

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Potenciación de la transmisión sináptica por receptores
acoplados a proteínas G y su alteración en un modelo del
Síndrome del X Frágil**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Samuel Suárez Pinilla

DIRECTOR

Ricardo Martín Herranz

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA



**Potenciación de la transmisión sináptica
por receptores acoplados a proteínas G y
sus alteraciones en un modelo del
Síndrome del X Frágil**

Tesis Doctoral

Alberto Samuel Suárez Pinilla

Director:

Ricardo Martín Herranz

ÍNDICE:

Resumen.....	1
Summary	7
1.Introducción.....	13
1.1. Transmisión sináptica.....	13
1.1.1. Maquinaria Exocitótica.....	14
1.1.1.1 Proteínas SNARE.....	15
1.1.1.2 Munc18-1	16
1.1.1.3 Sinaptotagminas.....	16
1.1.1.4 Complexinas	17
1.1.2. Proteínas de la ZA.....	17
1.1.2.1 RIM	18
1.1.2.2 Munc13	19
1.1.2.3 Rab.....	20
1.1.2.4 RIM-BP.....	21
1.1.2.5 Piccolo y Basoon.....	21
1.1.3. Canales de Ca ²⁺ activados por voltaje	22
1.1.4. Receptores metabotrópicos.....	23
1.1.4.1 Receptores Beta-adrenérgicos (β-ARs)	24
Estructura, isoformas y localización.....	24
Mecanismo de acción.....	25
Farmacología.....	27
1.1.4.2 Receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu).....	27
1.1.4.3 mGlu del grupo III (mGlu4/6/7/8): receptores mGlu7	28
Isoformas y localización	29
Mecanismo de acción del receptor mGlu7	32
Interacciones con otras proteínas.....	35
Farmacología.....	36
1.2. Mecanismos presinápticos de Plasticidad.....	37
1.2.1. Plasticidad mediada por cAMP.....	40
1.2.2. Mecanismos de plasticidad sináptica mediados por β-ARs	43
1.2.3. Mecanismos de plasticidad sináptica mediados por Munc13	45
1.2.4. Mecanismos de plasticidad sináptica mediados por mGlu7	49
1.3. Síndrome del X Frágil.....	51
2.Objetivos	59

3. Materiales y Métodos	63
3.1. Materiales	63
3.1.1. Material biológico	63
3.1.2. Reactivos y aparatos.....	64
3.2. Métodos	67
3.2.1. Electrofisiología	67
3.2.1.1 Obtención de rodajas cerebrales <i>ex vivo</i>	69
3.2.1.2 Registros de transmisión sináptica mediante <i>patch clamp</i> en configuración <i>whole-cell</i>	69
3.2.1.3 Determinación del origen presináptico de los fenómenos de plasticidad sináptica	71
3.2.1.4 Protocolos de inducción de los fenómenos de plasticidad sináptica.....	72
3.2.1.5 Medida del tamaño de la RRP	73
3.2.1.6 Análisis de los EPSCs asincrónicos (aEPSCs)	73
3.2.2. Preparación de sinaptosomas	73
3.2.2.1 Liberación espontánea de glutamato.....	75
3.2.2.2 Determinación de los niveles de AMPc.....	76
3.2.2.3 Determinación de la concentración de calcio citosólica.	78
3.2.2.4 Inmuncitofluorescencia.....	78
3.2.3. Western Blot	79
3.2.4. Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	80
3.2.5. Microscopía Inmunoeléctronica.....	83
3.2.6. Genotipado.....	84
3.2.7. Aplicación de fármacos en experimentos “in vivo”	87
3.2.8. Rotarod.....	87
3.2.9. Paso elevado	88
3.2.10. Test de motricidad fina	88
3.2.11. Preparación de los animales para experimentos de registros crónicos (condicionamiento clásico y reflejo vestíbulo-ocular).	89
3.2.12. Condicionamiento clásico de parpadeo.....	89
3.2.13. Estimulación vestibular y registro del reflejo vestíbulo-ocular (VOR)	90
3.2.14. Pruebas de interacción social.....	90
3.2.15. Diseño experimental y análisis estadístico.....	91
4. Resultados	97
4.1. La señalización por el receptor β_1 -Adrenérgico/Epac2 aumenta el número de vesículas competentes para la exocitosis (RRP) y es necesaria para la LTP de las fibras paralelas	97

4.1.1.	La NA y el isoproterenol potencian la transmisión sináptica en las sinapsis PF-PC mediante un mecanismo presináptico dependiente de β_1 -AR	99
4.1.2.	Localización subcelular del receptor β_1 -adrenérgico en los compartimentos presinápticos del cerebelo	103
4.1.3.	La potenciación de la transmisión sináptica mediada por isoproterenol en las sinapsis PF-PC es dependiente de la proteína Epac y no de PKA.....	107
4.1.4.	Isoproterenol y 8pCPT aumentan la frecuencia pero no la amplitud de los eventos de liberación asincrónicos	111
4.1.5.	β_1 -AR y Epac son necesarios para la PF-PC LTP	115
4.1.6.	Los ratones <i>Epac2^{-/-}</i> mostraron una ausencia tanto de la PF-PC LTP como del incremento de la RRP y del número de vesículas en contacto con la membrana de la ZA asociados a esta plasticidad	120
4.1.7.	PF-PC LTP está asociada con un aumento en el tamaño de la RRP que no ocurre en las rodajas de ratones <i>Epac2^{-/-}</i>	125
4.2.	La activación de mGlu4 rescata la transmisión sináptica, la PF-PC LTP y el aprendizaje motor y el social en un modelo de ratón del Síndrome del X frágil.....	127
4.2.1.	Las sinapsis <i>Fmr1KO</i> tienen más VSs ancladas a la membrana de la ZA que las WT y no son sensibles al isoproterenol.....	127
4.2.2.	La pérdida de FMRP aumenta la frecuencia de aEPSCs y previene la potenciación inducida por isoproterenol a pesar de una expresión normal de β -ARs y de la generación de cAMP	130
4.2.3.	La PF-PC LTP no ocurre en las sinapsis <i>Fmr1KO</i>	135
4.2.4.	La disminución del Ca^{2+} extracelular reduce la liberación asincrónica y rescata la PF-PC LTP en las rodajas de ratones <i>Fmr1KO</i>	138
4.2.5.	El PAM de mGlu4 VU0155041 rescata la PF-PC LTP de ratones <i>Fmr1KO</i>	140
4.2.6.	VU 0155041 mejora los déficits en el aprendizaje motor y en el comportamiento social en el ratón <i>Fmr1KO</i>	146
4.3.	Modulación bidireccional de la transmisión sináptica inhibitoria por el receptor mGlu7 en las neuronas piramidales de CA1.....	154
4.3.1.	La modulación bidireccional inducida por L-AP4 no es bloqueada por antagonistas de los receptores AMPA y NMDA	157
4.3.2.	La respuesta de inhibición mediada por L-AP4 es suprimida por el inhibidor de proteínas $G_{i/o}$ toxina <i>pertussis</i> y la respuesta de potenciación por el bloqueante de la unión de DAG calfostina C.....	158
4.3.3.	El tratamiento con L-AP4 aumenta la frecuencia pero no la amplitud de los IPSCs en ratones WT pero no en ratones <i>mGlu7^{-/-}</i>	160
4.3.4.	El tratamiento con L-AP4 aumenta el número de VSs en contacto con la membrana de la ZA en sinapsis simétricas axo-somáticas en la capa piramidal de CA1, esta respuesta no se da en ratones <i>mGlu7^{-/-}</i>	162

4.3.5. La estimulación a alta frecuencia de las Colaterales de Schaffer induce una modulación bidireccional de la transmisión sináptica inhibitoria dependiente de mGlu7	164
5. Discusión	171
5.1. Los β_1 -ARs de las PF potencian la liberación de NT mediante un incremento del tamaño de la RRP y de la probabilidad de liberación mediado por Epac2, que es necesario para la PF-PC LTP	171
5.1.1. La activación de β_1 -ARs es necesaria para la PF-PC LTP	171
5.1.2. La PF-PC LTP depende de la activación de Epac2 en las PF	173
5.1.3. La PF-PC LTP se asocia a un incremento del número de VSs ancladas a la ZA, del tamaño de la RRP y de la probabilidad de liberación, probablemente mediados por proteínas Munc13	174
5.2. Un PAM de mGlu4 rescata la PF-LTP, así como los déficits de aprendizaje motor y comportamiento social en un modelo de ratón del Síndrome del X Frágil	181
5.2.1. La pérdida de la PF-PC LTP de los ratones <i>Fmr1KO</i> es consecuencia de un incremento constitutivo de la liberación	181
5.2.2. El incremento de las VSs ancladas a la ZA y de la RRP de las sinapsis PF-PC <i>Fmr1KO</i> se debe a un exceso de Ca^{2+} sináptico y, probablemente, a una sobreactivación de proteínas Munc13	182
5.2.3. La reducción del Ca^{2+} sináptico por activación de mGlu4 revierte el incremento de VSs ancladas y RRP rescatando la PF-PC LTP en los ratones <i>Fmr1KO</i>	185
5.2.4. La activación de mGlu4 mejora los déficits de aprendizaje motor de los ratones <i>Fmr1KO</i>	186
5.2.5. El rescate de la PF-PC LTP por VU0155041 mejora las habilidades sociales de los ratones <i>Fmr1KO</i>	189
5.3. El receptor mGlu7 modula de manera bidireccional la transmisión sináptica inhibitoria en las sinapsis SC-CA1	193
5.3.1. Papel antiepiléptico de mGlu7	193
5.3.2. La modulación dual de la transmisión sináptica GABAérgica por mGlu7 presenta mecanismos de señalización similares a la modulación de la transmisión sináptica excitadora	194
5.3.3. La activación fisiológica del receptor mGlu7 por estimulaciones de alta frecuencia de las colaterales de Schaffer potencia la liberación de GABA en las aferencias de las neuronas piramidales CA1	196
5.3.4. La potenciación de la transmisión GABAérgica sobre células piramidales de CA1 probablemente se deba a mGlu7 localizados en sinapsis PV-CA1	197
6. Conclusiones	203
7. Bibliografía	207

Índice de tablas, esquemas, figuras y cajas:

Introducción

Esquema 1. La zona activa.	22
Esquema 2. Señalización de los receptores β -adrenérgicos en la potenciación de la liberación de glutamato.	26
Esquema 3. Receptores metabotrópicos de glutamato 7.	34
Esquema 4. Estructura de la proteína Munc13.	46

Materiales y Métodos

Tabla 1. Reactivos y materiales.	64
Tabla 2. Fármacos.	65
Tabla 3. Medios.	66
Esquema 5. Electrofisiología en rodajas de cerebelo.	70
Esquema 6. Electrofisiología en rodajas de hipocampo.	72
Esquema 7. Pasos de la preparación de microscopía electrónica de transmisión.	82

Resultados

Caja 1. Cerebelo.	98
Figura 1. La noradrenalina potencia la transmisión en las sinapsis PF-PC.	100
Figura 2. El isoproterenol potencia la transmisión sináptica en la sinapsis PF-PC mediante la activación de β_1 -ARs presinápticos.	102
Figura 3. Localización subcelular de los receptores β_1 -AR en los compartimentos presinápticos del cerebelo.	104
Caja 2. EPAC.	105
Figura 4. La potenciación de la transmisión en las sinapsis PF-PC por isoproterenol depende de la activación de Epac pero no de PKA.	108
Caja 3. Liberación de NTs: sincrónica, asincrónica y espontánea.	109
Figura 5. El isoproterenol incrementa la frecuencia pero no la amplitud de los eventos de liberación asincrónicos.	111
Figura 6. El 8pCPT incrementa la frecuencia pero no la amplitud de los eventos de liberación asincrónicos.	112
Figura 7. Efecto del isoproterenol y 8pCPT en la cinética de los sEPSCs en presencia de Sr^{2+} y de Ca^{2+}	113
Caja 4. La sinapsis PF-PC.	114
Figura 8. Los receptores β_1 -ARs son necesarios para la PF-PC LTP.	116
Figura 9. La activación de Epac2 es necesaria para la PF-PC LTP.	117
Figura 10. El tratamiento con isoproterenol o 8pCPT ocluye la potenciación inducida por 10 Hz.	118

Caja 5. Complejos SNARE parcial y totalmente ensamblados.....	119
Figura 11. Ausencia de PF-PC LTP en las rodajas de ratones <i>Epac2^{-/-}</i>	121
Figura 12. Las rodajas de ratones <i>Epac2^{-/-}</i> no muestran cambios en la frecuencia de los aEPSCs tras la inducción de PF-PC LTP.	122
Figura 14. La PF-PC LTP está asociada con un incremento de la RRP, que no ocurre en los ratones <i>Epac2^{-/-}</i>	126
Figura 15. Las sinapsis PF-PC de ratones <i>Fmr1KO</i> presentan un mayor número de VSs ancladas y no aumentan en respuesta al isoproterenol.....	129
Figura 16. Las sinapsis <i>Fmr1KO</i> presentan un aumento en la frecuencia de aEPSCs y una ausencia de la potenciación inducida por isoproterenol.....	131
Figura 17. Ausencia de potenciación de la liberación de glutamato inducida por isoproterenol en los sinaptosomas cerebelares <i>Fmr1KO</i>	132
Figura 18. La expresión de β_1 -AR y la generación de cAMP no están alterados en los sinaptosomas cerebelares de ratones <i>Fmr1KO</i>	134
Figura 19. Cambios en la PPR y en la eficacia sináptica en rodajas de ratones <i>Fmr1KO</i>	135
Figura 20. Las sinapsis PF-PC de ratones <i>Fmr1KO</i> tienen un tamaño de la RRP aumentado y no desarrollan la LTP en respuesta a una estimulación de 10 Hz.	137
Figura 21. La reducción del Ca^{2+} extracelular rescata la potenciación inducida por isoproterenol en las rodajas <i>Fmr1KO</i>	138
Figura 22. La LTP de las PF se reestablece en las rodajas <i>Fmr1KO</i> en presencia de 1 mM de Ca^{2+} , pero se pierde en las rodajas WT.....	139
Figura 23. La activación de mGlu4 rescata la PF-PC LTP en las rodajas de ratones <i>Fmr1KO</i>	141
Figura 24. La aplicación de VU 0155041 restaura las dinámicas de Ca^{2+} en sinaptosomas cerebelares de <i>Fmr1KO</i>	143
Figura 25. La administración de VU 0155041 in vivo restaura la PF-PC LTP.	144
Caja 5. Cerebelo y TEA.....	145
Figura 27. VU 155041 atenúa los déficits en la prueba de motricidad fina en ratones <i>Fmr1KO</i>	148
Figura 26. Los ratones <i>Fmr1KO</i> no presentan déficits en la coordinación motora en las pruebas de Rotarod y de paso elevado.....	148
Figura 28. VU 155041 atenúa los déficits en el aprendizaje de condicionamiento clásico de parpadeo en ratones <i>Fmr1 KO</i>	150
Figura 29. El tratamiento con VU 0155041 atenúa los déficits en el VOR en los ratones <i>Fmr1KO</i>	152
Figura 30. El tratamiento con VU 0155041 atenúa los déficits sociales en los ratones <i>Fmr1KO</i>	153
Caja 7. El hipocampo.....	154
Figura 31. L-AP4 a alta concentración produce una modulación bidireccional de la transmisión sináptica inhibitoria.	156

Figura 32. La modulación bidireccional inducida por L-AP4 no se afecta por CNQX ni D-AP5.	158
Figura 33. La inhibición de la transmisión sináptica GABAérgica mediada por L-AP4 fue suprimida por la toxina pertussis, mientras que la potenciación fue bloqueada por calfostina C.	159
Figura 34. La aplicación de L-AP4 aumenta la frecuencia pero no la amplitud de los mIPSCs en ratones WT pero no en sus hermanos <i>mGlu7^{-/-}</i> .	161
Figura 35. L-AP4 (500 μ M, 10 min) aumenta el número de VSs ancladas a la membrana de la ZA en sinapsis simétricas de ratones WT pero no en <i>mGlu7^{-/-}</i> .	163
Figura 36. La estimulación de alta frecuencia de las colaterales de Schaffer induce una modulación bidireccional sensible a MSOP y a calfostina C.	165
Figura 37. La estimulación de alta frecuencia de las colaterales de Schaffer no induce una modulación de la transmisión sináptica en los ratones <i>mGlu7^{-/-}</i> .	166
<u>Discusión</u>	
Esquema 7. Modulación propuesta para el receptor β -adrenérgico en las sinapsis PF-PC.	180
Esquema 8. El aumento en la entrada de Ca^{2+} ocluye los mecanismos de modulación de la maquinaria excitotóxica e impide la LTP presináptica en los terminales <i>Fmr1KO</i> .	184
Esquema 9. La activación de mGlu4 en los terminales de ratones <i>Fmr1KO</i> disminuye la entrada de Ca^{2+} hasta los niveles encontrados en terminales de ratones WT, restaurando así los niveles basales de liberación de NT y la PF-PC LTP.	186
Esquema 10. Modulación propuesta para el receptor mGlu7 en las aferencias inhibitoras sobre neuronas piramidales de CA1 del hipocampo.	197

Abreviaturas

ADA	adenosina desaminasa
β -AR	receptor beta-adrenérgico
BSA	albúmina sérica bovina
CA	<i>Cornus Ammonis</i>
cAMP	AMP cíclico
CaM	calmodulina
CAST	proteína estructural asociada a la citomatriz de la zona activa
CV	coeficiente de variación
EAAT	transportador de aminoácidos excitadores
EC	estímulo condicionado
ECD	dominio extracelular
EI	estímulo no condicionado
Elfn	proteína extracelular con dominios de repeticiones ricas en leucina y de fibronectina 1
FRET	transferencia de energía de resonancia
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	glutamato descarboxilasa
GAP	proteína activadora de la GTPasa
GAT	transportador de GABA
GDH	glutamato deshidrogenasa
GEF	factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GPCR	receptor acoplado a proteína G
HCN	canales activados por nucleótidos cíclicos y por hiperpolarización
HD	dominio heptahélico
HFS	estimulación de alta frecuencia
IP ₃	inositol trifosfato
L-AP4	ácido DL-2-amino-4-fosfonobutírico
MET	microscopía electrónica de transmisión
MF	fibras musgosas
mGlu	receptor metabotrópico de glutamato
MSOP	(RS)- α -metilserina-O-fosfato
NAM	modulador alostérico negativo
NGS/NDS	suero normal de cabra/burro
NSF	factor sensible a N-etilmaleimida
NT	neurotransmisor
OLM	<i>Oriens-Lacunosum Moleculare</i>
OC	músculo <i>orbicularis oculi</i>
PAM	modulador alostérico positivo
PC	célula de Purkinje
PF	fibras paralelas
PFA	paraformaldehído
PICK	proteína de interacción con la proteína quinasa C
PIP ₂	fosfatidilinositol bifosfato
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PP	proteína fosfatasa
PPD	depresión por pares de pulsos
PPR	cociente de pares de pulsos
PPT	potenciación post tetánica

PTx	toxina pertussis
PV	parvalbúmina
p_{ves}	probabilidad de liberación vesicular
RC	respuesta condicionada
RIM	molécula de interacción con Rab
RRP	población de vesículas preparadas para la fusión
SC	colaterales de Schaffer
SNAP	proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida
SNAP-25	proteína de 25 kDa asociada a sinaptosomas
SNARE	receptores de proteínas solubles de unión al factor sensible a N-etilmaleimida
SNC	sistema Nervioso Central
SNP	sistema nervioso periférico
SNP	polimorfismo de nucleótido único
SSADH	semialdehído succínico deshidrogenasa
STD	depresión sináptica a corto plazo
STP	facilitación sináptica a corto plazo
STT	somatostatina
Syt	sinaptotagmina
TEA	trastorno de espectro autista
TM	dominio transmembrana
TTx	tetrodotoxina
VAMP	proteína de membrana asociada a vesículas
V-ATPasa	bomba de protones vacuolar
VFD	dominio venus atrapamoscas
VGAT	transportador de GABA vesicular
VGCC	canales de calcio dependientes de voltaje
VGLUT	transportador de glutamato vesicular
VOR	reflejo vestíbulo ocular
VS	vesícula sináptica
ZA	zona activa

Resumen

Potenciación de la transmisión sináptica por receptores acoplados a proteínas G y su alteración en un modelo del Síndrome del X Frágil

La función cerebral se basa en la transmisión eficaz de información entre neuronas mediada por la liberación de neurotransmisores (NTs). La liberación de las vesículas cargadas de NT en las sinapsis ocurre en la zona activa (ZA) de la presinapsis. Esta liberación depende de dos factores clave: la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCCs) y la presencia de una población de vesículas competentes para la fusión que se denomina RRP (del inglés *Readily Releasable Pool*). En estos procesos de habilitación funcional de las vesículas están implicadas las proteínas SNARE, que median la fusión de la membrana vesicular y la membrana de la neurona, así como otras proteínas que regulan su función, siendo de especial importancia la proteína Munc13, tanto para la fusión en sí como para su modulación por segundos mensajeros.

En la ZA presináptica hay receptores acoplados a proteínas G que modulan estos dos factores. Es el caso de los receptores β -adrenérgicos (β -ARs), que potencian la liberación de glutamato de manera dependiente de proteínas G_s que activan a la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina, Epac. Epac, a su vez, activa a PLC, aumentando la concentración de DAG y activando así a Munc13-1. Se sabe que el incremento de la liberación de NT mediado por aumento de cAMP juega un papel determinante en procesos presinápticos de plasticidad como la LTP que tiene lugar en las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (PF-PC) del cerebelo. Aunque se conoce la existencia de aferencias noradrenérgicas próximas a las sinapsis PF-PC, no está claro si la vía de señalización β -AR/cAMP/Epac está implicada en esta LTP.

En esta Tesis Doctoral demostramos la expresión de β -ARs de tipo 1 (β_1 -ARs) en terminales de las PF cercanos a varicosidades noradrenérgicas, y que su activación farmacológica o mediante un protocolo de estimulación de 10 Hz potencia la transmisión sináptica entre las PF y las PC mediante un mecanismo dependiente de Epac2. Por último, observamos que esta potenciación está implicada en la PF-PC LTP y que requiere un aumento del tamaño de la RRP y de la probabilidad de liberación de las PF. Estos resultados nos permiten concluir que los receptores β_1 -adrenérgicos potencian la transmisión sináptica entre las fibras PF y las PC mediante una vía de

Resumen

señalización dependiente de Epac2 que implica un incremento de la RRP y la probabilidad de liberación y que, dicha señalización es necesaria para la PF-PC LTP.

El síndrome del X Frágil (FXS) es la discapacidad intelectual hereditaria más común y está causado por la pérdida de expresión de la ribonucleoproteína mensajera del X Frágil (FMRP). FMRP es una proteína de unión a ARN que regula la expresión de muchas proteínas postsinápticas y presinápticas. Los pacientes con FXS y los ratones que carecen de FMRP (*Fmr1KO*) sufren déficits en el aprendizaje motor y social para los que actualmente no existe un tratamiento específico. En este trabajo hemos observado que los terminales sinápticos de las PF de los ratones *Fmr1KO* presentan de manera basal un incremento en la RRP y en la liberación de NT que impedía, tanto las modulaciones al alza de estos parámetros por el agonista de los β -ARs, como la inducción de la PF-PC LTP. La reducción de la concentración intracelular de Ca^{2+} mediante el modulador alostérico positivo del receptor metabotrópico de glutamato mGlu4, VU 0155041, restauró, tanto el tamaño de la RRP como la PF-PC LTP en estos animales. Además, la inyección intraperitoneal en ratones *Fmr1KO* de este fármaco mejoró sus déficits en pruebas que evalúan aprendizajes motores asociados a la PF-PC LTP, así como sus alteraciones del comportamiento social. Por tanto, podemos concluir que las sinapsis PF-PC de ratones *Fmr1KO* presentan un aumento de la RRP y de la probabilidad de liberación, fruto del aumento en la entrada de Ca^{2+} presináptico, que provocan un efecto techo que impide la PF-PC LTP. Y que la activación del receptor mGlu4 por VU0155041 revierte las alteraciones de la RRP y de la probabilidad de liberación de PF rescatando tanto la LTP como los déficits en el aprendizaje motor y social de los ratones *Fmr1KO* y poniendo de manifiesto el potencial traslacional de este fármaco.

