) y luego de la aplicación de TTX 2 μ M (por perfusión). Abajo: Histograma de amplitudes de los IPSCs (*minis*). **(B).** Arriba: IPSCs GABAérgicos (trazados en gris) aislados farmacológicamente (perfusión con KYN 5 mM) obtenidas en neuronas del PnO (WCP, VC, potencial de mantenimiento de -70 mV, medio intracelular basado en KCl 140 mM) tras la aplicación de pulsos pareados (150 ms de intervalo interestímulo) sobre aferentes GABAérgicas mediante un microelectrodo fabricado con vidrio septado (diámetro de la punta $\sim$ 5-10 μ m) y colocado a una distancia de $\sim$ 150 μ m de la neurona registrada bajo control visual. R1 (izquierda) y R2 (derecha) corresponden a los IPSCs provocados por el primer y segundo estímulo del par respectivamente. Los trazados se presentan alineados por los artefactos de estimulación ($\downarrow$). Los trazados gruesos señalados con ($\circ$) en R1 y R2 corresponden al promedio ($n = 150$) de aquellos en los que la respuesta fue $\sim$ 0 pA (fallos), mientras que los trazados gruesos señalados con ($\bullet$) corresponden al promedio ($n = 150$) de aquellos en los que las respuestas se ubicaron entre $\sim$ 15-20 pA (éxitos). El carácter *todo o nada* de la respuesta es indicativo de las condiciones de estimulación mínima. Abajo: A la izquierda, histograma de amplitudes para R1, mostrando un carácter bimodal. Los gráficos de barras de la derecha muestran el número de fallos ($\square$) y éxitos ($\blacksquare$) contabilizados para R1 y R2. Obsérvense las diferencias entre ambas respuestas, indicativas de un fenómeno de PPF.

7. MATERIAL SUPLEMENTARIO

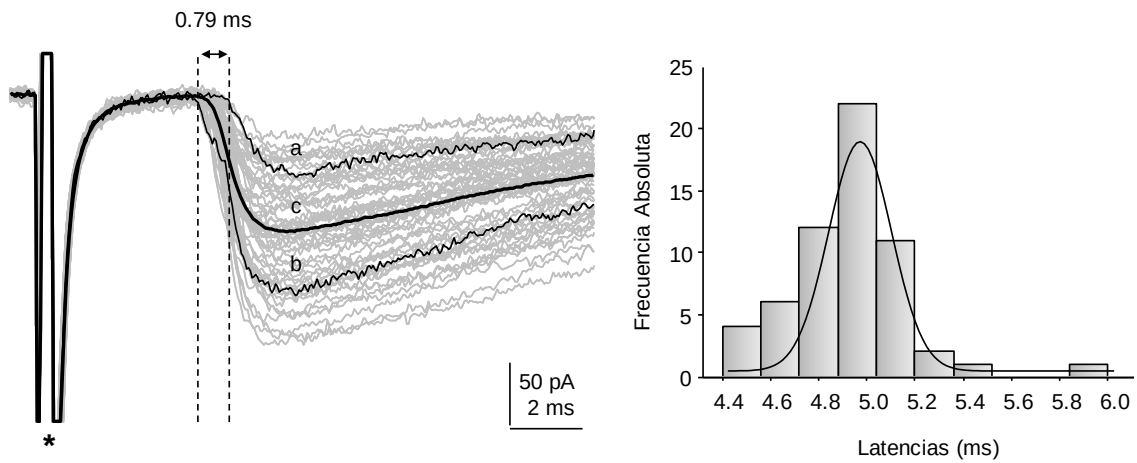


Fig. S1. Variabilidad de las latencias del primer IPSC. A la izquierda se muestran sectores superpuestos de $n = 59$ trazados (alineados por el artefacto de estimulación, *) en los que se observa los IPSCs provocados (excluyéndose los fallos) en respuesta al primer pulso de trenes de estimulación aplicados consecutivamente (intervalos de ~ 10 s entre trenes sucesivos). Los trazados en negro indicados por “a” y “b” muestran los correspondientes a aquellos que presentaron los valores máximo y mínimo de latencia, respectivamente (la diferencia se indica en la parte superior). El trazado indicado por “c” corresponde al promedio de las respuestas (i.e., representa la **potencia sináptica**). A la derecha se muestra un histograma de los valores de las latencias para la misma neurona; se ha realizado el ajuste de una *Gaussiana* ($r^2 = 0.686$), que permite observar el carácter unimodal de la distribución de los valores de las latencias. El valor medio de la latencia es de 4.916 ms. **El desvío estándar (SD) es de 243 μ s, correspondiente a un 4.94 % del valor medio.** El SD es empleado por otros autores (ver por ej. [Doyle and Andresen, 2001](#); [McDougall et al., 2008](#)) como medida de la variabilidad de la latencia (“jitter”).

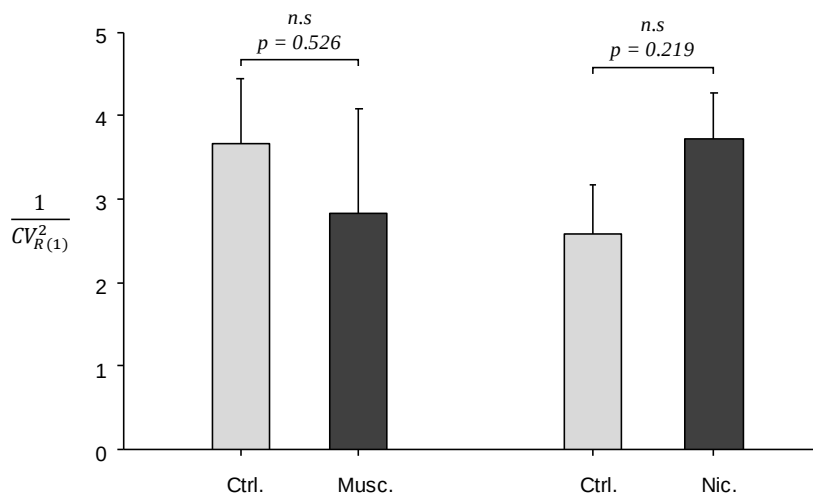


Fig. S2. Aplicación del método del CV para la determinación del origen pre o postsináptico de los efectos moduladores. *Izquierda:* Gráficos de barras para los valores medios ($\pm$ SEM) de $1/CV_R^2$ de R_1 en condiciones *control* (Ctrl.) y durante el efecto máximo de *muscarina* (Musc., 10 μ M). *Wilcoxon Signed*

Rank Test, $N=6$. La reducción de $1/CV_R^2$ sugiere un origen presináptico. Derecha: mismos gráficos que los mostrados a la izquierda, pero mostrando el efecto de la aplicación yuxtacelular de *nicotina* (20 μM). *Wilcoxon Signed Rank Test*, $N=6$.

Autor(es), año	Preparación	Agonista, dosis y método de aplicación	Receptores presumiblemente implicados
<i>Aramakis and Metherate, 1998</i>	Corteza Auditiva. Rodajas 300 μm (P8-P24 ¹³).	Nicotina; 0,25-25 μM ; aplicación yuxtacelular por presión, 10-200 mseg, 20 psi (20-1500 μl)	$\alpha 7$ nAChRs presinápticos
<i>Castillo et al., 1999</i>	Bulbo olfatorio. Rodajas 350 μm (ratón, 2-5 semanas)	Nicotina; 30 μM ; perfusión	nAChRs, postsinápticos
<i>Guo et al., 1998</i>	Rodajas 350-400 μm conteniendo al núcleo geniculado lateral (NGL) (embriones de pollo, 18-20 días)	Nicotina; 100 μM ; perfusión	$\alpha 7$, 8 nAChRs presinápticos
<i>Hernández-Vázquez et al., 2014</i>	Rodajas 350 μm conteniendo al rafe dorsal (DR) (P18-P21)	Nicotina; 1 μM ; perfusión	$\alpha 7$ nAChRs presinápticos
<i>Jo and Role, 2002</i>	Hipotálamo. Cultivo	Nicotina; 500 nM ; perfusión Muscarina; 10 μM ; perfusión	No $\alpha 7$ nAChRs Presinápticos
<i>Kawaguchi, 1997</i>	Corteza Frontal. Rodajas 200 μm (P18-P22).	Muscarina; 3 μM ; perfusión	mAChRs postsinápticos
<i>Li et al., 2004</i>	Rodajas 250-300 μm conteniendo al colículo superior (SC) (P13-P18)	Muscarina; 10 μM ; perfusión	M1, M3 presinápticos ¹⁴
<i>McGehee et al., 1995</i>	Co-cultivo Habénula medial (MHN)-Núcleo interpeduncular (IPN)	Nicotina; 10 nM-300¹⁵ μM ; perfusión	$\alpha 7$ nAChRs presinápticos
<i>Rover et al., 2002</i>	Núcleo Accumbens. Rodajas 170 μm (P21-P23)	Nicotina; 2 μM ; perfusión	No $\alpha 7$ nAChRs Postsinápticos
<i>Williams and Johnston, 1990</i>	Hipocampo. Rodajas 450 μm (adultos, 100-200 g)	Muscarina; 1-10 μM ; perfusión	mAChRs postsinápticos

Tabla S1. Dosis de los agonistas colinérgicos *nicotina* y *muscarina* aplicados por diversos grupos en estudios *in vitro*.

¹³ Días de vida postnatal.

¹⁴ Eventualmente M2.