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu) 7 se localizan en la ZA, donde reducen la liberación de NT mediante la inhibición de VGCCs por activación de proteínas $G_{i/o}$. También la potencian mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC) por un mecanismo dependiente de proteínas G resistentes a toxina *pertussis*, y el consecuente aumento del diacilglicerol (DAG) que modula la actividad de la proteína de la ZA Munc13, aumentando el número de vesículas en la membrana de la ZA y su probabilidad de fusión. Estas vías de señalización modulan bidireccionalmente la transmisión glutamatérgica en las sinapsis entre las colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo,

aunque, en condiciones de liberación endógena de glutamato, la respuesta que prevalece es la de la potenciación de la liberación. Esto contrasta con el papel antiepiléptico que se ha descrito para el receptor mGlu7. Aunque se sabe que el receptor también se localiza en las aferencias GABAérgicas de las neuronas piramidales de CA1, donde inhibe la liberación de GABA, se desconoce si en estas sinapsis también es capaz de potenciar la liberación de NT, lo que podría explicar el conocido rol antiepiléptico de mGlu7. En esta Tesis Doctoral se ha descrito que los receptores mGlu7 de las aferencias GABAérgicas de las neuronas piramidales de CA1 son capaces de modular bidireccionalmente la liberación de NT y que, en condiciones de liberación endógena de glutamato, la respuesta que predomina es la potenciación de la liberación de NT. Esta potenciación depende de la unión de DAG a proteínas que aumentan la RRP y la probabilidad de liberación, como Munc13. La posibilidad de que el receptor mGlu7 también potencie la liberación de GABA añade un nuevo mecanismo que permite explicar su función antiepiléptica y que debe ser tenido en cuenta a la hora de diseñar fármacos contra la epilepsia.

Summary

Potentialiation of Synaptic Transmission by G Protein-Coupled Receptors and its Alteration in a Model of Fragile X Syndrome

Brain function relies on the efficient transmission of information between neurons mediated by the release of neurotransmitters (NTs). The release of NT-loaded vesicles at synapses occurs in the active zone (AZ) of the presynapse. This release depends on two key factors: the entry of Ca^{2+} through voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs) and the presence of a population of vesicles competent for fusion, known as RRP. Proteins such as SNAREs are involved in the functional enablement of these vesicles, mediating the fusion of vesicular membrane and neuron membrane, along with other proteins that regulate their function. The protein Munc13 is of particular importance for both fusion and modulation of fusion by second messengers.

In the presynaptic AZ, G protein-coupled receptors modulate these two factors. An example is β -adrenergic receptors (β -ARs) that enhance glutamate release in a Gs protein-dependent manner, activating the guanine nucleotide exchange factor Epac. Epac, in turn, activates PLC, increasing DAG concentration and thereby activating Munc13-1. The increase in NT release mediated by cAMP plays a decisive role in presynaptic plasticity processes such as LTP in parallel fiber to Purkinje cell (PF-PC) synapses in the cerebellum. While noradrenergic afferents near PF-PC synapses have been described, it is unclear if the β -AR/cAMP/Epac signaling pathway is involved in this LTP.

In this doctoral thesis, we found the expression of β_1 -ARs in terminals of PFs near noradrenergic varicosities, and their pharmacological activation or stimulation at 10 Hz enhances synaptic transmission between PFs and PCs through an Epac2-dependent mechanism. Finally, we observe that this potentiation is involved in PF-PC LTP and requires an increase in RRP and the probability of release from PFs. These results lead us to conclude that β_1 -adrenergic receptors enhance synaptic transmission between PFs and PCs through an Epac2-dependent signaling pathway, involving an increase in RRP and release probability, and that this signaling is necessary for PF-PC LTP.

Fragile X Syndrome (FXS) is the most common hereditary intellectual disability caused by the loss of expression of the Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP).

Summary

FMRP is an RNA-binding protein that regulates the expression of many postsynaptic and presynaptic proteins. FXS patients and FMRP-deficient mice (*Fmr1KO*) exhibit deficits in motor and social learning for which there is currently no specific treatment. In this work, we observed that synaptic terminals of PFs in *Fmr1KO* mice show a basal increase in RRP and NT release, preventing both upregulation of these parameters by β -AR agonists and induction of PF-PC LTP. Reducing extracellular Ca^{2+} concentration with the positive allosteric modulator of the metabotropic glutamate receptor mGlu4, VU 0155041, restored RRP size and PF-PC LTP in these animals. Furthermore, intraperitoneal injection of this drug in *Fmr1KO* mice improved deficits in motor learning associated with PF-PC LTP, as well as social behavior abnormalities. Therefore, we conclude that PF-PC synapses in *Fmr1KO* mice exhibit an increased RRP and release probability due to increased presynaptic Ca^{2+} entry, creating a ceiling effect that prevents PF-PC LTP. Activation of the mGlu4 receptor by VU0155041 reverses RRP and PF release probability alterations, rescuing both LTP and deficits in motor and social learning in *Fmr1KO* mice, highlighting the translational potential of this drug.

Metabotropic glutamate receptors mGlu7 are located in the AZ, where they reduce NT release by inhibiting VGCCs through activation of Gi/o proteins, and enhance it by activating phospholipase C (PLC) through a Gi-resistant G protein-dependent mechanism, leading to an increase in diacylglycerol (DAG) that modulates the activity of the AZ protein Munc13, increasing the number of vesicles at the AZ membrane and their probability of fusion. These signaling pathways bidirectionally modulate glutamatergic transmission in synapses between Schaffer collaterals and CA1 hippocampal pyramidal neurons. However, under conditions of endogenous glutamate release, the prevailing response is enhanced release. This contrasts with the antiepileptic role described for the mGlu7 receptor. Although the receptor is known to be located in the GABAergic afferents of CA1 pyramidal neurons, where it inhibits GABA release, it is unknown whether it can also enhance NT release in these synapses, potentially explaining the known antiepileptic role of mGlu7. In this doctoral thesis, we describe that mGlu7 receptors in GABAergic afferents of CA1 pyramidal neurons are capable of bidirectionally modulating NT release, and under conditions of endogenous glutamate release, the prevailing response is potentiation of NT release. This potentiation depends on DAG binding to proteins that increase RRP and release probability, such as Munc13. This

Summary

regulation mechanism of release may explain the antiepileptic role of the receptor and could be useful for the future development of pharmacological therapies for epilepsy.

Introducción

1. Introducción

1.1. Transmisión sináptica

El término sinapsis fue acuñado por Sherrington a partir de las palabras griegas *syn* (*unión*) y *haptein* (*firme*) para resumir las ideas de Ramón y Cajal acerca de la conexión sin continuidad entre las neuronas (Ramón y Cajal, 1904), y se emplea para describir una zona de contacto especializada en la que una neurona se comunica con otra. Dependiendo del grado de complejidad de esta comunicación podemos distinguir entre sinapsis eléctricas y sinapsis químicas.

En las sinapsis eléctricas las neuronas están comunicadas entre sí mediante uniones de hendidura o *gap junctions*, regiones formadas por canales proteicos que unen el citoplasma de ambas células y permiten el paso de iones inorgánicos y moléculas pequeñas. El flujo de iones generado en la neurona presináptica fluye directamente por estos canales y afecta también a la neurona postsináptica. Este mecanismo de transmisión de señales es más frecuente en invertebrados, es extremadamente rápido y permite la coordinación sincrónica de grupos de neuronas interconectadas.

En las sinapsis químicas no existe una continuidad entre el citoplasma de la neurona presináptica y la postsináptica, sino que ambas están separadas por un espacio de unos 20 – 40 nm denominado brecha sináptica. En este caso, se tiene que producir una transducción de señal eléctrica a señal química y viceversa. Dicha señal química la constituye el neurotransmisor (NT), el cual es liberado por la neurona presináptica en la brecha sináptica y se une a receptores en la neurona postsináptica. La activación de estos receptores postsinápticos da lugar a la apertura o cierre de canales iónicos en la neurona postsináptica provocando cambios en el flujo de iones a través de ésta. En las sinapsis glutamatérgicas, la activación de estos receptores postsinápticos provocará su apertura y la entrada de cationes, provocando la despolarización de la neurona postsináptica. Los receptores AMPA son permeables a Na^+ y presentan unas cinéticas de apertura en una escala por debajo del milisegundo que permiten una rápida despolarización del terminal sináptico. Los receptores NMDA son permeables a Na^{2+} y a Ca^{2+} y cuando se unen a glutamato se activan más lentamente que los receptores AMPA, pero permanecen activos de decenas a centenas de milisegundos (Geiger et al., 1997). Los receptores

Introducción

de kainato son receptores ionotrópicos que, al activarse, permiten el paso de Na^+ y Ca^{2+} , pero que también son capaces de señalizar mediante vías no canónicas para los receptores ionotrópicos (Lerma & Marques, 2013). Por otro lado, en las sinapsis GABAérgicas la apertura de los receptores ionotrópicos de GABA, GABA_A , dará lugar a la entrada de aniones (Cl^- fundamentalmente) y la consiguiente hiperpolarización de la neurona postsináptica.

La neurona postsináptica integrará, temporal y espacialmente, las despolarizaciones e hiperpolarizaciones resultantes del flujo de los iones. Cuando se alcance un determinado grado de despolarización en la membrana de la neurona postsináptica, se producirá la apertura de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, lo cual provocará un aumento en el flujo de Na^+ , aumentando la despolarización y propagándola a lo largo del axón en forma de potencial de acción hasta el terminal sináptico. En el terminal sináptico, esta despolarización provocará la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCCs del inglés *Voltage-Gated Calcium Channels*), provocando un aumento en la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) que causará la exocitosis de las vesículas cargadas de neurotransmisor. Por tanto, las sinapsis químicas implican una serie de pasos que dan lugar a un retraso sináptico de milisegundos. Aunque las sinapsis químicas sean más lentas que las eléctricas, la liberación de neurotransmisor por una neurona presináptica permite la apertura de cientos de canales iónicos en la neurona postsináptica, permitiendo así la amplificación de la señal. Además, la complejidad del proceso de la transmisión sináptica química permite que haya mecanismos de modulación en cada una de las etapas, lo que constituye la base de la plasticidad sináptica, que es la base molecular y celular de la memoria y el aprendizaje. Por estas razones, la gran mayoría (aproximadamente el 99%) de las sinapsis del cerebro son de tipo químico (Greengard, 2001).

1.1.1. Maquinaria Exocitótica

La comunicación entre neuronas mediante la liberación de NT depende de la exocitosis de vesículas sinápticas (VSs). Este proceso requiere de varios pasos entre los que se encuentran la colocación de las VSs cerca de la membrana plasmática, la preparación de las VSs para su liberación y la fusión rápida de las VSs cuando el Ca^{2+} entra al terminal sináptico durante un potencial de acción (Südhof, 2013). Todas aquellas proteínas implicadas en dicho proceso de colocación, preparación y fusión

de las VSs se denominan genéricamente como proteínas de la maquinaria exocitótica.

1.1.1.1 Proteínas SNARE

Uno de los componentes principales de la maquinaria exocitótica lo constituyen el grupo de las proteínas receptores de proteínas solubles de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (SNARE del inglés “*SNAP*” *soluble NSF Attachment proteins* “*REceptor*”), que se caracterizan por un motivo de ~ 65 residuos llamado motivo SNARE que tiene gran propensión a formar estructuras *coiled-coil* (Südhof & Rothman, 2009). Estas proteínas están implicadas en la mayoría de los procesos de tráfico de membranas intracelulares y, para lograr especificidad en este proceso, se distribuyen funcionalmente en dos categorías: las v-SNARE, que se encuentran en las vesículas transportadas y las t-SNARE, que se encuentran en las membranas de destino.

Las proteínas SNARE implicadas en la transmisión sináptica se describieron como los sustratos específicos de las toxinas tetánica y botulínica, ya que se vio que el uso de estas proteasas específicas bloqueaba la transmisión sináptica (Link et al., 1993; Schiavo et al., 1993). La proteínas v-SNARE implicadas en el proceso de exocitosis de VSs serán la proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP del inglés *Vesicle-Associated Membrane Protein*) o sinaptobrevina, mientras que las t-SNARE serán la proteína de 25 kDa asociada a sinaptosomas (SNAP-25 del inglés *Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa*) y la sintaxina-1 (Söllner et al., 1993). Estas proteínas formarán el complejo heterotrimérico trans-SNARE mediante la interacción a modo de enrollamiento (como el abrochamiento de una cremallera) de las hélices de sus cuatro dominios SNARE paralelos desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. Este complejo pasará a llamarse cis-SNARE cuando este abrochamiento o ensamblaje esté completo (Hanson et al., 1997). Aunque con solamente 2 complejos SNARE se alcanza la energía suficiente para conseguir aproximar una VS a la membrana, en este proceso normalmente estarán implicados entre 3 y 15 complejos SNARE (Montecucco et al., 2005; Sinha et al., 2011). Además de mediar el acercamiento, se ha comprobado en experimentos *in vitro*, que el ensamblaje del complejo SNARE es capaz también de mediar la fusión de membranas en el rango temporal de milisegundos (Pobbati et al., 2006). Las proteínas SNARE poseen residuos, como es el caso de los residuos de triptófano de la sinaptobrevina, que

Introducción

perturban la estabilidad de las bicapas lipídicas, facilitando la fusión lipídica entre la membrana de la VS y la membrana celular (Wickner & Rizo, 2017). Sin embargo, la actividad aislada de estas proteínas no es suficiente para la fusión *in vivo*.

1.1.1.2 Munc18-1

La proteína Munc18-1 es imprescindible para todos los procesos de fusión de membranas mediante proteínas SNARE en las sinapsis. En concreto, se ha visto que en los ratones que carecen de la proteína Munc18-1 no hay liberación del neurotransmisor (Verhage et al., 2000). Cuando la syntaxina 1 está en su conformación cerrada, su dominio H_{abc} bloquea el dominio SNARE, impidiendo la interacción de las otras proteínas SNARE. Munc18-1 se unirá a este dominio, por un lado haciendo las funciones de chaperona al estabilizar ambas proteínas en la membrana y, por otro lado, previniendo la formación de complejos syntaxina-1 incorrectos (Medine et al., 2007; Misura et al., 2000; Rickman et al., 2007). Tras la apertura de la syntaxina-1, Munc18-1 se unirá de nuevo a esta, pero en la región NDR del extremo N terminal, (Hu et al., 2007) participando en el proceso de fusión de las membranas y aportando estabilidad al complejo SNARE (Stepien et al., 2019; Zhou et al., 2013).

1.1.1.3 Sinaptotagminas

Al contrario de lo que ocurre en la fusión de membranas en otros compartimentos celulares, la exocitosis neuronal es un proceso que ocurre en una escala temporal inferior a milisegundos y que está estrictamente regulado por el Ca²⁺. Mientras que las proteínas SNARE están implicadas en la fusión de las VSs con la membrana presináptica, las sinaptotagminas son responsables de la detección de las corrientes de Ca²⁺ y de la coordinación precisa de la fusión vesicular en respuesta a estos estímulos. Existen 16 isoformas distintas de sinaptotagmina. Entre estas, la sinaptotagmina-1 (Syt1) es el sensor de Ca²⁺ implicado en la liberación sincrónica de neurotransmisor (Geppert et al., 1994) en la mayoría de las neuronas, aunque la sinaptotagmina-2 y la 9 también están implicadas en la liberación sincrónica en diferentes tipos de neuronas (Wen et al., 2010a). Por otro lado, la sinaptotagmina-7 está implicada en la liberación asincrónica o “lenta” de neurotransmisor (Bacaj et al., 2013).

1.1.1.4 Complexinas

A pesar de las fuerzas hidrofóbicas que impiden la fusión de las membranas, es posible que los complejos SNARE se ensamblen de manera espontánea, causando la pérdida prematura de VSs (Jahn & Scheller, 2006). Las complexinas son pequeñas proteínas solubles que se unen al complejo SNARE y que, junto con las sinaptotagminas, confieren velocidad y precisión a la fusión de las VSs (Wojcik & Brose, 2007). En concreto, el papel de las complexinas será frenar la fusión de las VSs hasta la llegada de un estímulo apropiado, impidiendo el ensamblaje completo del complejo SNARE (Giraudo et al., 2008). Se han descrito cuatro genes distintos, CplxI-CplxIV, que dan lugar a las cuatro isoformas de complexina que se expresan predominantemente en el SNC (Reim et al., 2005). Las complexinas previenen la fusión prematura de las VSs e impiden el desensamblaje de los complejos trans-SNARE por las proteínas NSF/ α SNAP (Prinslow et al., 2019), aumentando el número de VSs listas para su fusión. Sin embargo, tras la apertura de los VGCCs y el aumento de la concentración de Ca^{2+} en el terminal presináptico también participarán en la formación del poro y en la fusión de la vesícula (Brunger et al., 2018).

1.1.2. Proteínas de la ZA

Aunque la fusión de las VSs esta mediada por las proteínas SNARE y Munc-18, estas proteínas se encuentran presentes en diversos tipos celulares y están implicadas en todos los procesos de fusión de membranas excepto en la fusión mitocondrial (Südhof & Rothman, 2009). La exocitosis de las VSs cargadas de neurotransmisor ocurre en una pequeña región de la membrana de la presinapsis denominada zona activa (ZA) (Gray, 1963). En esta región, además de Munc18-1 y las proteínas SNARE, encontraremos un complejo de proteínas multidominio encargadas de reclutar y organizar de manera espacial los componentes que participarán en la fusión vesicular, así como de regular aún más la resolución espacial y temporal de la fusión vesicular necesaria para el correcto funcionamiento de las sinapsis. Las principales proteínas de la ZA son RIM (del inglés *Rab3 Interacting Molecule*), RIM-BP (del inglés *RIM-Binding Protein*), CAST (del inglés *Cytomatrix at the active zone-Associated Structural Protein*) / ELKS, Bassoon/Piccolo y Munc-13 (del inglés *Mammalian UNCoordinated-13*).

La principal función de las proteínas de la ZA es la preparación de las VSs para su liberación inmediata en respuesta a la entrada de Ca^{2+} . El modelo actual describe

Introducción

dos etapas en este proceso, una etapa de acercamiento de las VSs a la membrana denominado anclaje (del inglés *docking*) y un proceso mediante el que alcanzan un estado de alta fusogenicidad denominado cebado (del inglés *priming*) y pasan a formar parte de una población de VSs listas para la fusión denominada RRP (del inglés *Readily Releasable Pool*) (Südhof, 2013). Aunque la red proteica de la ZA está implicada, en su conjunto, en los procesos de anclaje y cebado, será de especial importancia el complejo proteico formado por las proteínas multidominio RIM, Munc13 y Rab3/27 (Kaeser et al., 2011).

1.1.2.1 RIM

RIM es una proteína multidominio imprescindible para la organización de las proteínas de la ZA. Recluta proteínas mediante sus múltiples sitios de unión, acercándolas a la membrana, y será esencial para los procesos de anclaje y cebado (Kaeser et al., 2011; Koushika et al., 2001; Schoch et al., 2002). Será importante también para la aproximación de los canales de Ca^{2+} a la ZA (Kaeser et al., 2011) y para múltiples formas de plasticidad presináptica (Castillo et al., 2002). Existen 4 genes que codifican para isoformas de RIM, de las cuales solamente RIM1 α y RIM2 α presentan todos los dominios descritos a continuación. El extremo N-terminal de RIM está compuesto por un dominio de dedos de zinc que interactúa con los dominios C2A de Munc13-1 y ubMunc13-2, desestabilizando la forma de homodímero constitutivo autoinhibidor que forma Munc13 y formando el heterodímero RIM/Munc13 (Dulubova et al., 2005). Los dedos de zinc de RIM están flanqueados por unos dominios α -hélice que se unen a Rab3 y Rab27 de manera GTP dependiente (Betz et al., 2001; Fukuda, 2003; Wang et al., 1997). En la región central RIM tiene un dominio PDZ con el cual se une al extremo C-terminal de los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q pero no a los tipo L (Kaeser et al., 2011). Además, RIM se une a la proteína de unión a RIM-BP mediante su secuencia PxxP, la cual también es capaz de unirse al extremo C-terminal de los canales de Ca^{2+} (Kaeser et al., 2012). Estas interacciones con canales de Ca^{2+} y RIM-BP serán esenciales para agrupar los canales de Ca^{2+} en la ZA y cerca de las VSs para que la entrada de Ca^{2+} se acople bien a la fusión de éstas. RIM también interacciona mediante su dominio PDZ central con las proteínas CAST/ELKS (Ohtsuka et al., 2002), las cuales son importantes para reclutar a la proteína RIM a la zona activa (Hamada & Ohtsuka, 2018) y con las liprin- α mediante su dominio C2B, formando un complejo RIM/CAST/ liprin- α

que regula el anclaje y la exocitosis de las VSs (Wong et al., 2018; Xie et al., 2021). Las proteínas de andamiaje Piccolo/Bassoon, aunque no se unen directamente con RIM, interaccionan con las proteínas CAST/ELKS en la misma región central que la proteína RIM, participando de manera conjunta en la liberación de neurotransmisor (Takao-Rikitsu et al., 2004).

1.1.2.2 Munc13

Las proteínas Munc13 participan de manera directa en los procesos de anclaje y cebado y son imprescindibles para la transmisión sináptica (Varoqueaux et al., 2002). Existen 5 genes distintos que codifican distintas isoformas de Munc13 (Brose et al., 1995; Koch et al., 2000). Los genes Munc13-1, 2 y 3 codifican proteínas largas que se expresan en el cerebro, mientras que Munc13-4 y BAP3 codifican proteínas más pequeñas que se expresan fuera del cerebro. El gen que codifica para Munc13-2 presenta dos promotores dando lugar a dos isoformas distintas, UbMunc13-2 (del inglés *UBicuous-Munc13-2*) expresada de manera más general, preferentemente en las regiones rostrales, incluyendo la corteza y las regiones CA del hipocampo; y bMunc13-2 (del inglés *brain-Munc13-2*), específica de cerebro (Brose et al., 1995; Song et al., 1998). Munc13-3 es más abundante en el cerebelo, aunque también presenta expresión en el *pons*, tallo cerebral, corteza visual, giro dentado del hipocampo y Caliz de Held (Augustin et al., 1999; Chen et al., 2013; Netrakanti et al., 2015a). Las isoformas con una secuencia más larga como Munc13-1 y ubMunc13-2 tienen, comenzando en el extremo N-terminal, una región C2A Ca^{2+} -independiente implicada en la homodimerización autoinhibitoria de Munc13 y también en el anclaje vesicular (Camacho et al., 2017). Es por esto que la actividad de Munc13 requiere de la interacción con RIM mediante este dominio C2A, la cual permite la separación del homodímero. La región C2A esta seguida de una secuencia de unión a Ca^{2+} - Calmodulina (CaM), un dominio C1 de unión a diacilglicerol y un dominio C2B de unión a Ca^{2+} y PIP_2 implicados en procesos de plasticidad y potenciación de la liberación (Basu et al., 2007; Junge et al., 2004; Shin et al., 2010). Finalmente, en su extremo C-terminal presenta un dominio MUNC que media el cambio de la syntaxina-1 de su forma cerrada a su forma abierta, permitiendo el comienzo del ensamblaje del complejo SNARE y siendo imprescindible para el cebado vesicular, y un dominio C2C independiente de Ca^{2+} , cuya función biológica aún no está muy

Introducción

clara, aunque se piensa que está implicado en el acercamiento entre las membranas durante la fusión (Quade et al., 2019; Südhof, 2012; Yang et al., 2015).