¹⁵ Las dosis del rango comprendido entre 150 y 300 μM son empleadas para provocar desensibilización de los receptores nicotínicos en estos experimentos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abraham, W.C., Bear, M.F., 1996. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 19, 126–130.
2. Aghajanian, G.K., Rasmussen, K., n.d. Intracellular studies in the facial nucleus illustrating a simple new method for obtaining viable motoneurons in adult rat brain slices. *Synapse* 3, 331–338.
3. Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., Rogers, S.W., 2009. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 89, 73–120.
4. Alkondon, M., Albuquerque, E.X., 1993. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 1455–1473.
5. Allen, C., Stevens, C.F., 1994. An evaluation of causes for unreliability of synaptic transmission. *PNAS* 91, 10380–10383.
6. Aramakis, V.B., Metherate, R., 1998. Nicotine Selectively Enhances NMDA Receptor-Mediated Synaptic Transmission during Postnatal Development in Sensory Neocortex. *J. Neurosci.* 18, 8485–8495.
7. Armstrong, C.M., Gilly, W.F., 1992. [5] Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping, in: *Ion Channels, Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 100–122.
8. Arrigoni, E., Chen, M.C., Fuller, P.M., 2016. The anatomical, cellular and synaptic basis of motor atonia during rapid eye movement sleep. *J Physiol* 594, 5391–5414.
9. Aserinsky, E., Kleitman, N., 1953. Regularly Occurring Periods of Eye Motility, and Concomitant Phenomena, During Sleep. *Science* 118, 273–274.
10. Baghdoyan, H.A., 1997. Location and quantification of muscarinic receptor subtypes in rat pons: implications for REM sleep generation. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 273, R896–R904.
11. Baghdoyan, H.A., Carlson, B.X., Roth, M.T., 1994. Pharmacological Characterization of Muscarinic Cholinergic Receptors in Cat Pons and Cortex. *PHA*.
12. Baghdoyan, H.A., Rodrigo-Angulo, M.L., McCarley, R.W., Hobson, J.A., 1984. Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Research* 306, 39–52.
13. Bailey, C.H., Giustetto, M., Huang, Y.-Y., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., 2000. Is Heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience* 1, 11–20.
14. Baimoukhametova, D.V., Hewitt, S.A., Sank, C.A., Bains, J.S., 2004. Dopamine Modulates Use-Dependent Plasticity of Inhibitory Synapses. *J. Neurosci.* 24, 5162–5171.
15. Barclay, J.W., Morgan, A., Burgoyne, R.D., 2005. Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium, Frontiers in calcium signalling* 38, 343–
16. Barroso-Flores, J., Herrera-Valdez, M.A., Galarraga, E., Bargas, J., 2017. Models of Short-Term Synaptic Plasticity, in: *The Plastic Brain, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Cham, pp. 41–57.
17. Barroso-Flores, J., Herrera-Valdez, M.A., Lopez-Huerta, V.G., Galarraga, E., Bargas, J., 2015. Diverse Short-Term Dynamics of Inhibitory Synapses Converging on Striatal Projection Neurons: Differential Changes in a Rodent Model of Parkinson's Disease.
18. Bekkers, J.M., Stevens, C.F., 1990. Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 346, 724–729.
19. Bennett, C., Arroyo, S., Berns, D., Hestrin, S., 2012. Mechanisms Generating Dual-Component Nicotinic EPSCs in Cortical Interneurons. *J. Neurosci.* 32, 17287–17296.
20. Boissard, R., Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B., Luppi, P.-H., 2003. Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *European Journal of Neuroscience* 18, 1627–1639.
21. Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M.H., Barbagli, B., Fort, P., Luppi, P.-H., 2002. The rat pontomedullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *European Journal of Neuroscience* 16, 1959–1973.
22. Boucetta, S., Cissé, Y., Mainville, L., Morales, M., Jones, B.E., 2014. Discharge Profiles across the Sleep–Waking Cycle of Identified Cholinergic, GABAergic, and Glutamatergic Neurons in the Pontomesencephalic Tegmentum of the Rat. *J. Neurosci.* 34, 4708–4727.
23. Boucetta, S., Jones, B.E., 2009. Activity Profiles of Cholinergic and Intermingled GABAergic and Putative Glutamatergic Neurons in the Pontomesencephalic Tegmentum of Urethane-Anesthetized Rats. *J. Neurosci.* 29, 4664–4674.
24. Bourgin, P., Escourrou, P., Gaultier, C., Adrien, J., 1995. Induction of rapid eye movement sleep by carbachol infusion into the pontine reticular formation in the rat. *Neuroreport* 6, 532–536.
25. Branco, T., Staras, K., 2009. The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 373–383.
26. Brown, D.A., 2010. Muscarinic Acetylcholine Receptors (mAChRs) in the Nervous System: Some Functions and Mechanisms. *J Mol Neurosci* 41, 340–346.
27. Brown, R.E., Basheer, R., McKenna, J.T., Strecker, R.E., McCarley, R.W., 2012. Control of Sleep and Wakefulness. *Physiol Rev* 92, 1087–1187.
28. Cabezas, C., Buño, W., 2006. Distinct Transmitter Release Properties Determine Differences in Short-Term Plasticity at Functional and Silent Synapses. *Journal of Neurophysiology* 95, 3024–3034.
29. Capece, M.L., Efange, S.M.N., Lydic, R., 1997. Vesicular acetylcholine transport inhibitor suppresses REM sleep. *NeuroReport* 8.

30. Carli, G., Zanchetti, A., 1965. A study of pontine lesions suppressing deep sleep in the cat. *Archives Italiennes de Biologie* 103, 751–758.
31. Castillo, P.E., Carleton, A., Vincent, J.-D., Lledo, P.-M., 1999. Multiple and Opposing Roles of Cholinergic Transmission in the Main Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 19, 9180–9191.
32. Catterall, W.A., Leal, K., Nanou, E., 2013. Calcium Channels and Short-term Synaptic Plasticity. *J. Biol. Chem.* 288, 10742–10749.
33. Clément, O., Sapin, E., Bérød, A., Fort, P., Luppi, P.-H., 2011. Evidence that Neurons of the Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Triggering Paradoxical (REM) Sleep Are Glutamatergic. *Sleep* 34, 419–423.
34. Clements, J.D., 2003. Variance–mean analysis: a simple and reliable approach for investigating synaptic transmission and modulation. *Journal of Neuroscience Methods, Adapting Quantal Analysis to Central Synapses* 130, 115–125.
35. Cornwall, J., Cooper, J.D., Phillipson, O.T., 1990. Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Research Bulletin* 25, 271–284.
36. Cox, C.L., Huguenard, J.R., Prince, D.A., 1997. Nucleus reticularis neurons mediate diverse inhibitory effects in thalamus. *PNAS* 94, 8854–8859.
37. Creager, R., Dunwiddie, T., Lynch, G., 1980. Paired pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J. Physiol.* 299, 409–424.
38. Dani, J.A., Bertrand, D., 2007. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47, 699–729.
39. Dannenberg, H., Young, K., Hasselmo, M., 2017. Modulation of Hippocampal Circuits by Muscarinic and Nicotinic Receptors. *Frontiers in Neural Circuits* 11, 102.
40. Davies, C.H., Davies, S.N., Collingridge, G.L., 1990. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 424, 513–531.
41. Debanne, D., Guérineau, N.C., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M., 1996. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of Physiology* 491, 163–176.
42. del Castillo, J., Katz, B., 1954. Quantal components of the end-plate potential. *The Journal of Physiology* 124, 560–573.
43. Dittman, J.S., Kreitzer, A.C., Regehr, W.G., 2000. Interplay between Facilitation, Depression, and Residual Calcium at Three Presynaptic Terminals. *J. Neurosci.* 20, 1374–1385.
44. Dobrunz, L.E., Stevens, C.F., 1997. Heterogeneity of Release Probability, Facilitation, and Depletion at Central Synapses. *Neuron* 18, 995–1008.
45. Doyle, M.W., Andresen, M.C., 2001. Reliability of Monosynaptic Sensory Transmission in Brain Stem Neurons In Vitro. *Journal of Neurophysiology* 85, 2213–2223.
46. Exley, R., Cragg, S.J., 2008. Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *British Journal of Pharmacology* 153, S283–S297.
47. Eyre, M.D., Renzi, M., Farrant, M., Nusser, Z., 2012. Setting the Time Course of Inhibitory Synaptic Currents by Mixing Multiple GABAA Receptor α Subunit Isoforms. *J. Neurosci.* 32, 5853–5867.
48. Faber, D.S., Korn, H., 1991. Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophysical Journal* 60, 1288–1294.
49. Fioravante, D., Regehr, W.G., 2011. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology, Synaptic function and regulation* 21, 269–274.
50. Fischer, T.M., Blazis, D.E.J., Priver, N.A., Carew, T.J., 1997. Metaplasticity at identified inhibitory synapses in *Aplysia*. *Nature* 389, 860–865.
51. Flint, R.R., Chang, T., Lydic, R., Baghdoyan, H.A., 2010. GABAA Receptors in the Pontine Reticular Formation of C57BL/6J Mouse Modulate Neurochemical, Electrophysiological, and Behavioral Phenotypes of Wakefulness. *Journal of Neuroscience* 30, 12301–12309.
52. Ford, B., Holmes, C.J., Mainville, L., Jones, B.E., 1995. GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: Codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 363, 177–196.
53. Fortune, E.S., Rose, G.J., 2001. Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends in Neurosciences* 24, 381–385.
54. Fortune, E.S., Rose, G.J., 2000. Short-Term Synaptic Plasticity Contributes to the Temporal Filtering of Electrosensory Information. *J. Neurosci.* 20, 7122–7130.
55. Freund, T.F., Katona, I., 2007. Perisomatic Inhibition. *Neuron* 56, 33–42.
56. Fuller, P.M., Saper, C.B., Lu, J., 2007. The pontine REM switch: past and present. *The Journal of Physiology* 584, 735–741.
57. Gardner, D., 1980. Time integral of synaptic conductance. *The Journal of Physiology* 304, 181–191.
58. George, R., Haslett, W.L., Jenden, D.J., 1964. A cholinergic mechanism in the brainstem reticular formation: Induction of paradoxical sleep. *International Journal of Neuropharmacology* 3, 541-IN1.
59. Gerber, U., Greene, R.W., McCarley, R.W., 1989. Repetitive firing properties of medial pontine reticular formation neurones of the rat recorded in vitro. *J. Physiol* 410, 533–560.
60. Getting, P.A., 1989. Emerging Principles Governing the Operation of Neural Networks. *Annual Review of Neuroscience* 12, 185–204.
61. Gnadt, J.W., Pegram, G.V., 1986. Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. *Brain Research* 384, 29–41.
62. Grace, K.P., Horner, R.L., 2015. Evaluating the Evidence Surrounding Pontine Cholinergic Involvement in REM Sleep Generation. *Front. Neurol.* 6.
63. Grace, K.P., Vanstone, L.E., Horner, R.L., 2014. Endogenous Cholinergic Input to the Pontine REM Sleep Generator Is Not Required for REM Sleep to Occur. *J. Neurosci.* 34, 14198–14209.
64. Greene, R.W., Haas, H.L., Gerber, U., McCarley, R.W., 1989. Cholinergic activation of medial pontine reticular formation neurons in vitro, in: Frotscher, P.D.M., Misgeld, P.-D.D.U. (Eds.), *Central Cholinergic Synaptic Transmission, Experientia Supplementum*. Birkhäuser Basel, pp. 123–137.
65. Grilli, M., Patti, L., Robino, F., Zappettini, S., Raiteri, M., Marchi, M., 2008. Release-enhancing pre-