1.1.2.3 Rab

Las proteínas Rab son moléculas de unión a GTP que tienen especial importancia en la fusión vesicular y que se unen a las vesículas mediante una secuencia cisteína-X-cisteína prenilada en su extremo C-terminal (Seabra et al., 1992). Estas interacciones anclan las vesículas al complejo heterotrimérico RIM/Munc13/Rab y las acercan a la membrana de la ZA. Las proteínas Rab pueden encontrarse en su forma asociada a membrana unidas a GTP o en su forma disociada de membrana unidas a GDP (McKiernan et al., 1993). Su actividad está regulada por la proteína activadora de GTPasa (GAP del inglés *GTPase-Activating Protein*) y por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF del inglés *guanine nucleotide exchange factor*) que median la hidrólisis del GTP unido a Rab3 o el intercambio de GDP por GTP, respectivamente (Barr & Lambright, 2010). Rab3 estará en las vesículas en su forma unida a GTP y al fusionarse las vesículas pasará a estar unido a GDP, separándose de estas. Su interacción con RIM será importante para colocar a las vesículas en regiones cercanas a canales de Ca^{2+} , aumentando su probabilidad de fusión (Gracheva et al., 2008; Schlüter et al., 2006). La delección de las cuatro isoformas de Rab3 (Rab3 A-D) provoca una disminución en la liberación de neurotransmisor que resulta letal en ratones (Schlüter et al., 2004). Por otro lado, Rab27 no se separará de las vesículas en su forma unida a GDP y permanecerá durante el proceso de endocitosis, teniendo importancia en la maduración de las vesículas recicladas tras la exocitosis (Pavlos & Jahn, 2011).

Aparte de las proteínas directamente implicadas en el anclaje y cebado vesicular, la ZA contiene proteínas ocupadas del andamiaje molecular que reclutarán y anclarán los componentes encargados de la fusión vesicular, organizándolos espacialmente. Son proteínas multidominio capaces de interactuar no solo con proteínas de fusión, sino también con lípidos, canales de Ca^{2+} y proteínas del citoesqueleto, conformando la estructura de la ZA.

1.1.2.4 RIM-BP

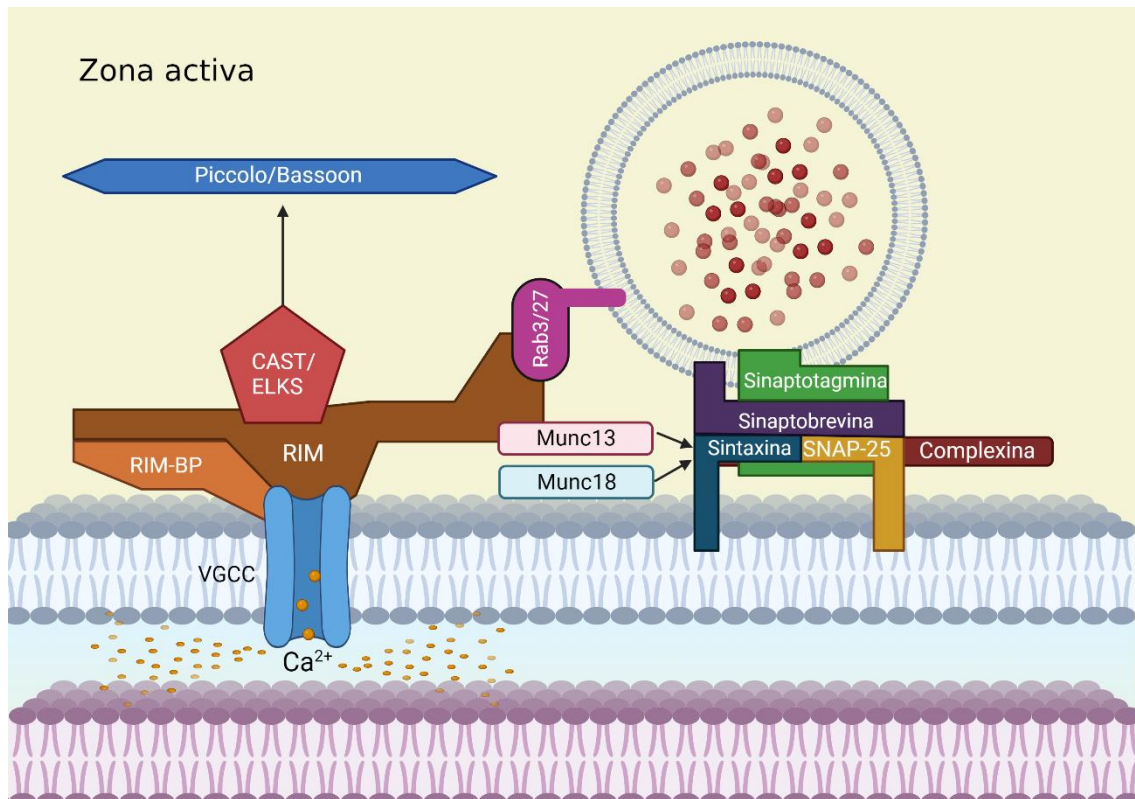
RIM-BP es una familia de proteínas de andamiaje que presentan un dominio SH3 en su región central, dos en su región C-terminal y tres dominios de unión a fibronectina (Mittelstaedt & Schoch, 2007; Wang et al., 2000). RIM-BP se unen a canales de Ca^{2+} mediante el dominio SH3-II/III de su extremo C-terminal (Liu et al., 2011), ayudando a la proteína RIM a situar los canales de Ca^{2+} en la ZA. Además de su papel en la entrada de Ca^{2+} en el terminal, la interacción entre RIM-BP y Munc13 es importante para estabilizar Munc13 y reclutar VSs a la ZA. En concreto, se ha visto que la interacción de Munc13 con RIM o RIM-BP puede hacer que las vesículas estén más o menos listas para la fusión, haciendo de RIM-BP un factor importante en la regulación de la liberación de neurotransmisor (Brockmann et al., 2020).

1.1.2.5 Piccolo y Bassoon

Piccolo y Bassoon son proteínas de andamiaje implicadas en la organización funcional y molecular de la ZA. Tienen una estructura similar, con diez dominios de interacción muy conservados, los dominios Piccolo-Bassoon (Fenster et al., 2000; Langnaese et al., 1996). Aunque estas proteínas interactúan con ELKS/CAST, Munc13, RIM y RIM-BP (Gundelfinger & Fejtova, 2012), su eliminación no afecta a la estructura de la ZA en las sinapsis del SNC (Mukherjee et al., 2010) debido a la redundancia de funciones con otras proteínas de la ZA. Sin embargo, sí son importantes para esta estructura en las sinapsis de las neuronas sensoriales del Sistema Nervioso Periférico (SNP) de los vertebrados (Magupalli et al., 2008; tom Dieck et al., 2005). Debido a sus múltiples dominios de interacción, Piccolo y Bassoon participan en múltiples procesos de la ZA. Bassoon interactúa con RIM-BP (Hibino et al., 2002) con implicaciones funcionales en el acercamiento de canales de Ca^{2+} tipo P/Q en las sinapsis hipocámpales (Davydova et al., 2014). También interactúa con el dominio C2A del extremo N-terminal de Munc13 (Wang et al., 2009), por lo que se especula que puede estar involucrada en los procesos de priming vesicular (Han et al., 2011; Südhof, 2012). Además de estas funciones relacionadas con la liberación de neurotransmisor, Piccolo y Bassoon están implicadas en el mantenimiento de las sinapsis mediante sus interacciones con el sistema del proteosoma-ubiquitina y con los sistemas autofágicos-lisosomales de los terminales sinápticos (Waites et al., 2013) y, además, participan en el

Introducción

reclutamiento de factores transcripcionales como CTBP1 (del inglés *C-Terminal-Binding Protein 1*) en los terminal presinápticos (Ivanova et al., 2015).



Esquema 1. La zona activa. Proteínas de la zona activa implicadas en la liberación de neurotransmisor.

1.1.3. Canales de Ca^{2+} activados por voltaje

Cuando la despolarización de la neurona postsináptica alcanza un nivel determinado, se genera un potencial de acción en el axón que recorre la neurona hasta alcanzar el terminal sináptico y despolarizarlo. Los VGCCs son activados por esta despolarización y permiten la entrada de Ca^{2+} , activando la liberación del neurotransmisor en la ZA. Estos canales están formados por distintas subunidades. La subunidad común de todos los canales es la subunidad α_1 y las distintas propiedades de los canales estarán determinadas por las subunidades auxiliares presentes en el cerebro que serán β y α_2 y δ .

Según la subunidad formadora de poro α_1 que presenten, existen tres familias de VGCCs ($Ca_v1 - Ca_v3$) (Dolphin, 2016). Dentro de estos, los cuatro canales Ca_v1 (llamados de tipo L, por su corriente característica de Ca^{2+}) y los tres canales $Ca_v2.1-$

3 (tipo P/Q, N y R) son los principales canales en la transmisión sináptica en la ZA (Dolphin & Lee, 2020).

El reclutamiento de los VGCCs a la ZA está mediado por las proteínas RIM y RIM-BP. RIM se une mediante su dominio PDZ a los motivos DxWC de la región C-terminal de los canales P/Q y N y también se une indirectamente mediante RIM-BP a los motivos PxxP ricos en prolina de los canales Cav1 y Cav2 (Hibino et al., 2002). Existen otras interacciones, como la de RIM-BP con las subunidades Cav β , y la unión de CAST/ELKS con Cav β , las cuales a su vez interactúan con RIM, formando una red de proteínas interconectadas que localizarán los VGCCs a una distancia relativa de las VSs, afectando a su probabilidad y características de liberación (Kiyonaka et al., 2007; Lu et al., 2005).

Aparte de afectar a su localización, interacciones con otras proteínas de la ZA pueden afectar a la actividad de los VGCCs. Interacciones entre el dominio C2B de RIM y las subunidades Cav β de los VGCCs provocan una prolongación del flujo de Ca^{2+} de los canales P/Q (Uriu et al., 2010). Munc13 también es capaz de interactuar con los VGCCs mediante su dominio C2B, disminuyendo su velocidad de reactivación y afectando así a la liberación en intervalos de tiempo pequeños (Calloway et al., 2015). Además de proteínas de la ZA, se ha visto que los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) situados en las proximidades de la ZA son capaces de regular la actividad de los VGCCs. En concreto las subunidades $G_{\beta\gamma}$ de GPCRs acoplados a $G_{i/o}$ producen una inhibición de los canales Cav2 que puede ser revertida por una despolarización fuerte que cause la desunión entre la subunidad $G_{\beta\gamma}$ y los VGCCs (Zamponi & Snutch, 1998). Esta inhibición puede ser bloqueada por la fosforilación mediante la Proteína Kinasa C (PKC) del lugar de unión de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ (Zhu & Ikeda, 1994).

1.1.4. Receptores metabotrópicos

Al contrario de lo que ocurre con los receptores ionotrópicos, la activación de los receptores metabotrópicos por su ligando es lenta y no ocasiona la apertura de un poro, sino que provoca la activación de proteínas heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G), por lo que también se les denomina receptores acoplados a proteínas G (GPCRs del inglés *G-Protein Coupled Receptors*). Las proteínas G son transductores intracelulares capaces de iniciar distintas

Introducción

cascadas de señalización y están compuestas de una subunidad α , una subunidad β , y una subunidad γ . Al unirse un ligando al receptor metabotrópico, se produce un intercambio de una molécula de GDP unido a la subunidad α por una molécula de GTP, lo que provocará la disociación de la subunidad $G\alpha$ del dímero formado por las subunidades β y γ , que actuarán funcionalmente como una única unidad. Ambas subunidades son funcionales y modularán la actividad de numerosas moléculas efectoras como enzimas, canales iónicos y factores de transcripción. La desactivación de estas proteínas ocurrirá con la hidrólisis del GTP unido, que dará lugar a un GDP y al reensamblaje del heterotrímero. Las proteínas G se identificarán por su subunidad $G\alpha$, que determinará qué vías de señalización inician estas proteínas.

1.1.4.1 Receptores Beta-adrenérgicos (β -ARs)

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia del tipo A de GPCRs, también conocida como receptores de tipo rodopsina y actúan como heteroreceptores en sinapsis glutamatérgicas.

Estructura, isoformas y localización

La estructura general de los receptores adrenérgicos es similar a la de la rodopsina, con 7 dominios transmembrana, 3 bucles extracelulares y 3 bucles intracelulares (Graham, 1990). Estos receptores presentan 9 isoformas clasificadas en 3 clases: los receptores α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1C}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) y β (β_1 , β_2 , β_3). Los receptores adrenérgicos se expresan en gran variedad de tejidos como corazón, riñón, hígado, tejido adiposo, músculo liso vascular y bronquial, linfocitos y en el SNC. Las neuronas noradrenérgicas se encuentran en el área tegmental lateral y en el *locus coeruleus*, siendo éste la principal fuente de noradrenalina del cerebro. Las aferencias noradrenérgicas proyectan desde el *locus coeruleus* hasta prácticamente todas las regiones del cerebro con una organización topográfica, es decir, diferentes regiones de este núcleo establecerán sinapsis con determinadas regiones, aportando especificidad funcional (Foote et al., 1983).

Los receptores β_1 -adrenérgicos (β_1 -ARs) se expresan en la corteza cerebral, hipocampo, el núcleo olfatorio, el núcleo septal lateral intermedio, el núcleo del retículo del tálamo, el complejo oculomotor, el núcleo vestibular, en todas las capas

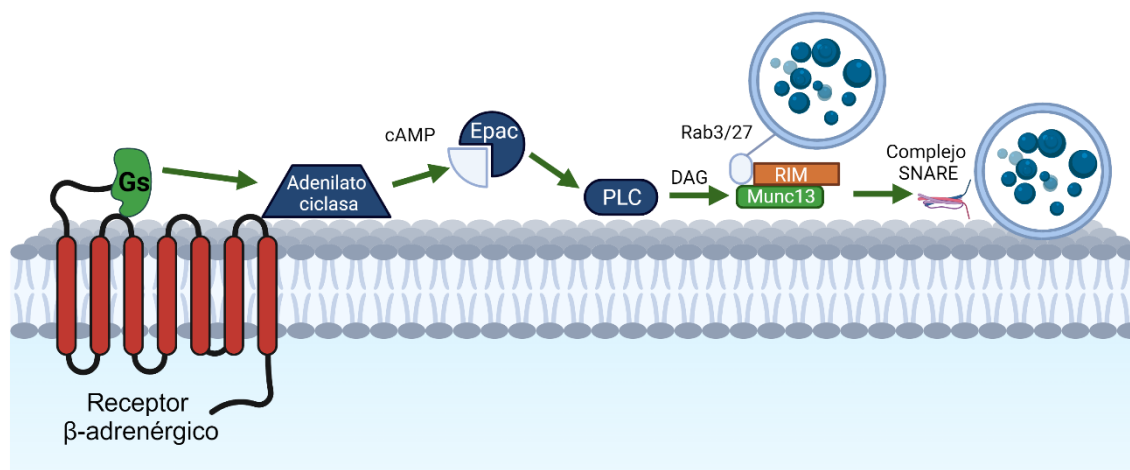
de la corteza y en los núcleos profundos del cerebelo, en el núcleo trapezoidal, el núcleo abducens, en la formación reticular, la glándula pineal y en la médula espinal (Paschalis et al., 2009). Los β_2 -ARs se expresan en la corteza cerebelosa, bulbo olfatorio, la corteza piriforme, el giro dentado del hipocampo, el núcleo del tálamo y la corteza cerebral (Lippiello et al., 2015; Nicholas et al., 1993). Por último, los β_3 -ARs presentan una expresión baja en el SNC, restringida al hipocampo, la corteza y el estriado (Summers et al., 1995). A un nivel subcelular, los β -ARs están localizados en las membranas de regiones somatodendríticas y en los terminales de neuronas, en membranas microsomales y en la superficie de astrocitos, donde ejercen múltiples funciones biológicas y participan en mecanismos de plasticidad sináptica (Ghali et al., 2020). Los receptores β_1 y β_2 formarán principalmente homodímeros, aunque también se ha visto la presencia de heterodímeros β_1/β_2 (Mercier et al., 2002).

Mecanismo de acción

Los receptores β -AR están acoplados a proteínas G_s y al activarse inducen la activación de la adenilato ciclasa, con un consecuente aumento de cAMP. Al inducir respuestas intracelulares basadas en un aumento de cAMP, las vías señalización mediadas por β -AR son capaces de modular la transmisión sináptica de diversas maneras. Los receptores β -AR pueden modular la excitabilidad neuronal mediante la regulación de los VGCCs de tipo L (Hoogland & Saggau, 2004), los canales de K^+ (Yuan et al., 2002) y la fosforilación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (Vanhoose & Winder, 2003) y de los NMDA. Este aumento de cAMP también potencia la liberación de neurotransmisor, lo cual se ha observado en preparaciones de sinaptosomas corticales (Ferrero et al., 2013; Herrero & Sánchez-Prieto, 1996) así como en sinapsis corticales (Huang & Hsu, 2006a), hipocampales (Gereau & Conn, 1994) y en la amígdala (Ferry et al., 1997). Esta potenciación se manifiesta como un aumento en la liberación inducida por despolarización, un aumento en la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras espontáneas (mEPSCs) y un aumento en la RRP (Ji et al., 2008; Kobayashi et al., 2009) y, por lo tanto, es de origen presináptico. Estudios previos de nuestro laboratorio en sinaptosomas de corteza cerebral han demostrado que los β -ARs se expresan en la ZA de terminales glutamatérgicos y que potencian la liberación de neurotransmisor por un mecanismo que implica la activación de la fosfolipasa C (PLC) dependiente

Introducción

de la proteína Epac y la consecuente generación de DAG que activa a la proteína Munc13-1, la cual provoca un aumento en las vesículas ancladas (Ferrero et al., 2013). Además, se observó que esta vía de señalización está alterada en terminales corticales de ratones *Fmr1KO*, un modelo animal para estudiar el Síndrome del X Frágil (García-Font et al., 2019).



Esquema 2. Señalización de los receptores β -adrenérgicos en la potenciación de la liberación de glutamato. Los receptores β -adrenérgicos activan la adenilato ciclasa (AC) para generar AMP cíclico (cAMP), que activa la proteína Epac. Epac activa la fosfolipasa C (PLC) y el diacilglicerol (DAG) generado activa la proteína Munc13. El complejo Munc13-RIM-Rab3a promueve la preparación de las vesículas sinápticas para su liberación mediante el reclutamiento de complejos SNARE.

También se ha observado que estos receptores pueden mediar una potenciación postsináptica en cultivos hipocámpales (Raman et al., 1996), corticales (Ji et al., 2008) y de células de Purkinje del cerebelo (Lippiello et al., 2015). En esta potenciación, el aumento en los niveles de cAMP en la postsinapsis facilitará la fosforilación de los receptores NMDA de manera dependiente de PKA, regulando su probabilidad de apertura. Los receptores β_1 (Martin et al., 2004) y β_2 (Zamah et al., 2002) pueden acoplarse a proteínas G_i tras ser fosforilados por PKA. Por último, se ha descrito que la estimulación de los receptores β -AR es capaz de activar la cascada de señalización de las MAP quinasas (Luttrell et al., 1999), concretamente de las p38 MAP quinasas (Williams et al., 1998).

La fosforilación de los β -ARs en su dominio C-terminal juega un papel importante en la modulación de su señalización. La fosforilación por PKA no requiere la unión de un agonista e interferirá con la capacidad del receptor de activar proteínas G_s ,

produciendo su desensibilización o promoviendo su interacción con proteínas G_i (Martin et al., 2004). Por otro lado, la activación del receptor por su unión a un ligando favorece la fosforilación mediada por las proteínas quinasas asociadas a GPCR (GRK), GRK2, GRK5 y GRK6 (Nobles et al., 2011). Las proteínas GRK ejercen el mecanismo de desensibilización de GPCRs más estudiado. Además, la fosforilación mediante GRK es importante para reclutar a las proteínas β -arrestina. β -arrestina1 y β -arrestina2 mediarán la internalización del receptor β AR fosforilado (Ferguson et al., 1996) y también permitirán la señalización del receptor mediante la vía de las MAP quinasas, así como mediante otras vías no canónicas (Cheslack-Postava et al., 2007; DeWire et al., 2007).

Farmacología

Para la manipulación farmacológica de los β -ARs existen agonistas ortostéricos como el isoproterenol y antagonistas como el propranolol, capaces de actuar indistintamente en los receptores β_1 y β_2 . A pesar de que estos receptores activan las mismas vías de señalización, existen diferencias en los efectores moleculares a los que se unen y esto da lugar a diferencias en el efecto celular de las modulaciones mediadas por estos receptores (Galandrin & Bouvier, 2006; Richter et al., 2008). Por ello se han desarrollado fármacos más específicos, como el metoprolol, un antagonista ortostérico con gran especificidad para los receptores β_1 o el ICI-118-551, un antagonista ortostérico específico de los receptores β_2 (Hoffmann et al., 2004; Summerhill et al., 2008).

1.1.4.2 Receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu)

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu) pertenecen a la familia C de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), a la cual también pertenecen los receptores $GABA_B$, los receptores sensibles a Ca^{2+} , los receptores de feromonas y los del gusto (Pin et al., 2003). Esta familia está caracterizada por poseer un dominio N-terminal extracelular (ECD) particularmente largo, que dimeriza para formar el sitio de unión de ligandos ortostéricos que se denominan dominio de Venus atrapamoscas (VFD del inglés *Venus Flytrap Domain*). Esta dimerización hace que cada receptor tenga 2 VFD y, aunque la unión del ligando a uno de estos dominios

Introducción

es suficiente para la activación del receptor, para lograr la actividad máxima del receptor es necesario que el ligando se una a ambos (De Blasi et al., 2001). Al unirse el ligando, se producirán cambios conformacionales que se propagarán desde la VFD hasta una región de dominios ricos en cisteína, que transmitirá esta activación hasta un dominio de siete hélices transmembrana (HD del inglés *heptahélical domain*) y a la región C-terminal. El dominio HD presenta una serie de bucles intracelulares, siendo de especial importancia el bucle entre las hélices 2 y 3, que forma un bolsillo mediante el que interacciona con el dominio C-terminal de la subunidad α de las proteínas G y que es importante para determinar la selectividad del receptor por una determinada proteína G (Bourne, 1997). Además, la región HD es donde se unen la mayoría de moduladores alostéricos de los mGluRs. El dominio C-terminal es susceptible de fosforilación y de procesamiento alternativo y es donde tienen lugar gran parte de las interacciones con otras proteínas, por lo que es de gran importancia en la regulación de la función del receptor (Niswender & Conn, 2010).

Según su afinidad por el glutamato, su homología de secuencia y las proteínas G a las que se acoplan, podemos distinguir tres grupos de mGlu. Los receptores **mGlu del grupo I** son el mGlu1 y el mGlu5 y están acoplados a proteínas $G\alpha_{q/11}$. La activación de estos receptores dará lugar a la activación de la PLC β , que mediará la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP $_2$) de la membrana, dando lugar a un aumento de los niveles de DAG, que activará a la PKC, y de inositol trifosfato (IP $_3$), que provocará una liberación de Ca $^{2+}$ intracelular. Los receptores **mGlu del grupo II** son el receptor mGlu2 y mGlu3, están acoplados a proteínas $G_{i/o}$ y su activación provocará la reducción de la actividad de la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de cAMP y también la inhibición de los VGCCs. Por último, los receptores del grupo III se explican a continuación con un mayor detalle ya que son uno de los temas centrales de este trabajo.

1.1.4.3 mGlu del grupo III (mGlu4/6/7/8): receptores mGlu7

Los receptores del grupo III se localizan normalmente en la presinapsis donde actúan como auto- y heterorreceptores inhibiendo la liberación de neurotransmisor.

Isoformas y localización

El ARN mensajero de los receptores mGlu III da lugar a diferentes isoformas mediante procesamiento alternativo que se diferencian principalmente en el extremo C-terminal (Corti et al., 1998). El receptor **mGlu4** se localiza predominantemente en la ZA de la presinapsis y en el SNC tiene una fuerte expresión en el cerebelo, en concreto en las fibras paralelas. También se localiza en menores niveles en el tálamo, los bulbos olfatorios y en el giro dentado del hipocampo (Corti et al., 2002). Su isoforma mayoritaria es mGlu4a y, aunque se ha propuesto la existencia de una variante mGlu4b (Thomsen et al., 1997), hay discrepancias acerca de esto (Corti et al., 2002). Otros estudios indican que hay una isoforma específica de las papilas gustativas denominada mGlu4-taste (Chaudhari et al., 2000). La expresión de **mGlu6** está restringida a la retina, donde se pueden encontrar tres isoformas (mGlu6a-c) que se localizan predominantemente en la postsinapsis de células bipolares de la retina (Nomura et al., 1994; Valerio et al., 2001). El receptor **mGlu7** es el receptor del grupo III con una mayor distribución en el SNC. Tiene altos niveles de expresión en los bulbos olfatorios, el hipocampo, el hipotálamo y las vías sensoriales aferentes y se localiza de manera específica en la ZA presináptica (Corti et al., 2002; Kinoshita et al., 1998; Wada et al., 1998). Hay cinco variables de procesamiento alternativo del receptor mGlu7 (mGlu7a-e), que muestran patrones de expresión distintos aunque, en algunos casos, se solapan. mGlu7a y b son los más abundantes y comparten un patrón de expresión parecido aunque el de mGlu7b se encuentra más restringido (Kinoshita et al., 1998). Por otro lado, mGlu7c y d tienen mayor expresión en tejidos periféricos no-neuronales (Schulz et al., 2002). **mGlu8** tiene unos niveles de expresión inferiores a mGlu7 o mGlu4. Se encuentra en el bulbo olfatorio, la corteza piriforme, el tálamo, el puente y los cuerpos mamilares (Saugstad et al., 1997) y en menor medida en el hipocampo, la corteza, el cerebelo, la amígdala y la retina. mGlu8a y b son las dos isoformas principales del receptor y suelen co-localizar, mientras que mGlu8c es una tercera isoforma que se ha descrito principalmente en células gliales (Ferraguti et al., 2005).

Una característica particular de los mGlu del grupo III es su **localización específica en determinados tipos neuronales**. Aunque también se ha descrito en la corteza somatosensorial, esta especificidad está especialmente presente en el hipocampo. El receptor mGlu4 se encuentra en las aferencias de neuronas

Introducción

piramidales del giro dentado y de la región *Cornus Ammonis* (CA) 3 que establecen sinapsis con las interneuronas del *hilux* y del giro dentado (Corti et al., 2002). También se encuentra presente en los axones de neuronas piramidales de CA1 que establecen sinapsis con las interneuronas del *Oriens/Alveus* y en las fibras paralelas del cerebelo (Scanziani et al., 1998). En estas sinapsis, el receptor mGlu4 regula mecanismos de plasticidad presináptica a corto plazo asociados a la memoria espacial y con implicaciones en autismo, epilepsia y esquizofrenia (Iscru et al., 2013). La expresión de mGlu8a y b en el hipocampo de ratones adultos está restringida a axones glutamatérgicos de regiones extrahipocampales y GABAérgicos que inervan neuronas trilaminares, interneuronas positivas para el receptor muscarínico 2 del *Oriens/Alveus* de CA1 y CA3 y, en menor medida, a interneuronas del *Oriens-Lacunosum Moleculare* (OLM) que expresan el receptor mGlu1a en la postsinapsis (Ferraguti et al., 2005).

mGlu7 se encuentra de manera específica en los axones glutamatérgicos de las fibras musgosas (MF) del giro dentado que establecen sinapsis con las interneuronas del *stratum lucidum* de CA3. Estas interneuronas, a su vez, establecen sinapsis sobre las neuronas piramidales de CA3. Se ha descrito que la activación de mGlu7 regula la inhibición de estas neuronas piramidales, siendo importante en el control de la excitabilidad en esta región (Pelkey et al., 2005). En el giro dentado y en la región CA1 mGlu7 se encuentra en axones glutamatérgicos que establecen sinapsis con las interneuronas asociadas a la vía perforante y con las interneuronas OLM, respectivamente (Tomioka et al., 2014). Estas interneuronas se caracterizan por inervar las dendritas distales de las principales neuronas excitadoras de su región (las células granulares del giro dentado y las neuronas piramidales de CA1) y por co-expresar somatostatina (STT), el neuropéptido Y y el receptor mGlu1a (Klausberger et al., 2003; Sik et al., 1997). La regulación mediada por el receptor mGlu7 de la actividad de las neuronas HIPP y OLM es importante para controlar la excitabilidad del cerebro y para las funciones cognitivas superiores (Bertaso et al., 2008; Zhang et al., 2008). La localización específica de mGlu7 en los terminales de estas sinapsis, se debe a la expresión de la proteína de adhesión Efn1 en la postsinapsis (proteína extracelular con dominios de repeticiones ricas en leucina y de fibronectina 1). La proteína Efn1 pertenece a la superfamilia de proteínas ricas en repeticiones de leucina, proteínas extracelulares con la función de conectar estructuras sinápticas entre distintos tipos celulares (de Wit & Ghosh, 2016) y se unen de manera

específica a los receptores mGlu del grupo III, estabilizándolos en la presinapsis y regulando su actividad (Dunn et al., 2018; Tomioka et al., 2014). Efn1 interacciona con el dominio N-terminal de mGlu7, siendo de especial importancia los N-glicanos en los aminoácidos asparagina 486 y 572 (Park et al., 2020), y favorece la dimerización mGlu7. La interacción de Efn1 y mGlu7 también se da en las capas 2/3 y 5 de la corteza, donde afectará también a la localización y actividad del receptor. Efn2 tiene una expresión más extensa, encontrándose en la postsinapsis de sinapsis glutamatérgicas de CA1, CA3, giro dentado, amígdala y corteza prefrontal y se ha visto que su eliminación provoca un aumento en la transmisión glutamatérgica en la sinapsis entre las colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales de CA1 (Dunn et al., 2019), por lo que se especula que la localización de los mGlu7 que no interaccionan con Efn1, así como de otros mGlu del grupo III, puede depender de la interacción con Efn2.

En la región CA1, además de en axones glutamatérgicos que sinaptan con interneuronas, mGlu7 se expresa en los axones glutamatérgicos de las fibras colaterales de Schaffer (SC) y en los axones GABAérgicos de interneuronas que expresan parvalbúmina (PV) (Klar et al., 2015; Shigemoto et al., 1997). En esta región mGlu7 participa en las dos principales vías de inhibición de las neuronas piramidales. Por un lado, las interneuronas PV establecen sinapsis axo-somáticas y axo-axónicas con las neuronas piramidales, ejerciendo un control estricto de la excitabilidad (Hijazi et al., 2023). Por otro lado, como se ha explicado anteriormente, las interneuronas OLM reciben sinapsis excitadoras de terminales con mGlu7 que provienen de las propias neuronas piramidales de CA1 a las que inhibirán, participando en un bucle autoinhibidor de las neuronas piramidales. De esta manera, mGlu7 está ejerciendo un control general en la red inhibitoria de las neuronas piramidales de CA1. Por último, se ha descrito la presencia de mGlu7 en terminales GABAérgicos positivos para el péptido vasoactivo intestinal (VIP), los cuales establecen sinapsis principalmente con otras interneuronas de CA1 (Somogyi et al., 2003).

La expresión de los receptores del grupo III, en la corteza y el hipocampo, también está **regulada con el desarrollo**. En corteza, se ha observado en ratones jóvenes (de 2-3 semanas) que existe una inhibición mediada por mGlu del grupo III que no existe en los individuos adultos (de 2-3 meses; Herrero et al., 1998). En

Introducción

experimentos de inmunohistoquímica en ratas, se ha comprobado que la presencia de la isoforma mGlu7a disminuye durante el desarrollo postnatal en la capa granular del cerebelo y en el núcleo del puente. Por otro lado, la expresión aumenta en corteza piriforme y en el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo (Bradley et al., 1998). En esta última región se ha comprobado que la expresión de los receptores mGlu7 y mGlu8 se regula durante el desarrollo de manera dinámica, en concreto en la sinapsis entre las fibras colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales de CA1. En etapas neonatales, los terminales glutamatérgicos de las fibras colaterales de Schaffer expresan tanto mGlu7 como mGlu8, sin embargo, en etapas adultas solamente está presente el receptor mGlu7 (Ayala et al., 2008).

Mecanismo de acción del receptor mGlu7

La función canónica del receptor mGlu7 es la reducción de la liberación de glutamato mediante la inhibición de los canales de Ca^{2+} y de la adenilato ciclasa (Conn & Pin, 1997; Okamoto et al., 1994). mGlu7 inhibe los canales de tipo N (Capogna, 2004; Millán et al., 2002a) y los canales de tipo P/Q (Martín et al., 2007) de los terminales sinápticos de corteza e hipocampo mediante la activación de proteínas $G_{i/o}$ sensibles a toxina *pertussis* (PTx). Esta señalización está mediada por las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas $G_{i/o}$, que interactúan directamente con la subunidad α de los canales de Ca^{2+} sin la intervención de otras proteínas intracelulares como PKC o PKA (Macek et al., 1998; Martín et al., 2007; Millán et al., 2002a). Esta reducción de la liberación por mGlu7 se ha observado en la transmisión sináptica excitadora e inhibitoria en el hipocampo (Klar et al., 2015; Martín et al., 2018; Pelkey et al., 2005), en el tálamo (Kyuyoung & Huguenard, 2014; Turner & Salt, 2003), el núcleo accumbens (X. Li et al., 2008; Xi et al., 2003), la amígdala (Ren et al., 2011; Ugolini et al., 2008) y la corteza (Martín et al., 2010). Esta inhibición de los VGCC mediada por las subunidades $\beta\gamma$ puede ser temporalmente suprimida por despolarizaciones fuertes debido a la disociación de las subunidades $\beta\gamma$ de los VGCCs.

Otra modulación característica de las proteínas $G_{i/o}$ es la inhibición de la adenilato ciclasa por su subunidad α . La LTP presináptica inducida por la activación de PKA es un mecanismo presente en algunas de las sinapsis más abundantes del cerebro, como las fibras musgosas del hipocampo o las fibras paralelas del cerebelo

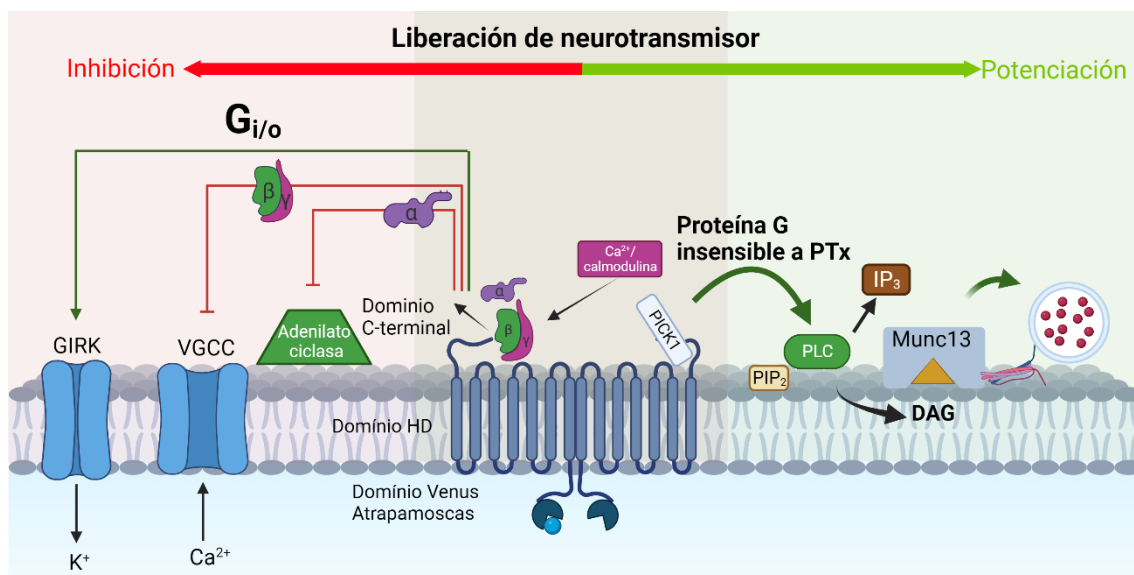
(Huang et al., 1994; Salin et al., 1996). La activación del receptor mGlu7 disminuye los niveles de cAMP incrementados por el activador de la adenilato ciclasa, forskolina, en preparaciones de sinaptosomas corticales (Millán et al., 2002b) e hipocampales (Martín et al., 2007). De esta manera, mGlu7 es capaz de contrarrestar la potenciación mediada por PKA. Por otro lado, mGlu7 es capaz de disminuir los niveles de cAMP producidos por la activación del receptor β -adrenérgico en una preparación de sinaptosomas cerebrocorticales (Ferrero et al., 2016). Además de inhibir los VGCC y la adenilato ciclasa, experimentos en oocitos de *Xenopus* muestran que los receptores mGlu7 junto con mGlu1a y mGlu2 son capaces de activar a los canales de potasio GIRK mediante proteínas G sensibles a PTx (Saugstad et al., 1996).

Aunque la función canónica del receptor mGlu7 es inhibir la liberación de neurotransmisor, también es capaz de aumentar la liberación de glutamato mediante la unión a otras proteínas G distintas de las $G_{i/o}$. La activación de mGlu7 expresado en células granulares en cultivo activa proteínas G_o , que resulta en una activación de PLC, en la liberación de Ca^{2+} intracelular y la activación de PKC, inhibiendo los canales P/Q y disminuyendo la liberación de neurotransmisor (Perroy et al., 2000). Experimentos de nuestro grupo con sinaptosomas de corteza cerebral demostraron, por primera vez, que el receptor mGlu7 es capaz de acoplarse a distintas proteínas G a la vez, mediando efectos distintos (Martín et al., 2010). En este estudio se vio que una activación breve de mGlu7 con el agonista L-AP4 da lugar a la activación, ya descrita, de una proteína $G_{i/o}$ sensible a PTx que inhibe los VGCCs y disminuye la liberación de neurotransmisor. Sin embargo, si la estimulación del receptor se mantenía, este era capaz de activar también a una proteína G resistente a PTx que activa PLC y produce un aumento de los niveles de DAG e IP_3 . Finalmente, este aumento de DAG, promueve la translocación de la proteína Munc13-1 a la membrana y produce un aumento de la liberación de neurotransmisor. Ambas vías de señalización se activan de manera simultánea, predominando la potenciación sobre la inhibición.

Nuestro grupo también ha confirmado la presencia de esta vía de señalización en las sinapsis entre las colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo. En este estudio se vio que el mecanismo de potenciación es dependiente de un aumento de DAG, de las proteínas de la ZA Munc13-2 y RIM1 α ,

Introducción

y que implica un aumento de las vesículas ancladas en la membrana de la ZA, así como un aumento del tamaño de la RRP. Esta modulación bidireccional de la transmisión sináptica se observó utilizando un agonista, pero también mediante una estimulación de alta frecuencia, donde se observó que, aunque ambos mecanismos ocurrían a la vez, el efecto potenciador prevalecía sobre el inhibidor (Martín et al., 2018). El hecho de que este mecanismo bidireccional pueda activarse mediante la estimulación endógena de mGlu7 indica que puede ocurrir en condiciones fisiológicas y tener relevancia en los circuitos hipocampales. Aunque se sabe que mGlu7 se expresa en sinapsis GABAérgicas (Dalezios et al., 2002; Somogyi et al., 2003) donde actúa como hetero-receptor reduciendo la liberación de NT (Klar et al., 2015; X. Li et al., 2008; Ren et al., 2011) se desconoce si en dichas sinapsis mGlu7 también produce una modulación bidireccional de la liberación de NT, como la descrita por nuestro grupo en sinapsis excitadoras (Martín et al., 2010, 2018) y cuál de estas respuestas predomina en condiciones de estimulación fisiológica del receptor mediante liberación endógena de glutamato.



Esquema 3. Receptores metabotrópicos de glutamato 7. Estructura, mecanismos de acción y proteínas reguladoras de los receptores mGlu7.

En hipocampo y corteza, receptores mGlu7 situados en terminales axónicos de neuronas piramidales de CA1 muestran una activación por homodimerización dependiente de su interacción transsináptica con la proteína de adhesión sináptica Efn1 situada en la postsinapsis en interneuronas SOM. Esta activación permite una inhibición tónica de la liberación de neurotransmisor a concentraciones de glutamato que, normalmente, no activarían al receptor (Stachniak et al., 2019). Otro

mecanismo que permite la activación del receptor mGlu7 a concentraciones más bajas de glutamato es la heterodimerización, como es el caso del heterodímero mGlu2/7 del hipocampo y con mGlu3/7 en corteza. La cooperación entre ambas subunidades permite un mecanismo de activación que disminuye notablemente la concentración de glutamato necesaria para activar al receptor mGlu7, pero que se satura a mayores concentraciones que el receptor mGlu2 y el mGlu3 (Habrian et al., 2019).

Interacciones con otras proteínas

La **calmodulina** se une a una región conservada en la región C-terminal de los receptores del grupo III, mGlu4, mGlu6 y mGlu7, de manera dependiente de Ca^{2+} y es necesaria para la inhibición de los VGCC mediada por estos receptores. La calmodulina se unirá a una región que solapa con la región de unión de las subunidades $\beta\gamma$. En concreto, se unirá a los residuos 856 y 879 en la región proximal del dominio C-terminal del receptor, que forman una hélice α que se enterrará entre los dominios C- y N- terminal de la calmodulina (Scheschonka et al., 2008). La unión de la calmodulina facilita la liberación de las subunidades $\beta\gamma$ y permite que se inicie la cascada de señalización que, finalmente, dará lugar a la inhibición de los VGCC. La región de unión de la calmodulina, en concreto en el residuo S862 (Airas et al., 2001), puede ser fosforilada por diferentes proteínas quinasas como PKC, PKA y PKG que impedirán la unión de la calmodulina y la inhibición de los VGCC mediada por el receptor (Cai et al., 2001; El Far et al., 2001; Sorensen et al., 2002).

La proteína **PICK1** (del inglés *Protein Interacting with C Kinase-1*) es una proteína de andamiaje, con un dominio de reconocimiento de dominios PDZ que interacciona con PKC α , y que es importante para la localización de los receptores AMPA en la postsinapsis (Chung et al., 2003). Sin embargo, en la presinapsis, PICK1 interacciona directamente con mGlu7 en su región C-terminal y regula tanto su localización como su actividad. PICK interacciona con los receptores mGlu7a a través de su dominio de reconocimiento de dominios PDZ y, a la vez, formará dímeros con otras moléculas de PICK1 mediante un dominio de hélices superenrolladas, lo que será importante para localizar al receptor mGlu7 en la ZA del terminal presináptico (Boudin & Craig, 2001). Aparte de localizar a mGlu7, PICK1 regula la actividad de mGlu7 mediante la modulación de la fosforilación de mGlu7 por PKC α (Dev et al., 2000). Además,

Introducción

estudios en cultivos de neuronas granulares del cerebelo evidencian que PICK1 es importante para la inhibición de los canales P/Q a través de mGlu7 (Perroy et al., 2002).

Las **GRK** competirán con las proteínas G por la unión al GPCR activado o, directamente, se unirán a las proteínas G desensibilizando al receptor (Tesmer et al., 2005). Además, estas proteínas fosforilan el extremo C-terminal de los receptores, provocando el reclutamiento de las proteínas β -arrestina1 y β -arrestina2 y su etiquetado para su endocitosis mediada por clatrina o para señalar por la vía de la proteína MAPK (del inglés *Mitogen-activated protein kinase*) (Peterson & Luttrell, 2017). GRK2 es el miembro más estudiado de las GRK, y se ha visto que es capaz de fosforilar el extremo C-terminal de los mGluR del grupo III, provocando un efecto rápido que es la desensibilización y cese de la actividad del receptor y un efecto con una dinámica temporal más lenta, que es la internalización de los receptores mediada por clatrina (Abreu et al., 2021). La PP1 (del inglés *protein phosphatase 1*) es la proteína que antagoniza esta fosforilación, revirtiendo estos efectos. PP1 es una holoenzima y esta formada por una subunidad catalítica PP1 y hasta cuatro subunidades reguladoras distintas (α , β , γ 1, and γ 2) creando una gran diversidad de holoenzimas PP1. Las dos subunidades gamma (PP1 γ 1 y PP1 γ 2) interaccionan con la isoforma mGlu7b (Meiselbach et al., 2006).

Farmacología

El receptor mGlu7 presenta una afinidad muy baja por la mayoría de sus agonistas. De este modo, mientras que el glutamato y el agonista exógeno más utilizado para activarlo, el ácido DL-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4), pueden activar los receptores mGlu4/6/8 a concentraciones en el rango micromolar, el receptor mGlu7 es activado por concentraciones submilimolares o milimolares (Schoepp et al., 1999). Por tanto, el estudio del receptor mGlu7 ha estado limitado por la escasez de fármacos que permitan la activación selectiva del receptor. Concretamente, no existe ningún agonista ortostérico específico para mGlu7. Los agonistas ortostéricos, más utilizados, son el ácido DL-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4) con una mediana concentración efectiva (EC_{50}) de 0,1, 337, y 0,29 μ M para los receptores mGlu4, mGlu7 y mGlu8, respectivamente (Selvam et al., 2018) y el LSP4-2022 con una EC_{50} de 0,11, 11,6 y 29,2 μ M para los receptores mGlu4, mGlu7 y

mGlu8 respectivamente (Goudet et al., 2012). También existen antagonistas ortostéricos, siendo (RS)- α -methylserina-O-fosfato (MSOP) el más usado para la inhibición de receptores mGlu del grupo III.

Por otro lado, existen diversos moduladores alostéricos positivos (PAM) de los mGlu del grupo III que afectan a mGlu7 como el VU0155094, con una EC_{50} de 3,2, 1,5 y 0,9 μ M para mGlu4, mGlu7 y mGlu8 (Jalan-Sakrikar et al., 2014). Hasta hace poco, el único PAM específico de mGlu7 era el AMN082, con una EC_{50} de 260 nM. Pero, a pesar de su especificidad por el receptor mGlu7, AMN082 presenta efectos no específicos, como la inhibición del transportador de serotonina (Ahnaou et al., 2016). Recientemente, se ha descrito el papel del compuesto CVN636 como modulador alostérico capaz de activar mGlu7 a bajas concentraciones (EC_{50} de 7 nM) y de manera específica, además de presentar eficacia en modelos *in vivo* (Dickson et al., 2023). Por último, sí existen varios moduladores alostéricos negativos (NAM) relativamente selectivos para mGlu7 como MMPIP y ADX71743.