- synaptic muscarinic and nicotinic receptors co-exist and interact on dopaminergic nerve endings of rat nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry* 105, 2205–2213.
66. Grilli, M., Zappettini, S., Raiteri, L., Marchi, M., 2009. Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors coexist on GABAergic nerve endings in the mouse striatum and interact in modulating GABA release. *Neuropharmacology* 56, 610–614.
67. Guo, J.-Z., Tredway, T.L., Chiappinelli, V.A., 1998. Glutamate and GABA Release Are Enhanced by Different Subtypes of Presynaptic Nicotinic Receptors in the Lateral Geniculate Nucleus. *J. Neurosci.* 18, 1963–1969.
68. Harris-Warrick, R.M., Marder, E., 1991. Modulation of Neural Networks for Behavior. *Annual Review of Neuroscience* 14, 39–57.
69. Heister DS, Hayar A, Garcia-Rill E, 2009. Cholinergic modulation of GABAergic and glutamatergic transmission in the dorsal subcoeruleus: mechanisms for REM sleep control. *Sleep* 32, 1135–1147.
70. Hennig, M.H., 2013. Theoretical models of synaptic short term plasticity. *Front. Comput. Neurosci.* 7.
71. Héricé, C., Patel, A.A., Sakata, S., 2018. Circuit mechanisms and computational models of REM sleep. *Neuroscience Research*.
72. Hernández-Martínez, R., Aceves, J.J., Rueda-Orozco, P.E., Hernández-Flores, T., Hernández-González, O., Tapia, D., Galarraga, E., Bargas, J., 2014. Muscarinic presynaptic modulation in GABAergic pallidal synapses of the rat. *Journal of Neurophysiology* 113, 796–807.
73. Hernández-Vázquez, F., Chavarria, K., Garduño, J.A., Hernández-López, S., Mihailescu, S., 2014. Nicotine increases GABAergic input on rat dorsal raphe serotonergic neurons through alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of neurophysiology* 112, 3154–3163.
74. Hess, G., Kuhnt, U., Voronin, L.L., 1987. Quantal analysis of paired-pulse facilitation in guinea pig hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 77, 187–192.
75. Hessler, N.A., Shirke, A.M., Malinow, R., 1993. The probability of transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* 366, 569–572.
76. Hobson, J.A., McCarley, R.W., Wyzinski, P.W., 1975. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189, 55–58.
77. Hooper, S.L., 2004. Behavioral Plasticity: Modulation Occurs across Time. *Current Biology* 14, R190–R191.
78. Ito, K., Yanagihara, M., Imon, H., Dauphin, L., McCarley, R.W., 2002. Intracellular recordings of pontine medial gigantocellular tegmental field neurons in the naturally sleeping cat: behavioral state-related activity and soma size difference in order of recruitment. *Neuroscience* 114, 23–37.
79. Jackman, S.L., Regehr, W.G., 2017. The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron* 94, 447–464.
80. Jinno, S., Klausberger, T., Marton, L.F., Dalezios, Y., Roberts, J.D.B., Fuentealba, P., Bushong, E.A., Henze, D., Buzsaki, G., Somogyi, P., 2007. Neuronal Diversity in GABAergic Long-Range Projections from the Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 27, 8790–8804.
81. Jo, Y.-H., Role, L.W., 2002. Cholinergic Modulation of Purinergic and GABAergic Co-Transmission at In Vitro Hypothalamic Synapses. *Journal of Neurophysiology* 88, 2501–2508.
82. ignaling at Central Glutamatergic Synapses. *Physiology* 15, 83–89.
83. Jonas, P., Bischofberger, J., Sandkühler, J., 1998. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281, 419–424.
84. Jones, B.E., 2017. Principal cell types of sleep–wake regulatory circuits. *Current Opinion in Neurobiology, Neurobiology of Sleep* 44, 101–109.
85. Jones, B.E., 2004. Paradoxical REM sleep promoting and permitting neuronal networks. *Archives Italiennes de Biologie* 142, 379–396.
86. Jones, B.E., 1991. Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 40, 637–656.
87. Jouvet, M., 1965. Paradoxical Sleep — A Study of its Nature and Mechanisms, in: K. Akert, C.B. and J.P.S. (Ed.), *Progress in Brain Research, Sleep Mechanisms*. Elsevier, pp. 20–62.
88. Jouvet, M., 1962. Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep. *Archives italiennes de biologie* 100, 125–206.
89. Jouvet, M., Michel, F., 1959. [Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate & mesencephalic cat]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 153, 422–425.
90. Kaeser, P.S., Regehr, W.G., 2017. The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Current Opinion in Neurobiology, Neurobiology of Learning and Plasticity* 43, 63–70.
91. Kasyanov, A.M., Maximov, V.V., Byzov, A.L., Berretta, N., Sokolov, M.V., Gasparini, S., Cherubini, E., Reymann, K.G., Voronin, L.L., 2000. Differences in amplitude–voltage relations between minimal and composite mossy fibre responses of rat CA3 hippocampal neurons support the existence of intrasynaptic ephaptic feedback in large synapses. *Neuroscience* 101, 323–336.
92. Kawaguchi, Y., 1997. Selective Cholinergic Modulation of Cortical GABAergic Cell Subtypes. *Journal of Neurophysiology* 78, 1743–1747.
93. Kraushaar, U., Jonas, P., 2000. Efficacy and Stability of Quantal GABA Release at a Hippocampal Interneuron–Principal Neuron Synapse. *Journal of Neuroscience* 20, 5594–5607.
94. Krenzer, M., Anacleit, C., Vetrivelan, R., Wang, N., Vong, L., Lowell, B.B., Fuller, P.M., Lu, J., 2011. Brainstem and Spinal Cord Circuitry Regulating REM Sleep and Muscle Atonia. *PLoS ONE* 6, e24998.
95. Kroeger, D., Ferrari, L.L., Petit, G., Mahoney, C.E., Fuller, P.M., Arrigoni, E., Scammell, T.E., 2016. Cholinergic, glutamatergic, and GABAergic neurons of the PPT have distinct effects on sleep/wake behavior in mice. *J. Neurosci.* 1405–16.
96. Kunizawa H, 2016. ¿Modulación de la eficacia sináptica dependiente del estado comportamental? Estudio electrofisiológico in vitro en una región críticamente implicada en el control de la vigilia y el sueño REM. Tesis de Maestría PEDECIBA Biología Subárea Neurociencia, Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina Montevideo, Uruguay.