1.2. Mecanismos presinápticos de Plasticidad

El término **plasticidad** se refiere a la capacidad de modificación de los circuitos neuronales mediante su actividad. Los procesos de plasticidad sináptica se deben a modulaciones en la eficacia de la transmisión sináptica que provocan cambios en la **fuerza sináptica**, definida como la capacidad que tiene una neurona de generar corrientes en la neurona postsináptica. Este proceso dependerá de tres factores fundamentales: el **número de sitios de liberación**, que está relacionado con el número de vesículas preparadas para la fusión (tamaño de la RRP), la **probabilidad de liberación de cada una de estas vesículas (p_{ves})** y el **tamaño cuantal**.

Por **sitio de liberación** se entiende el complejo proteico capaz de madurar las VS a un estado de anclaje y cebado y de mediar su fusión con la membrana de la ZA en respuesta a la entrada de Ca^{2+} por los VGCCs. El número de estos sitios de liberación se correlaciona funcionalmente con el tamaño de la RRP. La p_{ves} dependerá de la composición molecular de estos sitios de liberación, que regulará la respuesta de estos a la entrada de Ca^{2+} , así como de su posición relativa a los VGCCs en la ZA, siendo los sitios de liberación más cercanos a los VGCCs los que tienen mayor p_{ves} (Brockmann et al., 2019; Heine & Holcman, 2020). Finalmente, el **tamaño cuantal** es la respuesta generada en la neurona postsináptica por la liberación de una única

Introducción

VS, dependiente tanto de la cantidad de NT que contenga dicha VS como del número de receptores postsinápticos que se activen. Los procesos de plasticidad sináptica más estudiados se centran en los cambios en estos receptores postsinápticos, conocidos como **plasticidad postsináptica**. Por otro lado, también existen procesos de **plasticidad presináptica**, debidos a cambios en el número de sitios de liberación y/o la p_{ves} (Gou et al., 2022), que tienen también un gran impacto en la actividad de los circuitos neuronales y en el aprendizaje.

Algunos de los fenómenos de plasticidad presináptica a corto plazo mejor descritos son: 1) **depresión** sináptica a corto plazo (STD); 2) **facilitación** sináptica a corto plazo (STP); y 3) **potenciación** post-tetánica acumulativa (PTP). Estos mecanismos coexisten en las mismas sinapsis, y su efecto global en la plasticidad depende de la contribución relativa de cada uno que, a su vez, estará determinada por las propiedades particulares de la sinapsis.

La **depresión** sináptica es un proceso plástico que ocurre en el rango temporal de milisegundos y normalmente se explica por la depleción de la RRP. Si después de la liberación de neurotransmisor en respuesta a un estímulo no se produce un reemplazo inmediato de la RRP, habrá un menor número de VSs listas para la exocitosis. La magnitud de esta depleción de la RRP dependerá del número de VSs en la RRP, así como del número de vesículas fusionadas por un potencial de acción, que dependerá de p_{ves} . Un paradigma de depresión sináptica es la depresión por pares de pulsos (PPD), que ocurre cuando se aplican dos estímulos, que provocan la liberación de neurotransmisor de un terminal sináptico, separados por un periodo de tiempo pequeño. Cuanto mayor sea la p_{ves} de una sinapsis determinada, más vesículas de la RRP se fusionarán en el primer estímulo y menos quedarán para poder fusionarse con el segundo, dando lugar a un cociente menor de la unidad entre la corriente generada por el segundo estímulo y la generada por el primero. De acuerdo con este modelo, la recuperación de la depresión depende de la tasa de recuperación o reposición de la RRP, que normalmente tarda segundos, provocando que las sinapsis con una alta p_{ves} sufran depresión. Sin embargo, elevaciones de la $[Ca^{2+}]$ presináptica pueden acelerar dicha tasa de reposición de la RRP, concretamente, mediante la activación de Munc13 dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (Lipstein et al., 2013).

Otro factor importante en la depresión sináptica es la inactivación de los canales de Ca^{2+} . Las subunidades $\beta\gamma$, provenientes de proteínas G heterotriméricas del tipo $G_{i/o}$, se unen directamente a los canales de tipo N y P/Q en su región intracelular y causan una reducción de la entrada de Ca^{2+} en los terminales (Mochida, 2019). Otras teorías propuestas para explicar la depresión sináptica son la inactivación de los sitios de liberación tras la exocitosis (Hosoi et al., 2009), y alteraciones en la bomba $\text{Na}^+/\text{K-ATPasa}$ que pueden afectar a la excitabilidad de las neuronas (Muñoz-Cuevas et al., 2004).

La depleción de la RRP se intensifica durante la estimulación de las sinapsis a alta frecuencia y durante periodos prolongados de tiempo. En algunas sinapsis, la **facilitación** contrarrestará la depresión, aumentando la p_{ves} de una manera dependiente de frecuencia o aumentando el tamaño de la RRP. Una de las primeras explicaciones para la facilitación durante estimulaciones de alta frecuencia es la teoría del Ca^{2+} residual. Según esta idea, la facilitación es el resultado de la entrada de Ca^{2+} durante un segundo estímulo cuando aún hay Ca^{2+} residual de un primer estímulo en el terminal presináptico (Katz & Miledi, 1968). Sin embargo, la gran disparidad entre la $[\text{Ca}^{2+}]$ que dispara la fusión y la $[\text{Ca}^{2+}]$ residual dio lugar a la hipótesis de que la facilitación depende de distintos sensores de Ca^{2+} . En concreto, los principales candidatos son proteínas con un dominio C2 capaz de unirse al Ca^{2+} como las sinaptotagminas 1-2, entre las cuales se incluyen RIM1, Munc13, DOC2 y la sinaptotagmina 7 (Jackman & Regehr, 2017). Otras hipótesis apuntan a un aumento en la corriente de Ca^{2+} dependiente de actividad y a la saturación de quelantes de Ca^{2+} . (Fioravante & Regehr, 2011).

Por último, la **potenciación post-tetánica** es un incremento de la fuerza sináptica que dura de decenas de segundos hasta minutos y que ocurre después de una estimulación de alta frecuencia. Además de afectar a la amplitud de los EPSCs, la potenciación post-tetánica aumenta la frecuencia de los mEPSCs. Al igual que ocurre en el caso de la facilitación, existen múltiples moléculas candidatas a mediar la PTP de una manera dependiente de Ca^{2+} . Entre estas proteínas se encuentran, PKC (Toonen & Verhage, 2007), CaMKII, sinapsina (Fiumara et al., 2007) y Munc13 (Shin et al., 2010).

Introducción

Cuando el cambio en la fuerza sináptica tiene una duración que va de minutos a horas se denomina **plasticidad a largo plazo**. Esto puede ocurrir debido a diversos mecanismos, como alteraciones en el flujo de Ca^{2+} por los VGCCs, cambios en la composición de la maquinaria exocitótica y las proteínas de la zona activa, o cambios en la excitabilidad del terminal presináptico. Uno de los casos más estudiados es la **potenciación presináptica mediada por cAMP** (Yang & Calakos, 2013).

1.2.1. Plasticidad mediada por cAMP

La potenciación mediada por cAMP ha sido estudiada en diversas sinapsis mediante el uso del activador de la adenilato ciclasa, forskolina. Así, se ha descrito en las sinapsis entre las células granulares y las neuronas de Purkinje del cerebelo (Chen & Regehr, 1997), en la sinapsis del Caliz de Held (Kaneko & Takahashi, 2004; Yao & Sakaba, 2010) y en la sinapsis entre las fibras musgosas y las neuronas piramidales de CA3 (Castillo et al., 2002). En estos estudios se observó que el aumento en los niveles de cAMP provocaba una potenciación de la amplitud de los EPSCs, que no estaba asociado a un aumento en la amplitud de los mEPSCs, y que provocaba un cambio en la PPR y un aumento en la RRP, de manera que se asociaba a un mecanismo presináptico.

Algunos de estos estudios defienden que esta potenciación sináptica depende de la proteína PKA (Ji et al., 2008; Kobayashi et al., 2009; Weisskopf et al., 1994). Estos estudios se basan en que PKA es capaz de fosforilar a una gran cantidad de proteínas de la maquinaria exocitótica, como las proteínas con cadenas de cisteína (Evans et al., 2001), la snapina (Chheda et al., 2001), la syntaxina-1 (Boczan et al., 2004), la sinapsina (Hosaka et al., 1999) y a RIM 1 α (Lonart et al., 2003). También es capaz de afectar a la liberación mediante la fosforilación de canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , tanto presinápticos como postsinápticos (Hell et al., 1995; Huang et al., 1996; Murphy et al., 1993). Además de activar PKA, el cAMP también es capaz de activar los canales activados por nucleótidos cíclicos y por hiperpolarización (HCN). Estos canales están formados por una región central con seis dominios transmembrana (S1-S2) y una región carboxilo terminal de unión a nucleótidos cíclicos. En respuesta a la hiperpolarización de la membrana, después de un potencial de acción, se abrirán y contribuirán a la corriente activada por hiperpolarización, la cual afecta a la excitabilidad de las neuronas y contribuye al potencial de membrana en reposo, siendo importante para la coordinación de la actividad neuronal (Bender et al.,

2005; Poolos, 2012). Sin embargo, el desarrollo de fármacos que permitieron inhibir con mayor especificidad PKA dio lugar a estudios que indicaban que la potenciación mediada por cAMP es independiente de PKA en diferentes sinapsis del SNC (Sakaba & Neher, 2001). En concreto, trabajos en cultivos de neuronas corticales y en la sinapsis del Caliz de Held, demostraron que la potenciación por cAMP no dependía de PKA sino de Epac (del inglés exchange factor directly activated by cAMP) (Gekel & Neher, 2008; Kaneko & Takahashi, 2004; Sakaba & Neher, 2003).

Un ejemplo paradigmático de esta potenciación dependiente de cAMP se da en la sinapsis entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje (PF-PC) en el cerebelo. En 1996 Salin y colaboradores (Salin et al., 1996) descubrieron una LTP presináptica en esta sinapsis que era dependiente de cAMP, que implicaba un aumento en la liberación de NT y que persistía a pesar de bloquear la entrada de Ca^{2+} postsináptico. Estudios posteriores observaron que esta potenciación estaba mediada por la activación de una adenilato ciclasa activada por Ca^{2+} y que implicaba un aumento en la probabilidad de liberación de las sinapsis (Chen & Regehr, 1997; Storm et al., 1998).

Esta LTP presináptica presenta similitudes con la LTP presináptica de las fibras musgosas del hipocampo y, al igual que la LTP de las fibras musgosas, requiere de las proteínas Rab3A y RIM1 α (Castillo et al., 2002). Sin embargo, algunos estudios más recientes sugieren que RIM1 α no es necesaria para esta plasticidad (Kintscher et al., 2013).

El protocolo de inducción de la LTP presináptica consiste en una estimulación de 4-10 Hz que aumenta los niveles de Ca^{2+} en el terminal presináptico. Esta dependencia de Ca^{2+} se demostró en experimentos en los que el cambio de la $[Ca^{2+}]$ extracelular de 1,5 a 1,25 mM fue capaz de prevenir la inducción de la LTP. Sin embargo, en otro estudio se observó que el Ca^{2+} que entra por los canales de tipo N y P/Q no contribuye a la inducción de la LTP, sino que se debe a la entrada de Ca^{2+} por los canales de tipo R, los cuales requieren de una estimulación de alta frecuencia para abrirse (Myoga & Regehr, 2011). Este aumento de Ca^{2+} provoca la activación de la adenilato ciclasa y la consiguiente generación de cAMP, que podría activar a la proteína PKA, sin embargo, mutaciones que impiden la interacción entre PKA y RIM1 α no afectaron a la inducción de la LTP (Kaeser et al., 2008). Otra proteína

Introducción

candidata para participar en esta LTP es Epac2, presente en el cerebelo (Kawasaki et al., 1998) y cuya supresión impide la LTP dependiente de cAMP en las fibras musgosas hipocampales (Fernandes et al., 2015).

Esta LTP presináptica está también regulada por la producción de endocannabinoides (eCBs) por las PCs. El aumento de Ca^{2+} postsináptico, causado por la coactivación de las PCs por las CFs y por las PFs, induce la producción de eCBs, los cuales activarán al receptor CB1 en la presinapsis, inhibiendo la síntesis de cAMP y favoreciendo la depresión de las sinapsis (van Beugen et al., 2006).

Otro mecanismo de plasticidad a largo plazo es la **LTD dependiente de cAMP**, la cual ha sido estudiada en la sinapsis entre las fibras musgosas y las neuronas piramidales de CA3 (Tzounopoulos et al., 1998), en la sinapsis entre interneuronas hipocampales y neuronas piramidales del hipocampo (Chevaleyre et al., 2007) y en sinapsis del núcleo accumbens (Mato et al., 2008). Esta plasticidad requiere la activación de los receptores de endocannabinoides o de los receptores mGluR2/3, los cuales se acoplan a una proteína $G_{i/o}$, provocando una inhibición de la adenilato ciclasa y, por tanto, inhibiendo la señalización mediada por cAMP.

Además de ser activada por Ca^{2+} , trabajos previos de nuestro grupo en sinaptosomas demostraron que la potenciación mediada por cAMP en los terminales corticales podía ser inducida por la activación de receptores β -AR (Ferrero et al., 2013), lo cual se demostró también se encontró en experimentos de electrofisiología en la corteza prefrontal (Huang & Hsu, 2006). Estos estudios indican que la activación de los receptores β -AR pueden ser el origen de la activación de la adenilato ciclasa en las potenciaciones inducidas por cAMP y, debido a la extensa inervación noradrenérgica del cerebelo (Abbott & Sotelo, 2000), es posible que la LTP presináptica PF-PC también pueda ser inducida mediante la activación de los receptores β -AR. Por tanto, para comprender adecuadamente los mecanismos implicados en esta plasticidad habría que tener en cuenta el papel de la potenciación de la liberación mediada por receptores β -AR y Epac (Ferrero et al., 2013) en esta vía de señalización

1.2.2. Mecanismos de plasticidad sináptica mediados por β -ARs

La noradrenalina tiene un papel crucial en todos los aspectos del aprendizaje y la memoria, incluyendo la adquisición, la consolidación y la extinción (Sara, 2009). Aunque la señalización noradrenérgica está mediada tanto por los receptores α como por los β -adrenérgicos, estos últimos tienen una mayor importancia en el control del aprendizaje (Hagena et al., 2016; O'Dell et al., 2015). Esto se ha contrastado en estudios *in vivo* donde los antagonistas de los β -ARs han sido capaces de inhibir la adquisición y la consolidación del condicionamiento de miedo (Díaz-Mataix et al., 2017; Ji, Wang, et al., 2003), el aprendizaje espacial (Zhang, et al., 2003) y otras formas de aprendizaje asociativo (Gray et al., 2015; Mello-Carpes et al., 2016).

Los β -ARs están implicados en múltiples procesos plásticos en el hipocampo. Uno de estos procesos es la LTP entre las SC y las neuronas piramidales de CA1, que depende de la síntesis de proteínas, puede durar horas y está implicada en la formación de memorias dependiente del hipocampo (Abraham & Williams, 2008). Aunque los β -ARs no son necesarios para esta LTP (Murchison et al., 2004), la activación de los β -ARs facilita la inducción de esta ante estímulos de inducción menos intensos (Gelinas & Nguyen, 2005), haciendo que la presencia de noradrenalina afecte al comportamiento plástico de esta sinapsis. Posteriores estudios centrados en la modulación de esta sinapsis por β -ARs encontraron que la facilitación inducida por pares de pulsos, característica de esta sinapsis, estaba reducida en los ratones *knockout* para los receptores β_1 y también en los *knockout* para β_2 , aunque también se encontraron cambios en los niveles de proteínas postsinápticas que interactúan con los β -AR, indicando un lugar de acción tanto pre- como postsináptico (Qian et al., 2012). Recientemente, el trabajo de Jami et al., 2023 ha demostrado que, mientras que el papel de los receptores β -ARs en esta LTP es simplemente facilitar su inducción en la región dorsal del hipocampo, es imprescindible para la inducción de esta LTP en la región ventral, acoplándose a distintas vías de señalización que implican la fosforilación de los receptores de NMDA y AMPA así como la regulación de los VGCCs de tipo L. El hipocampo dorsal está normalmente asociado al aprendizaje espacial, mientras que su región más ventral está implicada en el aprendizaje dependiente de contexto (Moser & Moser, 1998), por lo que estos estudios demuestran que los β -ARs presentan una diversidad

Introducción

funcional que les permite ejercer distintas modulaciones implicadas en distintos aprendizajes.

Debido a la estrecha asociación entre el sistema noradrenérgico y la respuesta de estrés, no es de extrañar que estudios, tanto en modelos animales como en humanos, hayan demostrado que el estrés agudo es capaz de provocar importantes alteraciones en la plasticidad sináptica en el hipocampo (Kim et al., 2015). La respuesta de estrés es capaz de modular distintos efectos en distintas sinapsis en respuesta a distintas condiciones estresantes. Un ejemplo de esto, es la facilitación de la LTP, entre las neuronas piramidales de CA1 y el subículo en respuesta a estrés agudo en ratas, mediada por los β -ARs (Bartsch et al., 2021). Esta modulación dependiente de estrés también se observa en otras regiones relacionadas con la generación de conductas en respuesta a agentes estresantes, como es el caso de la sinapsis entre las aferencias talámicas y las neuronas de la amígdala basolateral, en la que la activación de los β -ARs es necesaria para el cambio de un comportamiento de exploración a un comportamiento defensivo ante una amenaza (Khalil et al., 2023).

Como cabe esperar debido a su extensa inervación noradrenérgica (Abbott & Sotelo, 2000), los β -ARs están también implicados en la plasticidad y la regulación del comportamiento asociado al cerebelo. La activación de los β -ARs facilita la inducción de la LTP postsináptica entre las PF y las PC (Lippiello et al., 2015), aunque otros estudios indican que también facilita la inducción de la LTD postsináptica en estas neuronas (Inoshita & Hirano, 2021). La facilitación de la inducción de la LTP también ocurre en las sinapsis inhibitoras entre las interneuronas de la capa molecular del cerebelo y las PC mediante la activación de PKA (Kitagawa et al., 2009). La relevancia funcional, a nivel comportamental, de estas modulaciones puede verse en estudios en los que la modulación farmacológica del receptor β -AR afecta a comportamientos asociados al cerebelo como el reflejo vestíbulo-ocular (VOR). En estos experimentos se observó que el agonista isoproterenol mejoraba la potenciación adaptativa en la oscuridad, mientras que el antagonista, sotalol, reducía la adaptación tanto a la oscuridad como a la luz (van Neerven et al., 1990). Se ha observado también que el bloqueo de los β -ARs, mediante la administración sistémica de propranolol, impide el aprendizaje del condicionamiento de parpadeo

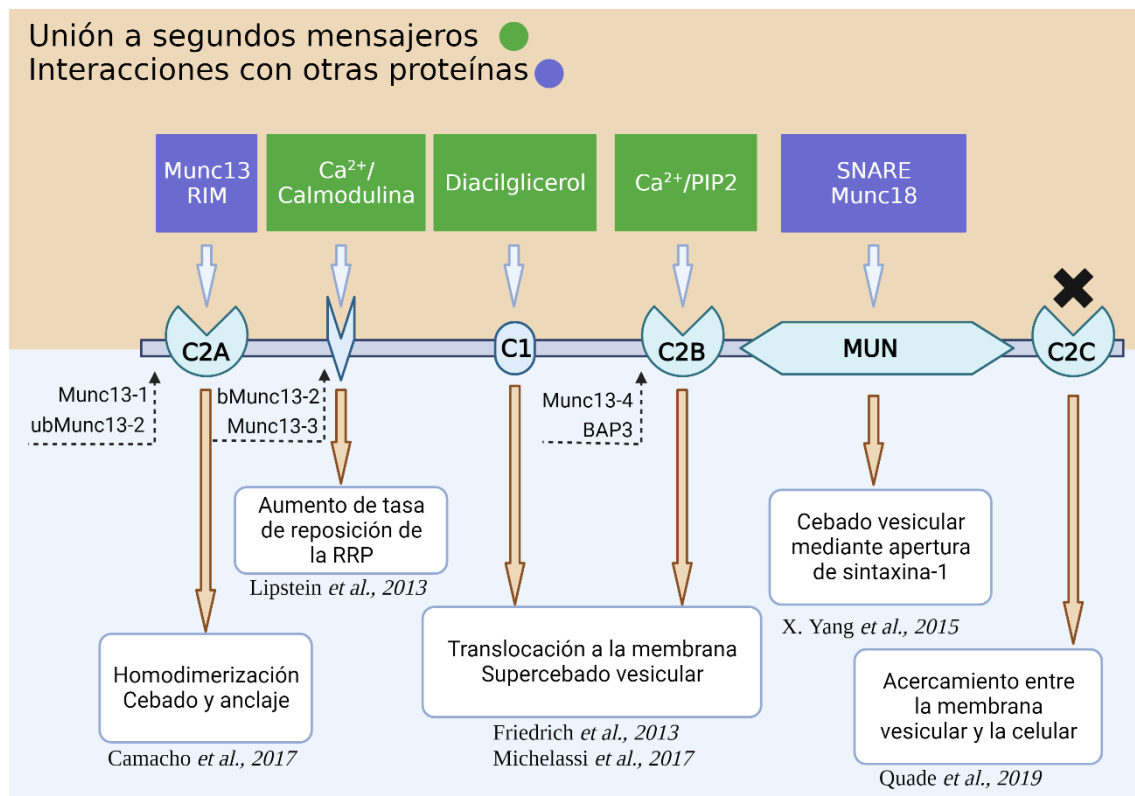
en conejos y en ratas, el cual también está mediado por el cerebelo (Cartford et al., 2002; Gould, 1998).

1.2.3. Mecanismos de plasticidad sináptica mediados por Munc13

La regulación de Munc13 por la actividad neuronal y por segundos mensajeros hace que tenga un papel fundamental en la plasticidad a corto plazo. Uno de los dominios implicados en esta regulación es el dominio de unión a Ca^{2+} /calmodulina, el cual se ha estudiado ampliamente en las isoformas Munc13-1 y ubMunc13-2. Este dominio presenta una región de unión que no tiene homología con otros dominios de unión a calmodulina conocidos y presenta residuos hidrofóbicos en las posiciones 1, 5, 8 y 26 que se unirán a Ca^{2+} , siendo el motivo de unión a calmodulina conocido más largo. Tiene una estructura modular, con un módulo C que consiste en los residuos 1, 5 y 8, que se unirán al dominio C-terminal de calmodulina, y un módulo N, que consiste en el residuo 26 de triptófano, que se unirá a calmodulina en su dominio N-terminal (Rodríguez-Castañeda et al., 2010). Mientras que los residuos 1, 5 y 8 se unen a calmodulina a concentraciones nanomolares de Ca^{2+} , el residuo de triptófano de la posición 26 se unirá a concentraciones más altas, lo cual permite que este dominio actúe como un sensor de Ca^{2+} a distintas concentraciones (Herbst et al., 2014). La importancia fisiológica de este dominio se ha demostrado en experimentos en el Caliz de Held. En estos se ha observado que durante trenes de alta frecuencia, el agotamiento de la RRP provoca una depresión a corto plazo que se estabiliza en el momento en el que se alcanza un equilibrio entre el restablecimiento de vesículas competentes para la fusión y su exocitosis (Pan & Zucker, 2009). Aunque la calmodulina está inactiva a concentraciones de Ca^{2+} basales (Chin & Means, 2000), el aumento de Ca^{2+} presináptico residual durante esta actividad intensa favorece su unión a Munc13, aumentando la velocidad de cebado, la tasa de recuperación de la RRP y, por tanto, permitiendo una tasa de disparo más rápida (Lipstein et al., 2013; Sakaba & Neher, 2001).