97. Lendvai, B., Vizi, E.S., 2008. Nonsynaptic Chemical Transmission Through Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Physiological Reviews* 88, 333–349.
98. Leonard, T.O., Lydic, R., 1997. Pontine Nitric Oxide Modulates Acetylcholine Release, Rapid Eye Movement Sleep Generation, and Respiratory Rate. *J. Neurosci.* 17, 774–785.
99. Li, F., Endo, T., Isa, T., 2004. Presynaptic muscarinic acetylcholine receptors suppress GABAergic synaptic transmission in the intermediate grey layer of mouse superior colliculus. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2079–2088.
100. Liang, C.-L., Marks, G.A., 2014. GABAA receptors are located in cholinergic terminals in the nucleus pontis oralis of the rat: Implications for REM sleep control. *Brain Research* 1543, 58–64.
101. López-Rodríguez, F., Kohlmeier, K., Morales, F.R., Chase, M.H., 1994. State dependency of the effects of microinjection of cholinergic drugs into the nucleus pontis oralis. *Brain Research* 649, 271–281.
102. Lu, J., Sherman, D., Devor, M., Saper, C.B., 2006. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441, 589–594.
103. Lu, T., Trussell, L.O., 2000. Inhibitory Transmission Mediated by Asynchronous Transmitter Release. *Neuron* 26, 683–694.
104. Luppi, P.-H., Clément, O., Sapin, E., Gervasoni, D., Peyron, C., Léger, L., Salvert, D., Fort, P., 2011. The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Medicine Reviews* 15, 153–163.
105. Luppi, P.-H., Clément, O., Sapin, E., Peyron, C., Gervasoni, D., Léger, L., Fort, P., 2012. Brainstem mechanisms of paradoxical (REM) sleep generation. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 463, 43–52. h
106. Luppi, P.-H., Gervasoni, D., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., Salvert, D., Leger, L., Fort, P., 2007. Paradoxical (REM) sleep genesis: The switch from an aminergic–cholinergic to a GABAergic–glutamatergic hypothesis. *Journal of Physiology-Paris, Brain Clocks and Rhythms* 100, 271–283.
107. Malinow, R., Tsien, R.W., 1990. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346, 177–180.
108. Maloney, K.J., Mainville, L., Jones, B.E., 1999. Differential c-Fos Expression in Cholinergic, Monoaminergic, and GABAergic Cell Groups of the Pontomesencephalic Tegmentum after Paradoxical Sleep Deprivation and Recovery. *J. Neurosci.* 19, 3057–3072.
109. Manabe, T., Wyllie, D.J., Perkel, D.J., 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, 1451–1459.
110. Mansvelder, H.D., Mertz, M., Role, L.W., 2009. Nicotinic modulation of synaptic transmission and plasticity in cortico-limbic circuits. *Seminars in Cell & Developmental Biology, The Molecular and Cellular Mechanisms in the Development of Addiction* 20, 432–440.
111. Marchi, M., Grilli, M., 2010. Presynaptic nicotinic receptors modulating neurotransmitter release in the Central Nervous System: Functional interactions with other coexisting receptors. *Progress in Neurobiology* 92, 105–111.
112. Markram, H., Pikus, D., Gupta, A., Tsodyks, M., 1998. Potential for multiple mechanisms, phenomena and algorithms for synaptic plasticity at single synapses. *Neuropharmacology* 37, 489–500.
113. Marks, G.A., Sachs, O.W., Birabil, C.G., 2008. Blockade of GABA, type A, receptors in the rat pontine reticular formation induces rapid eye movement sleep that is dependent upon the cholinergic system. *Neuroscience* 156, 1–10.
114. McCarley, R.W., 2007. Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Medicine* 8, 302–330.
115. McCarley, R.W., 2004. Mechanisms and models of REM sleep control. *Archives Italiennes de Biologie* 142, 429–467.
116. McCarley, R.W., Hobson, J.A., 1975. Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* 189, 58–60. <https://doi.org/10.1126/science.1135627>
117. McDougall, S.J., Bailey, T.W., Mendelowitz, D., Andresen, M.C., 2008. Propofol enhances both tonic and phasic inhibitory currents in second-order neurons of the solitary tract nucleus (NTS). *Neuropharmacology* 54, 552–563.
118. McGehee, D.S., Heath, M.J., Gelber, S., Devay, P., Role, L.W., 1995. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 269, 1692–1696.
119. McNaughton, N.C., Bleakman, D., Randall, A.D., 1998. Electrophysiological characterisation of the human N-type Ca^{2+} channel II: activation and inactivation by physiological patterns of activity. *Neuropharmacology* 37, 67–81.
120. Melzer, S., Michael, M., Caputi, A., Eliava, M., Fuchs, E.C., Whittington, M.A., Monyer, H., 2012. Long-Range-Projecting GABAergic Neurons Modulate Inhibition in Hippocampus and Entorhinal Cortex. *Science* 335, 1506–1510.
121. Metherate, R., Ashe, J.H., 1994. Facilitation of an NMDA receptor-mediated EPSP by paired-pulse stimulation in rat neocortex via depression of GABAergic IPSPs. *The Journal of Physiology* 481, 331–348.
122. Mitani, A., Ito, K., Hallanger, A.E., Wainer, B.H., Kataoka, K., McCarley, R.W., 1988. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Brain Research* 451, 397–402.
123. Mody, I., Pearce, R.A., 2004. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABAA receptors. *Trends in Neurosciences* 27, 569–575.
124. Mukunda, C.L., Narayanan, R., 2017. Degeneracy in the regulation of short-term plasticity and synaptic filtering by presynaptic mechanisms. *The Journal of Physiology* 595, 2611–2637.
125. Núñez, A., Buño, W., Reinoso-Suárez, F., 1998. Neurotransmitter actions on oral pontine tegmental neurons of the rat: an in vitro study. *Brain Research* 804, 144–148.
126. Núñez, A., De la Roza, C., Rodrigo-Angulo, M.L., Buño, W., Reinoso-Suárez, F., 1997. Electrophysiological properties and cholinergic responses of rat ventral oral pontine reticular neurons in vitro. *Brain Research* 754, 1–11.
127. Núñez, A., Rodrigo-Angulo, M.L., De Andrés, I., Reinoso-Suárez, F., 2002. Firing activity and