Introducción

La región de Munc13 formada por los dominios C1-C2B es la más importante a la hora de su regulación por segundos mensajeros. El dominio C1 de Munc13 está presente en las isoformas Munc13-1, Munc13-2 y Munc13-3 y se une mediante una región de dedos de zinc al DAG producido por la actividad de la PLC, así como a sus derivados sintéticos, los ésteres de forbol, con gran afinidad. Por otro lado, el dominio C2B está regulado por su unión a Ca^{2+} y al fosfolípido PIP_2 .



Esquema 4. Estructura de la proteína Munc13. Dominios de unión a segundos mensajeros presentes en la estructura de distintas isoformas de la proteína Munc13 y la modulación que ejercen en distintos procesos relacionados con la exocitosis de las vesículas.

La unión de estos dominios a sus respectivos ligandos provoca una redistribución de Munc13, haciendo que se transloque a la membrana. Elevaciones transitorias de Ca^{2+} son capaces de translocar Munc13-1 de manera temporal a la membrana, mediante la acción de la proteína Doc2B. Sin embargo, la acumulación de Munc13-1 en la membrana durante un periodo de tiempo más prolongado requiere de la unión de DAG a su dominio C1 (Friedrich et al., 2013). El aumento de DAG durante periodos de alta actividad permite una interacción más estable de Munc13-1 con la membrana plasmática (Basu et al., 2007), permitiendo su reclutamiento a microdominios de mayor concentración de DAG en la membrana plasmática y el cebado de nuevas VSs (Bauer et al., 2007). Además, se ha visto que la activación de Munc13-2 con ésteres de forbol en el hipocampo provoca un aumento de la RRP,

siendo posible que la translocación de Munc13 a la membrana sea capaz de reclutar nuevas vesículas al RRP (Rosenmund et al., 2002).

Se ha demostrado que la eliminación del dominio C1 o C2B de Munc13 da lugar a un aumento en la liberación debido a un aumento en la p_{ves} . El módulo C1-C2B actúa como un regulador negativo del dominio MUNC que impide progresar el estado de cebado hasta un estado de “*supercebado*” (Michelassi et al., 2017a). Se ha descrito que la unión de DAG o Ca^{2+} a este dominio produce un cambio en la unión de Munc13 con la membrana, haciendo que pase de adoptar una posición perpendicular con la membrana a una paralela. (Xu et al., 2017). Este cambio en la interacción de Munc13 con la membrana facilita dicho *supercebado* de las VSs, aumentando la p_{ves} y favoreciendo su exocitosis con la llegada de Ca^{2+} (Palfreyman & Jorgensen, 2017). Esta potenciación dependiente de DAG y Ca^{2+} afecta tanto a la liberación dependiente de actividad como a la espontánea, y en el hipocampo se ha visto que afecta tanto a las neuronas glutamatérgicas como a las GABAérgicas. (Basu et al., 2007).

Las distintas isoformas de Munc13 presentan distintos dominios de interacción con segundos mensajeros y con otras proteínas de la zona activa. De esta manera la presencia de distintas isoformas de Munc13 en un mismo terminal presináptico aportan flexibilidad a la liberación del neurotransmisor. El dominio C2A de Munc13-1 le permite unirse a RIM, el cual se une a su vez a los VGCCs y se sitúa en regiones centrales de la ZA de manera que las vesículas en cuyo proceso de cebado participa Munc13-1 se situarán cerca de los VGCCs y tendrán una mayor p_{ves} . Por otro lado, las isoformas bMunc13-2 y Munc13-3 carecen del dominio C2A y por tanto las vesículas cebadas por estas isoformas tendrán una menor p_{ves} (Shin et al., 2010). Esto se mostró en experimentos en el Caliz de Held que demostraron la presencia de las isoformas Munc13-1, bMunc13-2 y Munc13-3 en estos terminales y vieron que, mientras que Munc13-1 se encuentra mayoritariamente en la zona central de la ZA, bMunc13-2 y 3 se encuentran en menor porcentaje, localizándose preferentemente en zonas adyacentes a la misma (Chen et al., 2013). Además, se comprobó que la eliminación de bMunc13-2 y 3 provocaba una disminución de la RRP, en concreto de un pool de liberación más lenta que tenía menor probabilidad de excitarse con la llegada de un único potencial de acción (Hosoi et al., 2007).

Introducción

Es importante destacar que la funcionalidad de las isoformas de Munc13 puede variar dependiendo de la sinapsis. Estudios en rodajas hipocampales vieron que la delección de Munc13-2 provoca una disminución en la probabilidad de liberación y un aumento en la facilitación por pares de pulsos en las sinapsis de las fibras musgosas con las neuronas piramidales de CA3, pero que no afecta a la probabilidad de liberación ni a la plasticidad a corto plazo de las sinapsis entre las colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales de CA1 (Breustedt et al., 2010). Esta falta de efecto en la plasticidad a corto plazo de Munc13-2 en el hipocampo fue descrita también en los terminales axónicos de neuronas piramidales de CA1 que sinaptan con interneuronas SOM/mGluR1 α . Estas interneuronas expresan Efn en la postsinapsis que es necesaria para la localización en la presinapsis del receptor mGluR7 y de bMunc13-2 en la presinapsis, sin embargo la delección de bMunc13-2 de estos terminales no provoca ningún efecto en la probabilidad de liberación de las vesículas ni en la facilitación por pares de pulsos (Holderith et al., 2021).

A pesar de la ausencia de efecto de Munc13-2 en la transmisión sináptica basal y en la plasticidad a corto plazo, Munc13-2 está implicado en procesos de plasticidad presináptica a largo plazo. Las sinapsis con Munc13-2 muestran una potenciación de la amplitud de los EPSCs después de una estimulación de alta frecuencia que se mantiene a lo largo del tiempo y que depende de su unión de DAG. Esta potenciación implica un aumento de la RRP y de la probabilidad de liberación en cultivos hipocampales (Rosenmund et al., 2002) y en rodajas de hipocampo en la sinapsis entre las SC y las neuronas piramidales de CA1 (Martín et al., 2018)

En el cerebelo Munc13-1 y Munc13-3 se co-expresan en los terminales presinápticos de las neuronas granulares, las cuales establecen sinapsis con distintos tipos celulares. Munc13-3 es importante en la regulación de los VGCCs y participa en el cebado de vesículas en las proximidades de estos canales que, por tanto, tienen una alta p_{ves} (Kusch et al., 2018). En las sinapsis con las neuronas de Purkinje, Munc13-3 aumenta la probabilidad de liberación y su delección provoca un aumento en la facilitación por pares de pulsos que, aunque no provoca problemas en la movilidad, sí que causa déficits en la coordinación y el aprendizaje motor (Augustin et al., 2001). Otros estudios encontraron que Munc13-3 también aumenta la probabilidad de liberación en las sinapsis entre neuronas granulares y células en cesto (Ishiyama et al., 2014) y con neuronas de Golgi (Beierlein et al., 2007). En estas

sinapsis Munc13-1 sigue siendo necesario para el cebado y su delección es letal, indicando que Munc13-3 y Munc13-1 ejercen funciones no redundantes (Ishiyama et al., 2014).

1.2.4. Mecanismos de plasticidad sináptica mediados por mGlu7

El receptor mGlu7 está implicado en varios procesos plásticos a largo plazo mediados por distintas vías de señalización. Experimentos en rodajas hipocampales pretratadas con el agonista L-AP4 demostraron que, en respuesta a activaciones prolongadas, el receptor mGlu7 se internaliza, lo cual es determinante para el desarrollo de procesos plásticos a largo plazo. El receptor mGlu7 se encuentra en los terminales de las sinapsis entre las fibras musgosas y las interneuronas del *stratum lucidum* de CA3 y, en respuesta a un protocolo de estimulación de alta frecuencia, media una LTD presináptica dependiente de PKC. Sin embargo, en rodajas previamente tratadas con el agonista L-AP4, el receptor mGlu7 se internaliza, haciendo que el mismo protocolo de estimulación provoque una LTP (Pelkey et al., 2005). Otro estudio en el hipocampo demostró que la desinhibición de las neuronas piramidales por reducción de la transmisión inhibitoria mediada por receptores mGlu7 localizados en los terminales de las interneuronas PV de CA1 es necesaria para que ocurra la LTP postsináptica entre las SC y las neuronas piramidales de CA1 (Klar et al., 2015).

mGlu7 también está implicado en procesos de plasticidad a corto plazo en regiones del hipocampo. Trabajos previos del laboratorio han demostrado que la activación de receptores mGlu7 en los terminales de las SC que establecen sinapsis con las neuronas piramidales de CA1 mediante estimulaciones de alta frecuencia inducen una cascada de señalización mediada por DAG y Munc13-2 que potencia, de manera transitoria, la liberación de glutamato (Martín et al., 2018). En CA1 también se ha descrito que mGlu7 se sitúa de manera específica en los terminales de las neuronas piramidales que establecen sinapsis con las interneuronas con inmunorreactividad para STT. La proteína Elfn1 situada en la región postsináptica de las interneuronas STT interacciona con el receptor mGlu7 situado en la presinapsis y facilita su activación constitutiva, causando la inhibición tónica de la liberación y, por tanto, de la sinapsis. Esta inhibición hace que la sinapsis presente facilitación ante estimulaciones de alta frecuencia, mientras que la interrupción de la interacción

Introducción

entre mGlu7 y Elfn1 provoca que, estos mismos protocolos, causen una depresión sináptica (Stachniak et al., 2019).

Además de en el hipocampo, mGlu7 está implicado en la plasticidad a largo plazo en la amígdala. El agonista AMN082 bloquea la inducción de la LTP en las sinapsis entre las aferencias que provienen del tálamo y la amígdala en rodajas de rata y de ratón (Fendt et al., 2008, 2013). Esta sinapsis está asociada a la aversión y al aprendizaje emocional y el bloqueo de la LTP *in vitro* se ha correlacionado con el bloqueo de aprendizajes asociados al miedo tras la inyección de AMN082 en la amígdala de ratones.

La relevancia neurofisiológica del receptor mGlu7 se pone de manifiesto al tener en cuenta que alteraciones en humanos que dan lugar a la delección heterocigota del gen que codifica para el receptor mGlu7 están asociadas a problemas del desarrollo como el TEA (trastornos de espectro autista) (Gai et al., 2012; Y. Liu et al., 2015) y algunas variantes bialélicas de este gen están asociadas a epilepsia, microcefalia y atrofia cerebral (Marafi et al., 2020). En este mismo sentido, la alteración de su actividad fisiológica debido a manipulaciones genéticas está relacionada con diversas patologías y problemas cognitivos. Los animales *knockout* para mGlu7 muestran un peor aprendizaje en las pruebas de condicionamiento aversivo por sabor, en el cual está implicada la amígdala (Goddyn et al., 2015), así como en pruebas que dependen de memoria a corto plazo como el laberinto radial de 4 u 8 brazos (Callaerts-Vegh et al., 2006). mGlu7 también está implicado en otros tipos de memoria como demuestra el hecho que la administración del modulador alostérico negativo de mGlu7, MMPIP, cause un peor desempeño en las tareas de reconocimiento de objetos y de lugares (Hikichi et al., 2010).

Además, estudios en modelos animales indican que el receptor mGlu7 protege frente a los ataques epilépticos. Cuando se analizaron los efectos del *knockout* de cada uno de los mGlu en un modelo de ratón, se observó que únicamente el *knockout* del receptor mGlu7 presentaba una mayor susceptibilidad a la aparición de ataques epilépticos espontáneos y que presentaba una mayor susceptibilidad a los fármacos pro-convulsivos como el pentilenotetrazol (Sansig et al., 2001). Otros estudios demostraron que la deslocalización de mGlu7 de los terminales presinápticos causada por mutaciones en la proteína PICK1 (Bertaso et al., 2008) o

en la proteína Efn1 (Tomioka et al., 2014) causaba crisis de ausencia y convulsiones inducidas por estímulos sensoriales respectivamente, indicando que el receptor mGlu7 presenta un papel antiepiléptico. El consenso de estos estudios es que el fenotipo epiléptico se debe a la pérdida de la inhibición mediada por mGlu7 de la transmisión sináptica excitadora, sin embargo, los estudios de nuestro grupo muestran que la activación fisiológica de este receptor durante estimulaciones de alta frecuencia de la SC dan lugar a una potenciación de la transmisión sináptica excitadora (Martín et al., 2018), lo que estaría en contra de esta hipótesis. Por tanto, parece pertinente revisar donde radica la acción antiepiléptica de mGlu7. En este sentido, dado que mGlu7 también se localiza en aferencias inhibitorias sobre las neuronas piramidales de CA1 (Somogyi et al., 2003) donde actúa como heteroreceptor reduciendo la liberación de GABA (Klar et al., 2015), si se demostrara que en dichas sinapsis la activación endógena de mGlu7 también potencia la liberación de NT, como nuestro grupo ha descrito en sinapsis SC-CA1 (Martín et al., 2018), esto explicaría el conocido papel anti-epiléptico de este receptor.

1.3. Síndrome del X Frágil

El síndrome del X Frágil (FXS, del inglés *Fragile X Syndrome*), es la causa más común de discapacidad mental heredada y es una causa monogénica de TEA (Hagerman & Hagerman, 2008) representando entre el 2 – 6 % de los casos totales (Schaefer & Mendelsohn, 2008). La prevalencia del FXS es aproximadamente 1 de cada 5000 niños y 1 de cada 8000 niñas (Tassone et al., 2012). EL FXS está causado por mutaciones en el gen *Fmr1* situado en el cromosoma X que causan una expansión del triplete de nucleótidos CGG en la región no traducida 5' del gen (Sutcliffe et al., 1992). Este número de tripletes se expande con cada generación, pasando de un estado de premutación (55 – 200 tripletes) a la mutación completa en su descendencia (> 200 tripletes) (Bagni et al., 2012). Al alcanzar más de 200 repeticiones el gen sufre una metilación que da lugar a la inactivación de su transcripción y a la pérdida de la proteína FMRP (del inglés Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1 (Bruford & On Behalf Of The Hugo Gene Nomenclature Committee Hgnc, 2022) o Fragile X Multifunctional RNA-binding Protein (Khandjian et al., 2022)).

Los individuos afectados por esta mutación presentan características fenotípicas características como una cara elongada, orejas prominentes, hipermovilidad de

Introducción

articulaciones y macroorquidismo (Hagerman et al., 2017). Además, es común que desarrollen alteraciones del comportamiento durante la infancia como ansiedad (58 - 86 %), trastorno por déficit de atención e hiperactividad (80 % en hombres y 40% en mujeres) así como discapacidad intelectual (85% en hombres y 30% en mujeres) y problemas de lenguaje (100% en hombres y 75% en mujeres). Este fenotipo está atenuado en mujeres debido a la presencia de un segundo cromosoma X no afectado por las mutaciones que presenta cierto grado de activación. Otro fenotipo posible es el que se da en los casos de mosaicismo, con algunas líneas celulares que presentan la mutación completa del gen y otras en el rango de premutación que presentan problemas inherentes a la premutación como la tremor/ataxia asociada a FXS (Hagerman & Hagerman, 2015).

Los individuos afectados por FXS suelen mostrar también problemas motores que aparecen durante la infancia, entre los que se incluyen comportamientos motores atípicos (Zhang et al., 2017) y un retraso en el aprendizaje de habilidades motoras (Hinton et al., 2013). Los problemas motores son más pronunciados en niños con FXS que también presentan TEA y, a diferencia de los problemas motores que aparecen en otros tipos de TEA, son uno de los primeros síntomas que indican un desarrollo atípico. En otros estudios se encontró que las habilidades motoras finas divergen de las que presentan niños con un desarrollo típico a edades tan tempranas como los 6 (Roberts et al., 2016) y a los 9 meses (Roberts et al., 2009). Además, otros estudios encontraron que tanto el control motor fino como el grueso están afectados durante todo el desarrollo (Will et al., 2018; Zingerevich et al., 2009). También se ha encontrado cierto grado de disfunción motora en los individuos con un estado de premutación y con síndrome de tremor/ataxia asociado a X Frágil (Loesch et al., 2021).

A nivel estructural, los individuos con FXS presentan problemas en la conectividad cerebral y tienen estructuras aberrantes en varias regiones del cerebro (Dennis & Thompson, 2013). Los pacientes muestran además una peor integridad axonal con un volumen de materia blanca mayor o menor de lo normal dependiendo de la región del cerebro (Sandoval et al., 2018). Los análisis de muestras humanas, así como los experimentos en modelos animales, sugieren que el FXS, así como el TEA, entran dentro de la categoría de sinaptopatías, en las cuales las espinas dendríticas muestran una morfología y una densidad aberrantes (Zoghbi & Bear,

2012). En concreto, los pacientes con FXS muestran una mayor densidad de espinas dendríticas en los segmentos distales de las dendritas apicales y basales en la corteza cingulada, la corteza temporal y visual. Se ha encontrado además que hay un mayor número de dendritas elongadas, y por lo tanto inmaduras, en comparación con las espinas cortas maduras (Martínez-Cerdeño, 2017).

Existen numerosos modelos animales para estudiar la ausencia de FMRP. Uno de los más utilizados es en el que el gen *Fmr1* se encuentra silenciado gracias a la incorporación de un vector, pMG5, que presenta un casete génico de neomicina en el exón 5 (The Dutch-Belgian Fragile X Consortium, 1994). Este ratón (*Fmr1KO*) es fértil, presenta una esperanza de vida igual a la de los ratones WT y carece de proteína FMRP en los testículos, riñones, hígado y cerebro. Una de las limitaciones de este modelo es que, al no ser un *knockout* condicional, el gen *Fmr1* está ausente desde la fertilización, mientras que en individuos con FXS sí que se traduce FMRP durante las primeras semanas del desarrollo (Zhou et al., 2019). Sin embargo, presentan características fenotípicas que difieren de las de animales que expresan FMRP y que, en muchos casos, se asemejan a las observadas en pacientes de FXS. Entre ellas cabe destacar la hiperactividad, alteraciones en la interacción social, problemas de aprendizaje y memoria (Bernardet & Crusio, 2006; Oddi et al., 2013; Santos et al., 2014). Este modelo muestra también problemas en el procesamiento olfatorio y en el control inhibitorio (Larson et al., 2008). Los primeros estudios encontraron también problemas en el test del laberinto de Morris, una prueba en la que el ratón debe encontrar una plataforma escondida usando pistas visuales indirectas (D'Hooge et al., 1997), sin embargo, estos resultados no se reprodujeron en otros laboratorios (Dobkin et al., 2000). Además, al igual que en los humanos con síndrome de X Frágil, los ratones *Fmr1KO* también muestran problemas en el aprendizaje motor, aunque no muestran alteraciones en las funciones motoras básicas (Padmashri et al., 2013).

A nivel molecular, un estudio inicial en el que se co-inmunoprecipitaron complejos de FMRP-RNA de cerebro de ratón, identificó mediante un análisis de microarray 432 mRNA distintos que interactuaban con FMRP (Brown et al., 2001) mientras que un estudio posterior encontró 842 genes regulados negativamente por la proteína FMRP (Darnell et al., 2011). En línea con estos estudios, el análisis realizado por Tabet y colaboradores (Tabet et al., 2016) en cultivos de neuronas

Introducción

corticales de ratón identificó 595 mRNA que se unían a FMRP, de los cuales el mRNA que codificaba para la diacilglicerol quinasa kappa (*Dgkk*) era la diana principal de FMRP. En este trabajo sugieren que FMRP regula positivamente la traducción de *Dgkk*, quizás mediante la represión de los miRNA que afectan a su traducción (Vasudevan & Steitz, 2007). *Dgkk* forma parte de las quinasas de diacilglicerol que cataliza la conversión de DAG a ácido fosfatídico (PA) y la ausencia de FMRP estaría desregulando la señalización mediada por DAG y PA. En concordancia con esta teoría, encontraron niveles incrementados de DAG en neuronas de ratón knockout para *Fmr1* y en células de cerebelo de humanos FXS. DAG está implicado en la señalización en vías de tráfico, secreción y reorganización del citoesqueleto mediante la unión a dominios C1, uniéndose a proteínas como PKC, PKD y Munc13 (Almena & Mérida, 2011; Hama et al., 2004). Además, DAG está implicado en el balance crecimiento/desestabilización de las espinas dendríticas (Kim et al., 2010). El grupo de Tabet mostró que la reducción de la actividad de *Dgkk* en áreas del estriado de cerebros de ratón provocaba cambios en la morfología y funcionalidad de las espinas dendríticas, los cuales podían rescatarse mediante la sobreexpresión de FMRP en neuronas de ratón Knockout para FMRP, demostrando el enlace funcional entre FMRP y la actividad de *Dgkk*. Además de estas alteraciones en el metabolismo del DAG, los modelos animales de FXS exhiben alteraciones en la señalización por cAMP. El análisis de la expresión de mRNA de las adenilil ciclasas 3, 5 y 6 está disminuido en el tejido de estos ratones (Brown et al., 2001). Por otro lado, la fosfodiesterasa 2A (PDE2A), que es la única PDE presente en la zona activa asociada al anclaje de la vesículas (Maurin et al., 2018), presenta unos niveles incrementados en los ratones knockout para FMRP en comparación con los controles (Maurin et al., 2019).

Estudios de proteómica en ratones *Fmr1KO* han revelado un fenotipo presináptico alterado en estos ratones (Klemmer et al., 2011) ligado a una expresión alterada de proteínas presinápticas que participan en la excitabilidad, la homeostasis de Ca^{2+} y la liberación de neurotransmisor (Darnell et al., 2011). Los ratones *Fmr1KO* muestran diferencias en la expresión de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC) $Ca_v2.1$ y 2.2 y se ha comprobado que la ausencia de FMRP afecta a la expresión en membrana de los VGCC de tipo N y P/Q durante el desarrollo. En un trabajo en cultivos corticales, la ausencia de FMRP alteró la expresión de estos canales en individuos adultos en los cuales se encuentra un

mayor número de canales de tipo N en la membrana y un menor número de canales de tipo P/Q (Castagnola et al., 2018). FMRP afecta también a la homeostasis de Ca^{2+} uniéndose a la subunidad $\beta 4$ de los canales BK (del inglés: *big potassium*) los cuales regulan la repolarización y la duración de los potenciales de acción. Su ausencia en los ratones *Fmr1KO* provoca una disminución en la actividad de estos canales y un ensanchamiento de los potenciales de acción, dando lugar a una mayor entrada de Ca^{2+} en el terminal presináptico (Deng et al., 2013). Otros estudios en cultivos de neuronas hipocampales muestran que FMRP, además de afectar al tráfico de VGCC de tipo P/Q y N, interacciona directamente con estos canales mediando una inhibición en la liberación y en los ratones *Fmr1KO* se aprecia un aumento en la liberación de neurotransmisor (Ferron et al., 2014).

Las alteraciones a nivel presináptico causadas por la ausencia de FMRP se traducen a nivel funcional en cambios en la actividad basal y en la plasticidad de las sinapsis. Varios estudios han encontrado que los terminales de ratones *Fmr1KO* presentan un aumento en número de vesículas ancladas en la ZA y un mayor tamaño de la RRP (Deng et al., 2013; García-Font et al., 2019; Klemmer et al., 2011). Esto puede deberse a que, tanto los mayores niveles de DAG como la mayor concentración de Ca^{2+} presente en los terminales de ratones *Fmr1KO* (Deng et al., 2013; Tabet et al., 2016), son moduladores positivos de la proteína de la ZA Munc13 (Palfreyman & Jorgensen, 2017), la cual está implicada en los procesos de anclaje y cebado molecular que regulan la RRP. Esto puede alterar procesos de plasticidad sináptica que requieran modulaciones de la RRP, como se ha visto en la potenciación de la transmisión sináptica mediada por los β -AR, la cual requiere un incremento en el número de vesículas ancladas (Ferrero et al., 2013) y se pierde en sinapsis de la corteza cerebral de ratones *Fmr1KO* (García-Font et al., 2019). Al igual que esta última, otras plasticidades presinápticas dependientes de cAMP, como la LTP de la corteza cingulada, tampoco se observan en este modelo animal (Koga et al., 2015). Por tanto, la LTP de las PF-PC mediada por cAMP podría estar alterada en este modelo animal, explicando las alteraciones en el aprendizaje motor de estos animales y de los pacientes de X Frágil.