- postsynaptic properties of morphologically identified neurons of ventral oral pontine reticular nucleus. *Neuroscience* 115, 1165–1175.
128. Nusser, Z., Naylor, D., Mody, I., 2001. Synapse-Specific Contribution of the Variation of Transmitter Concentration to the Decay of Inhibitory Postsynaptic Currents. *Biophysical Journal* 80, 1251–1261.
 129. Pace-Schott, E.F., Hobson, J.A., 2002. The Neurobiology of Sleep: Genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci* 3, 591–605.
 130. Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
 131. Pedroarena, C.M., Schwarz, C., 2003. Efficacy and Short-Term Plasticity at GABAergic Synapses Between Purkinje and Cerebellar Nuclei Neurons. *Journal of Neurophysiology* 89, 704–715.
 132. Peever, J., Fuller, P.M., 2017. The Biology of REM Sleep. *Current Biology* 27, R1237–R1248.
 133. Picciotto, M.R., Higley, M.J., Mineur, Y.S., 2012. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* 76, 116–129.
 134. Pino, E., Kunizawa, H., Yamuy, J., Borde, M., 2017. Modelo in vitro para el estudio del papel de la unión mesopontina en la generación del sueño de movimientos oculares rápidos y la vigilia. *Anales de la Facultad de Medicina (AnFaMed)*.
 135. Poleg-Polsky, A., Diamond, J.S., 2011. Imperfect Space Clamp Permits Electrotonic Interactions between Inhibitory and Excitatory Synaptic Conductances, Distorting Voltage Clamp Recordings. *PLOS ONE* 6, 1–11.
 136. Pollock, M.S., Mistlberger, R.E., 2003. Rapid Eye Movement Sleep induction by microinjection of the GABA-A antagonist bicuculline into the dorsal subcoeruleus area of the rat. *Brain Research* 962, 68–77.
 137. Raastad, M., 1995. Extracellular Activation of Unitary Excitatory Synapses Between Hippocampal CA3 and CA1 Pyramidal Cells. *European Journal of Neuroscience* 7, 1882–1888.
 138. Raastad, M., Storm, J.F., Andersen, P., 1992. Putative Single Quantum and Single Fibre Excitatory Postsynaptic Currents Show Similar Amplitude Range and Variability in Rat Hippocampal Slices. *European Journal of Neuroscience* 4, 113–117.
 139. Reinoso-Suárez, F., de Andrés, I., Rodrigo-Angulo, M.L., Garzón, M., 2001. Brain structures and mechanisms involved in the generation of REM sleep. *Sleep Medicine Reviews* 5, 63–77.
 140. Richter, D.W., Pierrefiche, O., Lalley, P.M., Polder, H.R., 1996. Voltage-clamp analysis of neurons within deep layers of the brain. *Journal of Neuroscience Methods* 67, 121–131.
 141. Rinzel, J., Rall, W., 1974. Transient Response in a Dendritic Neuron Model for Current Injected at One Branch. *Biophysical Journal* 14, 759–790.
 142. Rose, H.J., Metherate, R., 2005. Auditory Thalamocortical Transmission Is Reliable and Temporally Precise. *Journal of Neurophysiology* 94, 2019–2030. <https://doi.org/10.1152/jn.00860.2004>
 143. Rosenmund, C., Stevens, C.F., 1996. Definition of the Readily Releasable Pool of Vesicles at Hippocampal Synapses. *Neuron* 16, 1197–1207.
 144. Rover, M.D., Lodder, J.C., Kits, K.S., Schoffelman, A.N.M., Brussaard, A.B., 2002. Cholinergic modulation of nucleus accumbens medium spiny neurons. *European Journal of Neuroscience* 16, 2279–2290.
 145. Sakai, K., Crochet, S., Onoe, H., 2001. Pontine structures and mechanisms involved in the generation of paradoxical (REM) sleep. *Archives italiennes de biologie* 139, 93–107.
 146. Sakurai, A., Katz, P.S., 2009. State-, Timing-, and Pattern-Dependent Neuromodulation of Synaptic Strength by a Serotonergic Interneuron. *J. Neurosci.* 29, 268–279.
 147. Sanford, L.D., Cheng, C.S., Silvestri, A.J., Tang, X., Mann, G.L., Ross, R.J., Morrison, A.R., 2001. Sleep and Behavior in Rats With Pontine Lesions Producing REM Without Atonia. *Sleep Research Online*, 4 (1), 1–5.
 148. Sanford, L.D., Tang, X., Xiao, J., Ross, R.J., Morrison, A.R., 2003. GABAergic Regulation of REM Sleep in Reticularis Pontis Oral and Caudalis in Rats. *Journal of Neurophysiology* 90, 938–945.
 149. Saper, C.B., Fuller, P.M., 2017. Wake-sleep circuitry: an overview. *Current Opinion in Neurobiology*, *Neurobiology of Sleep* 44, 186–192.
 150. Sapin, E., Lapray, D., Bérod, A., Goutagny, R., Léger, L., Ravassard, P., Clément, O., Hanriot, L., Fort, P., Luppi, P.-H., 2009. Localization of the Brainstem GABAergic Neurons Controlling Paradoxical (REM) Sleep. *PLOS ONE* 4, e4272.
 151. Scammell, T.E., Arrigoni, E., Lipton, J.O., 2017. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron* 93, 747–765.
 152. Schlapfer, W.T., Tremblay, J.P., Woodson, P.B.J., Barondes, S.H., 1976. Frequency facilitation and post-tetanic potentiation of a unitary synaptic potential in *Aplysia californica* are limited by different processes.
 153. Schulz, P.E., Cook, E.P., Johnston, D., 1994. Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation. *J. Neurosci.* 14, 5325–5337.
 154. Semba, K., Reiner, P.B., Fibiger, H.C., 1990. Single cholinergic mesopontine tegmental neurons project to both the pontine reticular formation and the thalamus in the rat. *Neuroscience* 38, 643–654.
 155. Shen, J., Yakel, J.L., 2009. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacologica Sinica* 30, 673–680.
 156. Shiromani, P.J., Armstrong, D.M., Gillin, J.C., 1988. Cholinergic neurons from the dorsolateral pons project to the medial pons: A WGA-HRP and choline acetyltransferase immunohistochemical study. *Neuroscience Letters* 95, 19–23.
 157. Shiromani, P.J., Fishbein, W., 1986. Continuous pontine cholinergic microinfusion via mini-pump induces sustained alterations in rapid eye movement (REM) sleep. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 25, 1253–1261.
 158. Siegel, J.M., 1995. Phylogeny and the function of REM sleep. *Behavioural Brain Research* 69, 29–34.
 159. Silver, R.A., 2003. Estimation of nonuniform quantal parameters with multiple-probability fluctuation analysis: theory, application and limitations. *Journal of Neuroscience Methods*, *Adapting Quantal Analysis to Central Synapses* 130, 127–141.
 160. Steriade, M., Datta, S., Pare, D., Oakson, G., Dossi, R.C., 1990. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J. Neurosci.* 10, 2541–2559.