Objetivos

2. Objetivos

1.- Estudiar si la potenciación de la liberación de glutamato mediada por receptores β -adrenérgicos descrita en trabajos previos del grupo tiene lugar en las sinapsis entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje del cerebelo.

2.- Analizar la relevancia de la vía de señalización mediada por receptores β -adrenérgicos en la LTP presináptica dependiente de cAMP descrita entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje.

3.- Determinar si existen alteraciones en la potenciación de la liberación de glutamato mediada por receptores β -adrenérgicos que afecten a la LTP de las sinapsis entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje de ratones *Fmr1KO*.

4.- Estudiar la eficacia de estrategias de rescate farmacológicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, basadas en la reversión del exceso de Ca^{2+} presináptico por activación de receptores mGlu4 para restaurar las potenciales alteraciones en la transmisión sináptica y la plasticidad de las sinapsis entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje de ratones *Fmr1KO*.

5.- Analizar la eficiencia de la activación *in vivo* de mGlu4 por el modulador alostérico positivo VU0155041 para rescatar los déficits en el aprendizaje motor y social observados en los ratones *Fmr1KO*.

6.- Determinar si la modulación bidireccional de la transmisión sináptica mediada por el receptor mGlu7 descrita en sinapsis glutamatérgicas también tiene lugar en aferencias GABAérgicas sobre neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo y caracterizar las vías de señalización implicadas.

7.- Determinar los efectos en la transmisión sináptica de la activación fisiológica del receptor mGlu7 en las aferencias inhibitoras de las neuronas CA1.

Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

Las rodajas de tejido cerebral empleadas en electrofisiología y microscopía electrónica se obtuvieron de ratones (*Mus musculus*) adultos de 22-30 días de ambos sexos indistintamente. En los ensayos en los que se prepararon rodajas tras la inyección intraperitoneal de VU 0155041 también se emplearon ratones ≥ 3 meses. Las preparaciones de terminales sinápticos se realizaron a partir de cerebelos de ratones ≥ 3 meses de ambos sexos indistintamente. En cuanto a los experimentos conductuales, se realizaron en animales de ≥ 3 meses y solamente en machos para evitar variaciones en el comportamiento asociadas al ciclo estral.

Se emplearon ratones carentes de la proteína Epac2 (*Epac2^{-/-}*) (cedidos por el laboratorio del Doctor Seino S., Shibasaki et al., 2007), ratones carentes de la proteína FMRP (*Fmr1KO*; *The Jackson Laboratory*) y ratones carentes del receptor mGlu7 (*mGlu7^{-/-}*, *Toronto Centre for Phenogenomics*), todos con fondo genético C57BL/6J. Todas estas colonias se mantuvieron en heterocigosis para poder hacer experimentos con animales de la misma camada KO y WT, tras su genotipado a partir de muestras de tejido del pabellón auricular.

Los animales fueron criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, que es un centro autorizado para la cría de animales modificados genéticamente (EX-08-UCS). Todo el manejo de los animales necesarios para la elaboración del presente trabajo fue realizado siguiendo las recomendaciones éticas para experimentación con animales y regulaciones establecidas por la directiva del Consejo de la Unión Europea (2010/276:33-79/EU) y aprobadas por el Comité de Experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid y la Comunidad de Madrid (PROEX 012/18 y 177.1/21) y la junta de Andalucía (código 06/04/2020/049).

Materiales y Métodos

3.1.2. Reactivos y aparatos

Los reactivos, medios y fármacos utilizados quedan recogidos en las siguientes tablas:

Tabla 1. Reactivos y materiales		
Reactivo/Material	Casa comercial	Referencia
Determinación de segundos mensajeros		
Kit cAMP dynamic 2 kit	Cisbio	62AM4PEB
Determinación de Calcio citosólico		
Fura 2-AM	Life Technologies	F1221
SDS	Bio-Rad	161-0302
Tris	Bio-Rad	161-0719
Genotipado		
Wizard SV Genomic Purification System	Promega	AC2361
dNTPs (PCR Nucleotide Mix)	Promega	C1141
Go Taq G2 FlexiPol	Promega	M780B
oIMR ₂₀₆₀ 5'-CACGAGACTAGTGAGACGTG-3'	Sigma	
oIMR ₆₇₃₄ 5'-TGTGATAGAATATGCAGCATGTGA-3'	Sigma	
oIMR ₆₇₃₅ 5'-CTTCTGGCACCTCCAGCTT-3'	Sigma	
Epac2WTF 5'-TGAACAGATTTGTGACCGGAT-3'	Sigma	
Epac2WTR 5'-CTGATCACATTAGCAAGCTC-3'	Sigma	
Epac2 _{KOF} 5'-GCATACATTATACGAAGTTATC-3'	Sigma	
Epac2 _{KOR} 5'-CTGATCACATTAGCAAGCTTC-3'	Sigma	
Patrones de 100kb Real Escala 2	Real Laboratory	RBMM2
SYBR Safe 100X	Invitrogen	S33102
Agarosa	Sigma	A9539
Proteínasa K	Promega	V3021
Inmunofluorescencia		
ProLong Gold Antifade reagent con DAPI	Life Technologies	P36935
Paraformaldehído	Sigma	158012-7
Suero de cabra (NGS)	Jackson InmunoR	055-000-001
Suero de burro (NDS)	Jackson InmunoR	017-000-121
Portaobjetos rectangulares 76x26x1mm	LineaLab	D100001
Cubreobjetos de 15 mm	Thermo-Scientific	174969
β_1 -adrenoreceptor conejo	Santa Cruz	sc-568
Sinaptofisina 1 ratón	Synaptic Systems	101011
Alexa Fluor de burro 488 anti-Ratón	Invitrogen	A-21202
Alexa Fluor de burro 594 anti-Conejo	Invitrogen	A-21207
Poli-L-lisina (MW 70k-150k)	Sigma	P4707
Western Blot		
Acrilamida	Bio-Rad	1610100
Membranas de nitrocelulosa	Bio-Rad	1620146
β -actina	Sigma	A2228
IRDye 800	LI-COR Biosciences	925-32211
IRDye 680	LI-COR Biosciences	925-68020
β -mercaptoetanol	Bio-Rad	1610710
Microscopía electrónica		

Materiales y Métodos

Glutaraldehído 25% Grado I	Sigma	G5882
OsO ₄	Electron Microscopy Sci.	19172
K ₃ Fe(CN) ₆	Merk	1049840100
Kit SPURR embedding (Low Viscosity Medium)	TAAB	S024/D
Preparación de sinaptosomas		
Percoll	GE Healthcare	17-0891-02
EDTA	Merck	1.08418.0250
Sacarosa	VWR	27480.294
Liberación de glutamato		
Adenosina desaminasa (ADA)	Roche	10102105001
BSA (albúmina sérica bovina) sin ácidos grasos	Sigma	A6003
Glutamato	Sigma	G1626
EGTA	Sigma	E4378
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	Sigma	G2626
NADP ⁺	Calbiochem	481972

Tabla 2. Fármacos			
Fármaco	Casa comercial	Referencia	Efecto
8-pCPT	Biolog	C041	Activador específico de EPAC
Isoproterenol	Sigma	I6504	Agonista de los receptores β -adrenérgicos
L-AP4	Abcam	ab120002	Agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III
TTx	Abcam	120054	Bloqueante de los canales de sodio
Picrotoxina	Abcam	ab120315	Bloqueante de receptores GABA A
Propranolol	Sigma	P8688	Antagonista de los β - ARs
VU0155041	Tocris	3311	Modulador alostérico positivo de mGlu4
GTP γ S	Roche	10220647001	Análogo no hidrolizable del GTP
Metoprolol	Sigma	M5391	Antagonista del β_1 -AR
H89	Calbiochem	371963	Inhibidor de PKA
KT5720	Tocris	TO-1288	Inhibidor de PKA
ESI05	Biolog	M092	Inhibidor específico de Epac2
IBMX	Calbiochem	410957	Inhibidor de fosfodiesterasas
Calfostina C	Tocris	1626	Inhibidor de la unión de DAG

Materiales y Métodos

Tabla 3. Medios	
Medio	Composición
Estimulación kit cAMP	Tampón fosfato 50 mM, BSA 0,2 % (p/v), NaN ₃ 0,02% (p/v); pH 7,0.
HBM	NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaHCO ₃ 5 mM, NaH ₂ PO ₄ 1,2 mM, MgCl ₂ 1 mM, D(+)-glucosa 10 mM, Hepes 10 mM; pH 7,4.
HBM-BSA	HBM con BSA libre de ácidos grasos 16 μM
Lisis kit cAMP	HEPES 50 mM; KF 1M, Triton X-100 1,25% (v/v); pH 7,0.
Percolles	3, 10 y 23 % en sacarosa 0,32 M, EDTA 1mM y DTT 0,25 mM, pH 7,4.
Reactivo Biuret	CuSO ₄ 1,6 % (p/v), KNaC ₄ H ₄ O ₆ (tartrato de sodio y potasio) 6,0 % (p/v), NaOH 3,0 (p/v).
Sacarosa	Sacarosa 0,32; pH 7,4
TAE 1X	Tris 40 mM, 20 mM acetato, 1 mM EDTA; pH 8,3.
TBS	Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,9 % (p/v); pH 7,4
TBS con triton	TBS con triton X-100 al 0,2% (v/v).
Fluido cerebroespinal artificial (ACSF) para cerebelo	NaCl 119 mM, KCl 2,5 mM, MgSO ₄ 1,3 mM, CaCl ₂ 2,5 mM, NaHCO ₃ 26 mM, NaH ₂ PO ₄ , glucosa 10 mM, picrotoxina 100 μM; pH 7,3.
ACSF para hipocampo	NaCl 124 mM, KCl 2,69 mM, KH ₂ PO ₄ 1,25 mM, MgSO ₄ 2 mM, NaHCO ₃ 26 mM, CaCl ₂ 2 mM, glucosa 10 mM; pH 7,3.
Solución interna para cerebelo	Gluconato de Cesio 122,5 mM, HEPES 10 mM, BAPTA 10 mM, Mg-ATP 2 mM, NaCl 8 mM, QX-314-Br 5 mM; pH 7,3.
Solución interna para hipocampo	Metanosulfonato de Cesio 135 mM, KCl 5 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES 10 mM, NaCl 2 mM, Mg-ATP 5 mM, Na-GTP 0,4 mM, Na ₂ -fosfocreatina 10 mM; pH 7,2.

Tabla 4. Equipos	
Equipo	Fabricante
Determinación de segundos mensajeros	
Lector de placas FLUOStar Omega	BMG LabTech
Electrofisiología	
Controlador de temperatura TC-324C	Warner Instruments
Estimulador S38	GRASS
Unidad de aislamiento ISU 165	Cibertec
Amplificador	PC-ONE
Cámara digital sight DS U3	Nikon
Digidata 1322A	Axon Instruments
Microscopio directo eclipse fn1. Objetivos 10x,40x	Nikon
Puller P-97	Sutter Instruments
Vibratomo Leica TV 1200S	Leica Biosystems
Genotipado	
Sistema de electroforesis Hoefer miniVe	Pharmacia Biotech
Termociclador Mastercycler personal	Eppendorf
Fuente de alimentación EPS 601	Amersham Pharmacia
Fluor S Multimager	BioRad
Inmunofluorescencia	
Microscopio Nikon Diaphot TE2000 con cámara CCD Hamamatsu C4880	Nikon/Hamamatsu Photonics

Lámpara de mercurio de alta presión HB-10101AF	Nikon
Objetivo de inmersión Nikon 100X	Nikon
Liberación de glutamato	
Fluorímetros LS-50B y LS-55	Perkin-Elmer
Baño termostatzado Digiterm 100	JP Selecta
Cubetas ST-9012	Starna
Microscopía electrónica	
Microscopio electrónico de transmisión JEM 1010	JEOL
Ultramicrotomo ultracut	Leica
Preparación de sinaptosomas	
Centrífuga preparativa RC-5B y RC-5C	Sorvall
Rotor SS-34	Sorvall
Rotor SM-24	Sorvall
Bomba peristáltica PumpDrive 5201	Heidolph
Homogeneizador Potter S	B. Braun
Otros	
Microfuga Biofuge	Heraeus
Espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec III	Pegasus Scientific Inc.
Agitador magnético Agitamic-E	JP Selecta
Autoclave Autester ST Dry PV II	JP Selecta
pHmetro Basic20 con electrodo 5201	Crison
Equipos de agua destilada Elix y ultrapura Milli-Q A10	Millipore

3.2. Métodos

3.2.1. Electrofisiología

La técnica del patch-clamp es una herramienta metodológica desarrollada a finales de 1970 (Neher & Sakmann, 1976) con el objetivo de estudiar la actividad de los canales iónicos. Entre las distintas configuraciones que presenta, los registros de *whole-cell patch-clamp* permiten el estudio del comportamiento eléctrico de células vivas. Esta técnica se utiliza *in vitro* en rodajas de cerebro, en neuronas disociadas obtenidas de tejido fresco o en modelos de cultivo neuronal. Todas las técnicas de *patch-clamp* comienzan por la aproximación de una pipeta de registro a la neurona de interés que se encuentra en un baño con una composición iónica conocida. Se utilizan pipetas de borosilicato pulidas con resistencias del orden de 1 – 10 MΩ de resistencia y con diámetros en la punta del orden de 1 μm. Cuando la pipeta toca la célula, se aplica una succión en el interior de la pipeta que absorbe una pequeña porción de membrana plasmática en la pipeta, dando lugar a la formación de un sello que, si se realiza correctamente, aumenta la resistencia de tal manera que impide el paso de corriente entre la pipeta y el baño. Cuando se mide la resistencia

Materiales y Métodos

de este sello, es común encontrar cerca de los $10^{10} \Omega$. En el caso concreto de la configuración *whole-cell*, una vez formado el sello se aplica una fuerte succión para lograr la ruptura de la porción de membrana dentro de la pipeta, lo cual se detecta como la aparición de una corriente capacitativa en respuesta a la aplicación de voltaje. Esta ruptura de la membrana resulta en la continuidad entre la pipeta y el citoplasma de la neurona, lo cual permite registrar el potencial de membrana de la neurona mediante un electrodo situado en la pipeta en contacto con el citoplasma y otro electrodo situado en el baño (Cahalan & Neher, 1992). Mediante estos electrodos es posible registrar la actividad de los canales iónicos como cambios en el potencial de membrana, sin embargo, debido a que la actividad de los canales está afectada también por el potencial de membrana, es más útil controlar el potencial de membrana y registrar las corrientes producidas por estos canales. Esta configuración de *whole-cell* se denomina *voltage-clamp* y se da mediante un sistema de retroalimentación electrónica en el que el potencial de membrana se mide constantemente y cualquier desviación respecto del potencial establecido por el experimentador es corregida por la inyección de una corriente compensatoria por el electrodo situado en la pipeta de registro. Este electrodo estará, por un lado, detectando las corrientes en el citoplasma de la célula y, por otro lado, inyectando una corriente igual, pero de signo opuesto para mantener el voltaje de la membrana estable. Al acceder al interior de la célula en la configuración de *whole-cell*, se provoca la diálisis del contenido celular por el contenido de la pipeta de registro. Esto permite cambiar la composición iónica celular por la de un medio intracelular artificial situado en la pipeta de registro. Además, se puede añadir cualquier fármaco de interés en este medio, que difundirá al citoplasma y actuará de manera intracelular en la neurona, sin afectar a las células vecinas.

El uso de esta técnica en rodajas de cerebro da acceso a registrar la actividad de neuronas integradas en circuitos conservados hasta cierto punto, permitiendo observar sus respuestas en un entorno fisiológicamente relevante. Además, es posible realizar rodajas de regiones cerebrales determinadas, permitiendo una gran especificidad de región e incluso especificidad celular si estas neuronas expresan marcadores fluorescentes (Segev et al., 2016).

3.2.1.1 Obtención de rodajas cerebrales *ex vivo*

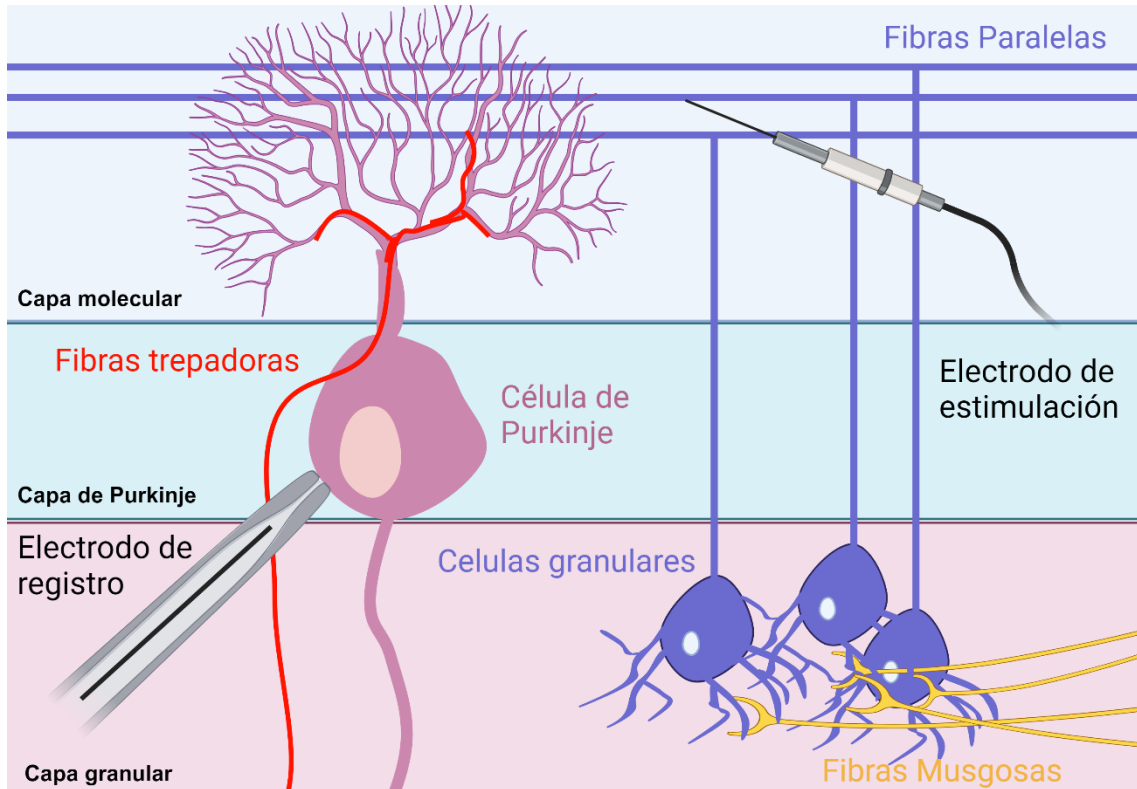
Los ratones se anestesiaron con isoflurano (1.5-2% en una mezcla de 80% aire sintético/20% oxígeno) y se decapitaron. Los cerebros se colocaron rápidamente en ACSF y con un vibratomo se obtuvieron rodajas, coronales de hipocampo o sagitales de cerebelo, de 325 μm de grosor. Estas se mantuvieron al menos 1 h en ACSF con burbujeo continuo de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) en una cámara a temperatura ambiente (21-24 °C). Después, las rodajas se sumergieron en la cámara de registro en estado de perfusión continua (1 mL/min) con medio ACSF gasificado que se mantuvo a 25°C utilizando un controlador de temperatura. En algunos experimentos se añadió ácido ascórbico 0,5 mM al ACSF para impedir la oxidación de la noradrenalina.

3.2.1.2 Registros de transmisión sináptica mediante *patch clamp* en configuración *whole-cell*.

Las células piramidales de CA1 en el hipocampo y las células de Purkinje en el cerebelo se visualizaron utilizando un microscopio Eclipse FN1 Nikon con objetivo de inmersión en agua 40x equipado con un condensador Nomarski. Las neuronas se identificaron por su morfología y, posteriormente, por sus propiedades electrofisiológicas características. Las pipetas de registro se obtuvieron a partir de capilares de pared gruesa de cristal de borosilicato (1,5 mm de diámetro externo) que se estiraron con un puller P-97 y se rellenaron con solución interna de cerebelo o de hipocampo. Los registros se obtuvieron utilizando un amplificador PC-ONE conectado a una interfaz analógica digital y se analizaron con el software Clampex. Los experimentos se realizaron en modo *voltage-clamp* y fijando el potencial de membrana a – 70 mV en los experimentos con rodajas de cerebelo, para registrar las corrientes despolarizantes producidas por la liberación del glutamato. En las rodajas de hipocampo se fijó el potencial de membrana a 0 mV, cerca del potencial de reversión de los receptores glutamatérgicos, lo cual permitió minimizar la influencia de las corrientes provocadas por la apertura de estos receptores. Por otro lado, el potencial de reversión de los receptores de GABA es aproximadamente -65 mV, por lo tanto, este potencial de membrana permitió apreciar con claridad las corrientes provocadas por el flujo de Cl⁻.

Materiales y Métodos

Se monitorizaron las resistencias de acceso y en serie a lo largo del experimento, utilizando un pulso de -5 mV y los registros se consideraron estables cuando las resistencias en serie y de acceso, el potencial de membrana en reposo y la duración del artefacto de estimulación no cambiaron > 20%. Las células que no cumplieron ese criterio no fueron consideradas.



Esquema 5. Electrofisiología en rodajas de cerebelo.

La estimulación de los axones se realizó en modo bipolar, para lo que se utilizaron capilares teta (con punta de 2 – 5 μm) rellenos con el ACSF correspondiente a la preparación y con electrodos conectados a un estimulador mediante una unidad de aislamiento. En las rodajas de cerebelo, los electrodos de estimulación se situaron cerca la superficie pial de la capa molecular para estimular las aferencias glutamatérgicas de las PF a las PCs (Esquema 5), mientras que en las rodajas de hipocampo se colocaron en la capa *stratum radiatum* en el borde entre las regiones CA3 y CA1 para estimular las aferencias glutamatérgicas de CA3 a CA1 denominadas colaterales de Schaffer (Esquema 6).