161. Stevens, C.F., Wang, Y., 1995. Facilitation and depression at single central synapses. *Neuron* 14, 795–802.
162. Stone, E., Haario, H., Lawrence, J.J., 2014. A kinetic model for the frequency dependence of cholinergic modulation at hippocampal GABAergic synapses. *Mathematical Biosciences* 258, 162–175.
163. Storm, J.F., 1990. Chapter 12 Potassium currents in hippocampal pyramidal cells, in: J. Storm-Mathisen, J.Z. and O.P.O. (Ed.), *Progress in Brain Research, Understanding the Brain Through the Hippocampus the Hippocampal Region as a Model for Studying Brain Structure and Function*. Elsevier, pp. 161–187.
164. Thomson, A.M., 2003. Presynaptic Frequency- and Pattern-Dependent Filtering. *J Comput Neurosci* 15, 159–202.
165. Thomson, A.M., 2000. Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends in Neurosciences* 23, 305–312.
166. Thomson, A.M., Bannister, A.P., 1999. Release-independent depression at pyramidal inputs onto specific cell targets: dual recordings in slices of rat cortex. *The Journal of physiology* 519 Pt 1, 57–70.
167. Thomson, A.M., West, D.C., Hahn, J., Deuchars, J., 1996. Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex. *The Journal of Physiology* 496, 81–102.
168. Threlfell, S., Clements, M.A., Khodai, T., Pienaar, I.S., Exley, R., Wess, J., Cragg, S.J., 2010. Striatal Muscarinic Receptors Promote Activity Dependence of Dopamine Transmission via Distinct Receptor Subtypes on Cholinergic Interneurons in Ventral versus Dorsal Striatum. *J. Neurosci.* 30, 3398–3408.
169. Threlfell, S., Cragg, S.J., 2011. Dopamine Signaling in Dorsal Versus Ventral Striatum: The Dynamic Role of Cholinergic Interneurons. *Front Syst Neurosci* 5.
170. Torterolo, P., Sampogna, S., Chase, M.H., 2009. MChergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain Research* 1268, 76–87.
171. Torterolo, P., Yamuy, J., Sampogna, S., Morales, F.R., Chase, M.H., 2001. GABAergic neurons of the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei of the cat express c-fos during carbachol-induced active sleep. *Brain Research* 892, 309–319.
172. Tsodyks, M., Pawelzik, K., Markram, H., 1998. Neural Networks with Dynamic Synapses. *Neural Computation* 10, 821–835.
173. Turecek, J., Jackman, S.L., Regehr, W.G., 2016. Synaptic Specializations Support Frequency-Independent Purkinje Cell Output from the Cerebellar Cortex. *Cell Reports* 17, 3256–3268.
174. Turner, T.J., 2004. Nicotine Enhancement of Dopamine Release by a Calcium-Dependent Increase in the Size of the Readily Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *J. Neurosci.* 24, 11328–11336.
175. Vanini, G., Wathen, B.L., Lydic, R., Baghdoyan, H.A., 2011. Endogenous GABA Levels in the Pontine Reticular Formation Are Greater during Wakefulness than during Rapid Eye Movement Sleep. *J. Neurosci.* 31, 2649–2656.
176. Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J.S., Jouvet, M., 1989. Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol* 127, 133–164.
177. Varela, J.A., Sen, K., Gibson, J., Fost, J., Abbott, L.F., Nelson, S.B., 1997. A quantitative description of short-term plasticity at excitatory synapses in layer 2/3 of rat primary visual cortex. *J. Neurosci.* 17, 7926–7940.
178. Vazquez, J., Baghdoyan, H.A., 2004. GABAA Receptors Inhibit Acetylcholine Release in Cat Pontine Reticular Formation: Implications for REM Sleep Regulation. *Journal of Neurophysiology* 92, 2198–2206.
179. Velazquez-Moctezuma, J., Gillin, J.C., Shiromani, P.J., 1989. Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Research* 503, 128–131.
180. Wahl, L.M., Stratford, K.J., Larkman, A.U., Jack, J.J.B., 1995. The Variance of Successive Peaks in Synaptic Amplitude Histograms: Effects of Inter-Site Differences in Quantal Size. *Proceedings: Biological Sciences* 262, 77–85.
181. Walmsley, B., Edwards, F.R., Tracey, D.J., 1988. Nonuniform release probabilities underlie quantal synaptic transmission at a mammalian excitatory central synapse. *Journal of Neurophysiology* 60, 889–908.
182. Wang, H.-L., Morales, M., 2009. Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *European Journal of Neuroscience* 29, 340–358.
183. Weber, F., Do, J.P.H., Chung, S., Beier, K.T., Bikov, M., Doost, M.S., Dan, Y., 2018. Regulation of REM and Non-REM Sleep by Periaqueductal GABAergic Neurons. *Nature Communications* 9, 354.
184. Webster, H.H., Jones, B.E., 1988. Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Research* 458, 285–302.
185. Weng, F.J., Williams, R.H., Hawryluk, J.M., Lu, J., Scammell, T.E., Saper, C.B., Arrigoni, E., 2014. Carbachol excites sublaterodorsal nucleus neurons projecting to the spinal cord. *The Journal of Physiology* 592, 1601–1617.
186. Williams, S., Johnston, D., 1990. Muscarinic depression of synaptic transmission at the hippocampal mossy fiber synapse. *Journal of Neurophysiology* 64, 1089–1097.
187. Wonnacott, S., 1997. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends in Neurosciences* 20, 92–98.
188. Xi, M.-C., Morales, F.R., Chase, M.H., 2004. Interactions between GABAergic and Cholinergic Processes in the Nucleus Pontis Oralis: Neuronal Mechanisms Controlling Active (Rapid Eye Movement) Sleep and Wakefulness. *J. Neurosci.* 24, 10670–10678.
189. Xi, M.C., Morales, F.R., Chase, M.H., 2001. Induction of wakefulness and inhibition of active (REM) sleep by GABAergic processes in the nucleus pontis oralis. *Archives Italiennes de Biologie* 139, 125–145.
190. Xi, M.-C., Morales, F.R., Chase, M.H., 1999. Evidence That Wakefulness and REM Sleep Are Controlled by a GABAergic Pontine Mechanism. *Journal of Neurophysiology* 82, 2015–2019.
191. Yamasaki, M., Matsui, M., Watanabe, M., 2010. Preferential Localization of Muscarinic M1 Receptor on Dendritic Shaft and Spine of Cortical Pyramidal Cells and Its Anatomical Evidence for Volume Transmission. *J. Neurosci.* 30, 4408–4418.

192. Yasui, T., Fujisawa, S., Tsukamoto, M., Matsuki, N., Ikegaya, Y., 2005. Dynamic synapses as archives of synaptic history: state-dependent redistribution of synaptic efficacy in the rat hippocampal CA1. *The Journal of Physiology* 566, 143–160.
193. Zhang, L., Warren, R.A., 2002. Muscarinic and Nicotinic Presynaptic Modulation of EPSCs in the Nucleus Accumbens During Postnatal Development. *Journal of Neurophysiology* 88, 3315–3330.
194. Zhao, S., Sheibanie, A.F., Oh, M., Rabbah, P., Nadim, F., 2011. Peptide Neuromodulation of Synaptic Dynamics in an Oscillatory Network. *J. Neurosci.* 31, 13991–14004.
195. Zucker, R.S., 1989. Short-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Neuroscience* 12, 13–31.
196. Zucker, R.S., 1973. Changes in the statistics of transmitter release during facilitation. *The Journal of Physiology* 229, 787–810.
197. Zucker, R.S., Regehr, W.G., 2002. Short-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Physiology* 64, 355–405.

...