3.2.1.3 Determinación del origen presináptico de los fenómenos de plasticidad sináptica

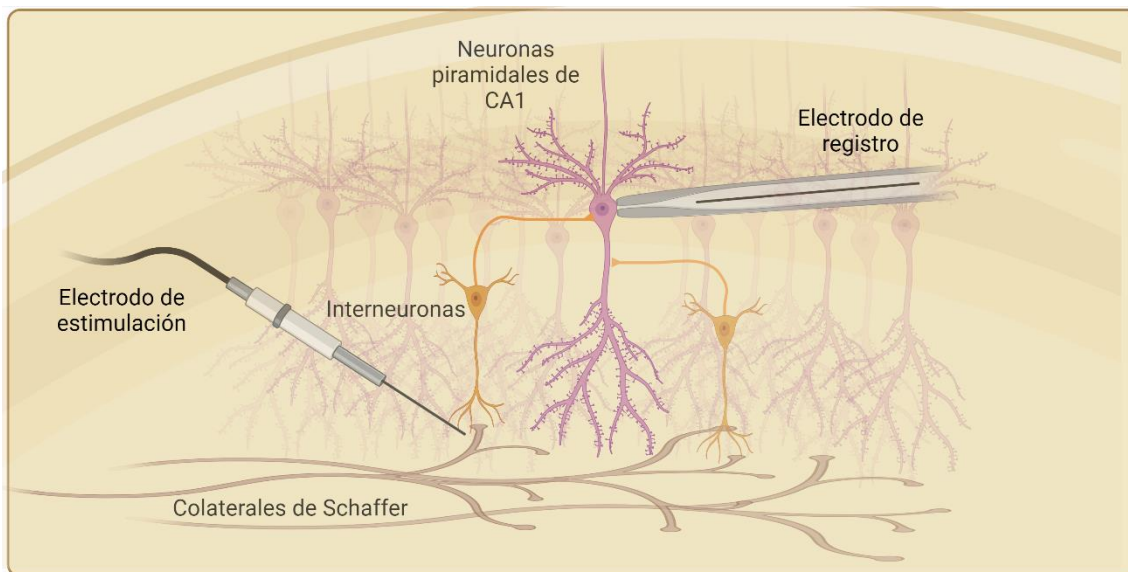
Los estímulos se administraron en forma de par de pulsos para obtener la PPR (del inglés *paired pulse ratio*) como EPSC2/EPSC1. La aplicación de dos pulsos en rápida sucesión da lugar a un fenómeno de plasticidad sináptica a corto plazo en el que el Ca^{2+} residual en el terminal presináptico tras la primera estimulación aumenta la probabilidad de liberación durante la segunda estimulación. Si el terminal presenta una alta probabilidad de liberación, las vesículas disponibles se agotarán con el segundo estímulo, dando lugar a una PPD (del inglés *paired pulse depression*) mientras que, si tiene una baja probabilidad de liberación, el segundo estímulo causará una mayor respuesta, dando lugar a una PPF (del inglés *paired pulse facilitation*). Se considera que los cambios en la PPR reflejan cambios a nivel presináptico, lo cual permite comprobar la naturaleza presináptica de procesos plásticos (Zucker & Regehr, 2002). En las rodajas de cerebelo los estímulos ($<50 \mu\text{A}$, $100 \mu\text{s}$) se aplicaron a $0,05\text{Hz}$ como pares de pulsos separados por 80ms . En las rodajas de hipocampo, sin embargo, los estímulos se aplicaron con una frecuencia de $0,033 \text{Hz}$ y separando ambos pulsos por 200ms para evitar la inhibición de la liberación de GABA mediada por los receptores GABA_B (Liu et al., 2019).

Aunque la PPR se sigue considerando un indicador de la Pr, ahora se sabe que existen diversos mecanismos celulares capaces de afectar a la PPR como es la recaptación del glutamato en la brecha sináptica por astrocitos (Oliet et al., 2001), la rápida difusión de receptores AMPA postsinápticos (Nair et al., 2013) y el rápido desbloqueo de las poliaminas intracelulares de estos receptores, que da lugar a una forma de plasticidad postsináptica a corto plazo (Aizenman et al., 2003). Otro método para comprobar la naturaleza presináptica de una modulación es el análisis del coeficiente de variación (CV). El CV se obtiene como la ratio de la amplitud media de las respuestas postsinápticas evocadas, entre su varianza y permite medir los niveles de ruido en la transmisión sináptica. Este ruido en la transmisión sináptica se debe principalmente a la naturaleza estocástica de la liberación del neurotransmisor (Costa et al., 2017) y los cambios en la liberación son de origen presináptico (Neher & Sakaba, 2003). El cálculo del cuadrado inverso del coeficiente de variación ($1/\text{CV}^2$) depende de la Pr, así como del número de sitios de liberación y se utiliza de manera general para determinar si un cambio en las respuestas evocadas es de origen presináptico (van Huijstee & Kessels, 2020).

Materiales y Métodos

3.2.1.4 Protocolos de inducción de los fenómenos de plasticidad sináptica

Para activar los receptores mGlu7 mediante la liberación de glutamato inducida eléctricamente en rodajas hipocampales, se aplicó un protocolo de HFS (del inglés *High Frequency Stimulation*) que consistió en dos pulsos de 50 Hz y 1 s de duración, separados por 20 s (Martín et al., 2018). Para evitar efectos irreversibles de los agonistas/antagonistas/inhibidores o protocolos de LTP únicamente se registró una célula por rodaja.



Esquema 6. Electrofisiología en rodajas de hipocampo.

La presencia del quelante de Ca^{2+} , BAPTA, en la pipeta de registro (Safo & Regehr, 2005) previene la generación de endocannabinoides por las PC (Kreitzer & Regehr, 2001; Maejima et al., 2001) y la LTP postsináptica de las PC mediada por cAMP, impidiendo también el incremento en la permeabilidad de los receptores AMPA, que contienen GluA3, mediado por Epac (Gutierrez-Castellanos et al., 2017). Los experimentos en los que se aplicó el protocolo de inducción de la PF-PC LTP (100 estímulos a 10 Hz) se realizaron como mínimo 15 min después de la apertura del sello para permitir la difusión del BAPTA en el árbol dendrítico de la neurona de Purkinje. Los EPSCs en condición basal (antes de aplicar el protocolo de inducción de la PF-PC LTP) se ajustaron a una amplitud < 300 pA para evitar corrientes de acción de sodio que no pudiesen ser controlados por el *voltage clamp*, especialmente durante y después de la estimulación tetánica.

3.2.1.5 Medida del tamaño de la RRP

El tamaño de la RRP se estimó como se describe en la literatura (Schneppenburger et al., 1999). Se aplicó una estimulación de tetánica de 100 pulsos a 40 Hz y las amplitudes acumuladas de los EPSC se representaron frente a los estímulos. Para estimar el tamaño de la RRP se extendió la intersección de la parte lineal de la curva (pasados > 1,5 s, una vez alcanzado el estado estacionario) con el eje Y. La pendiente del ajuste lineal se utilizó para estimar la tasa de reposición de la RRP (los datos se analizaron utilizando el software OriginLab 8). Para minimizar las variaciones en dichas estimaciones, la intensidad del estímulo se ajustó antes de la inducción de la LTP para inducir EPSCs de entre 150 y 250 pA de amplitud. En algunos casos, la estimulación tetánica se aplicó 30 min después de aplicar el protocolo de inducción de la PF-PC LTP (100 estímulos a 10 Hz). Por último, la probabilidad de liberación vesicular (p_{ves}) se obtuvo dividiendo la media de seis EPSCs consecutivos, antes del tren de 40 Hz, entre el tamaño de la RRP estimado para cada célula.

3.2.1.6 Análisis de los EPSCs asincrónicos (aEPSCs)

El Sr^{2+} puede sustituir al Ca^{2+} en la liberación de las vesículas, afectando a las características de esta liberación (Dodge et al., 1969) y favoreciendo la liberación asincrónica a expensas de la liberación sincrónica. La prolongación de la liberación asincrónica en respuesta a la estimulación de las PF permite aislar los eventos que resultan de esta estimulación de los eventos espontáneos debidos a las aferencias de las fibras trepadoras (Carey & Regehr, 2009). Para el análisis de los EPSCs asincrónicos de las PF (aEPSCs), se reemplazó el $CaCl_2$ 2,5 mM con $SrCl_2$ 2,5 mM. El estímulo inducido se ajustó para lograr una amplitud de sEPSC de entre 150 y 250 pA y se administró cada 20 s. Se analizó la amplitud y frecuencia de los eventos de liberación asincrónica asociada con cada estímulo evocado (20 – 500 ms tras el sEPSC). Los eventos asincrónicos asociados a los últimos seis estímulos de un periodo de 5 min se cuantificaron en la condición basal y después de 10 min en presencia de isoproterenol (100 μ M).

3.2.2. Preparación de sinaptosomas

Los sinaptosomas son el resultado de la escisión de los botones sinápticos de los axones que, posteriormente, se resellan espontáneamente durante el proceso de

Materiales y Métodos

homogeneización del tejido cerebral en una solución de alta concentración de sacarosa y que pueden ser purificados mediante un gradiente de densidad (Dunkley et al., 1986). Al microscopio electrónico, los sinaptosomas aparecen como sáculos citoplásmicos esféricos de tamaño variable (0,5 - 1,5 μ M) que contienen una o varias mitocondrias, así como múltiples vesículas sinápticas. Los sinaptosomas permiten estudiar los fenómenos que tienen lugar a nivel presináptico, minimizando posibles interferencias postsinápticas. Esto, sumado a la conservación de la maquinaria proteica y de los mecanismos de transducción de señales, los convierten en un modelo adecuado para estudio de las vías de señalización mediadas por receptores presinápticos. Asimismo, los sinaptosomas poseen autonomía funcional como resultado de la presencia de mitocondrias en su interior, capaces de realizar la fosforilación oxidativa durante varias horas (Kauppinen & Nicholls, 1986). Esta autonomía también engloba a su capacidad para realizar la captación, síntesis, almacenamiento y liberación de neurotransmisores (McMahon et al., 1989; Nicholls, 1989). La preparación de sinaptosomas cerebelares está compuesta principalmente de los botones sinápticos de las células granulares, que son las más abundantes del cerebro (Andersen et al., 1992).

Los sinaptosomas se prepararon según la técnica previamente descrita en Dunkley et al., 1986. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y posterior decapitación. Los cerebros se extrajeron y lavaron en una solución de sacarosa 0,32 M (pH 7,4) para, a continuación, realizar la disección de los cerebelos. Durante el sacrificio y disección de los ratones (4 - 5 por experimento) los cerebelos se mantuvieron en sacarosa 0,32 M (pH 7,4). A continuación se homogeneizaron realizando 3 pases completos a 700 rpm, mediante el uso de un homogeneizador de vidrio modelo Potter con un vástago de teflón. El homogeneizado se centrifugó a 2000 g durante 2 minutos, recogándose el sobrenadante (S1) y resuspendiendo el precipitado en sacarosa 0,32 M (pH 7,4), para volver a centrifugarlo en idénticas condiciones (2.000 g, 2 minutos) y aumentar así el rendimiento. Una vez recogido el segundo sobrenadante (S2), ambos se centrifugaron a 9.500 g durante 12 minutos. El precipitado (P1), que contenía núcleos y restos celulares, se descartó.

Seguidamente, los precipitados obtenidos (P2) se resuspendieron en 1 mL de sacarosa 0,32 M (pH 7,4), y se depositaron sobre dos gradientes discontinuos de concentraciones crecientes de Percoll (3, 10 y 23%). Los sobrenadantes (S2), que

contenían mayoritariamente vesículas pequeñas, retículo endoplásmico y material soluble, se descartaron. Las distintas concentraciones de Percoll se prepararon en una mezcla de sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM y DTT 0,25 mM (pH 7,4), empleándose, aproximadamente, 3mL de cada concentración para formar los gradientes mediante el uso de una bomba peristáltica. Los gradientes se centrifugaron a 25.000 g durante 10 minutos y a 4 °C para, a continuación, recoger los sinaptosomas purificados situados en la interfase formada entre las bandas de Percoll del 10 y del 23%. El resto de las bandas, que contenían mielina y mitocondrias, se descartaron. Los sinaptosomas purificados se diluyeron en HBM (pH 7,4) hasta un volumen aproximado de 50 mL y se centrifugaron a 22.000 g durante 10 minutos, para eliminar los restos de Percoll. El sobrenadante (S3) se descartó y el precipitado (P3) se resuspendió en 0,5-1 mL de HBM (pH 7,4). La concentración de proteínas de esta resuspensión se determinó mediante método de Biuret, empleando un estándar interno de BSA (10 mg/mL). Posteriormente, esta resuspensión se dividió en alícuotas de 0,75 mg de proteína, que se diluyeron con 2 mL de HBM (pH 7,4) y centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y los sinaptosomas se mantuvieron a 4°C durante un máximo de 4 horas. En ningún caso los sinaptosomas se congelaron o almacenaron. Todos los medios y centrifugaciones se mantuvieron a 4°C y las muestras biológicas se preservaron en hielo.

3.2.2.1 Liberación espontánea de glutamato

Los sinaptosomas están equipados con todo el conjunto de proteínas necesario para la fusión de vesículas sinápticas, y presentan eventos de fusión espontáneos aleatorios, debidos a cambios conformacionales de baja probabilidad de la maquinaria de liberación, incluso en ausencia de estímulo. Estos eventos de liberación espontánea están mediados, en parte, por la maquinaria asociada a la liberación espontánea (Kavalali, 2015) y se correlaciona con la RRP de las sinapsis (Walter et al., 2013).

El glutamato liberado por los sinaptosomas se determinó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en Nicholls et al., 1987. Mediante la reacción catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), en presencia de NADP⁺, se puede monitorizar el aumento de fluorescencia que ocurre con la generación de NADPH, de acuerdo con su excitación a 340 nm y su emisión a 460 nm, y cuantificar la liberación de glutamato usando un estándar interno de glutamato.

Materiales y Métodos



Los sinaptosomas, obtenidos como se ha descrito anteriormente, se resuspendieron en HBM-BSA (pH 7,4) a 37°C y se mantuvieron en agitación durante 30 – 60 min. Durante este periodo, se trataron con adenosina desaminasa (ADA, 1,7 U/mg, 15 min) para eliminar la adenosina liberada por los sinaptosomas y evitar así la inhibición tónica de la liberación por la activación de los receptores A1 (Ladera et al., 2007). Después, los sinaptosomas se trasladaron a una cubeta con HBM-BSA que contenía un agitador magnético, NADP⁺ 1 mM, Ca²⁺ 1,33 mM y con tetrodotoxina (TTx) 1 μM, que es un bloqueante de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, para impedir la generación de potenciales de acción.

La cubeta se transfirió a un fluorímetro con un sistema de agitación y termostatación a 37°C. A continuación, se añadieron 50 U de la enzima GDH y se incubó durante 2 minutos con agitación para eliminar el glutamato del medio. Después, se realizó un registro de fluorescencia a 37°C y con agitación continua durante 10 min con el programa FL WinLab en modo *Time Drive*, con el parámetro de excitación a 340 ± 3 nm, de emisión a 460 ± 8,5 nm, intervalo de obtención de datos de 0,8 s y ancho de respuesta de 4,8 s. A los 60 s, se añadió Isoproterenol 100 μM y, por último, se incorporó un estándar de glutamato (2 nM) 2 min antes del final del registro. La liberación espontánea se calculó comparando el aumento de fluorescencia durante los primeros 10 min (en presencia o ausencia de isoproterenol) con el producido por el estándar de glutamato de concentración conocida.

3.2.2.2 Determinación de los niveles de AMPc.

La acumulación de cAMP se analizó mediante el uso del kit comercial cAMP Dynamic 2 kit. Dicho ensayo se basa en que la acumulación de cAMP citoplásmico es proporcional a la disminución de la Energía de Transferencia de Resonancia de Fluorescencia (FRET del inglés *fluorescence resonance energy transfer*), por desplazamiento de la unión entre un cAMP conjugado con fluoróforo (d2) y su anticuerpo unido a otro fluoróforo (criptato). Los sinaptosomas obtenidos del cerebelo de ratón se obtuvieron siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado y se resuspendieron en una solución de HBM-BSA a una concentración

de 0,67 mg/mL. Luego, se incubaron en agitación a 37°C durante un período de 30 minutos en presencia del inhibidor de las fosfodiesterasas, IBMX, a una concentración de 1 mM, durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió isoproterenol 100 μ M durante 10 minutos.

Después, los sinaptosomas se lavaron mediante una centrifugación a 16.000 g durante 1 minuto y se resuspendieron en un tampón proporcionado por el kit, al cual se le añadió IBMX (1 mM). Luego, se tomaron 5 μ L de estas resuspensiones y se transfirieron a una placa de ensayo de 96 pocillos. En cada pocillo, previamente, se habían agregado 45 μ L más de tampón suplementado con IBMX (1 mM), logrando así una concentración final de 0,017 mg/mL. Se reservaron algunos pocillos para realizar una curva estándar, para lo cual se agregaron 25 μ L de diluciones seriadas de un patrón de AMPc en los pocillos que previamente contenían 25 μ L de tampón suplementado con IBMX (1 mM). Adicionalmente, se incluyeron pocillos de control sin patrón, que contenían 50 μ L de tampón, así como dos pocillos de control negativo que no contenían el análogo de cAMP, a los cuales se les añadieron 25 μ L de tampón de lisis. Por último, se añadieron 25 μ L de las diluciones en tampón de lisis del análogo de cAMP-d2 y el anticuerpo anti cAMP-criptato.

Tras una hora de incubación a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, se procedió a medir la fluorescencia utilizando un lector de placas FluoStar Omega con los filtros de longitudes de onda de 620 nm (donador) y 665 nm (aceptor). Utilizando estos valores, se llevó a cabo el cálculo de la medida ratiométrica del valor de FRET.

Seguidamente, se determinó el incremento específico de FRET (ΔF), considerando el valor obtenido del blanco de referencia (consultar la Figura 14). Estos valores pueden ajustarse matemáticamente, teniendo en cuenta el valor máximo, para establecer una relación lineal entre ΔF y la concentración de AMPc. De esta manera, mediante la interpolación en la curva de concentraciones conocidas, podemos calcular la concentración de AMPc en las muestras analizadas, expresándola en pmol/mg. Los valores obtenidos se normalizaron con respecto al control, que no recibió ningún tratamiento.

Materiales y Métodos

3.2.2.3 Determinación de la concentración de calcio citosólica.

Para determinar los niveles de Ca^{2+} citosólicos en preparaciones de sinaptosomas, se utilizó la sonda fluorescente Fura-2-acetoximetil éster (Fura-2-AM). Este compuesto es un derivado del sensor ratiométrico de Ca^{2+} capaz de atravesar las membranas celulares. Una vez en el interior celular, las esterasas celulares hidrolizan los enlaces éster, generando Fura-2. La unión de Fura-2 al Ca^{2+} intracelular provoca un desplazamiento en el máximo de excitación de 360 nm a 340 nm, lo cual permite determinar la $[\text{Ca}^{2+}]$.

La preparación de sinaptosomas P2, obtenida como se ha descrito anteriormente, se resuspendió en medio HBM (1,5 mg/mL) con BSA 16 μM , CaCl_2 1,3 mM y Fura-2-AM y se incubaron durante 25 min a 37 °C para favorecer la carga de Fura-2-AM en los terminales sinápticos. Tras la carga del Fura-2-AM, los sinaptosomas se resuspendieron en 1,1 mL de HBM sin BSA (0,68 mg/mL) y 1 mL de esta resuspensión se transfirió a una cubeta con CaCl_2 1,33 mM que se introdujo en un fluorímetro Pelkin-Elmer LS55 con un sistema de agitación y termostatación a 37°C. A continuación, se monitorizó la fluorescencia excitando a 340 nm y registrando la fluorescencia a 510 nm en intervalos de 0,3 s y la $[\text{Ca}^{2+}]$ se calculó utilizando las ecuaciones descritas en Grynkiewicz et al., 1985.

En respuesta a un aumento en la concentración de K^+ extracelular, los sinaptosomas se despolarizan y se produce la apertura de VGCC, provocando la entrada de Ca^{2+} (Scott & Nicholls, 1980; Tibbs et al., 1989). Los sinaptosomas se despolarizaron mediante la adición de KCl 10 mM, una concentración que permite inducir eventos sinápticos que implican la apertura de canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , tal como ocurre en la generación de los potenciales de acción en condiciones fisiológicas (Godino et al., 2007). En los casos indicados se añadió el PAM de mGlu4, VU 0155041, 100 μM , 5 minutos antes de añadir el KCl.

3.2.2.4 Inmunocitofluorescencia

Las preparaciones de inmunocitofluorescencia se realizaron con los sinaptosomas de cerebelo obtenidos mediante la técnica ya descrita. Estos sinaptosomas se resuspendieron en sacarosa 0,32 M (pH 7,4; 0,67 mg/mL) y se incubaron durante 15 min a 37°C. A continuación, 54 μg de esta suspensión se

depositaron en cubreobjetos circulares de 15 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina.

Transcurridos 45 min, se decantó el exceso de solución y se añadió paraformaldehído (PFA) al 4% en PB 0,1 M (pH 7,4) durante 4 min para fijar los sinaptosomas. Se realizaron 2 lavados con PB 0,1 M (pH 7,4) durante 5 min y otro lavado con TBS 50 mM, (pH 7,4) durante 10 min. A continuación, se realizó un bloqueo con una solución de suero de burro al 10 % (v/v) en TBS con triton X-100 al 0,2 % (v/v) durante 12 horas. Después se realizó la incubación con los anticuerpos primarios, diluidos en TBS con triton X-100 al 0,2 % (v/v) y suero de cabra al 1 % (v/v) durante 12 horas. Se emplearon los anticuerpos anti- β_1 -AR de conejo (1:200) y anti-sinaptofisina 1 de ratón (1:500). Como control de inmunocitofluorescencia, se omitieron los anticuerpos primarios en el proceso de incubación.

Tras 12 horas, las preparaciones se lavaron 3 veces con TBS 50 mM (pH 7,4) durante 10 min y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios, Alexa Fluor- 488 de burro anti-ratón y Alexa Fluor-594 de burro anti-conejo diluidos en TBS 50 mM (pH 7,4) con 1% (v/v) de suero, durante 1h y 20 minutos. Finalmente, las preparaciones se lavaron 3 veces con TBS 50 mM (pH 7,4) y se montaron con medio de montaje ProLong Gold antifade y se dejaron secar durante 1 h en oscuridad y se guardaron a 4°C.

La adquisición de las imágenes se realizó mediante un microscopio Nikon Diaphot TE2000 equipado con una cámara CCD Hamamatsu C4880, con un objetivo 100X Nikon, una lámpara LED (CoolLed) y un bloque de filtros de Nikon para los fluoróforos utilizados. Previo a la adquisición de las imágenes se analizaron los controles negativos, los cuales únicamente muestran la señal no específica. Mediante un filtro se suprimió esa señal inespecífica para adquirir las imágenes que, posteriormente, se procesaron con el programa ImageJ.

3.2.3. Western Blot

Las resuspensiones (1mg/mL) de sinaptosomas purificados (P3) se diluyeron en tampón de carga Laemmli con β -mercaptoetanol (5%; v/v). Después se cargaron 4 μ g de proteína por pocillo en un gel de poliacrilamida y se sometió a electroforesis (PAGE-SDS) durante una hora y media a 4°C con amperaje constante (20 mA). Una

Materiales y Métodos

vez finalizada la electroforesis, el gel fue transferido electroforéticamente (transferencia en húmedo) a una membrana de nitrocelulosa durante toda la noche a 4°C y amperaje constante (48 mA) en un tampón que contenía Tris-Base 25 mM; 1,5% de glicina y 20 % de metanol. A la mañana siguiente, para impedir las uniones inespecíficas, la membrana se incubó durante una hora con tampón de bloqueo en agitación constante y en temperatura ambiente.

Después las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti- β_1 -AR (1:200) y con un anticuerpo monoclonal anti- β -actina (1:5000). Tras varios lavados, las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos secundarios con marcaje infrarrojo: cabra anti-conejo-IRDye 800 y cabra anti-ratón-IRDye 680. A continuación se realizaron de nuevo varios lavados y, finalmente, las membranas se escanearon utilizando un sistema de imagen de infrarrojos Odyssey y el marcaje de las proteínas se comparó mediante densitometría y fue cuantificado usando el software Odyssey 2.0. Los datos se normalizaron a la señal de la β -actina para identificar diferencias en la cantidad de proteína.

3.2.4. Microscopía electrónica de transmisión (MET).

A pesar de los avances en la técnica de microscopía óptica de “superresolución”, el mejor método para apreciar la ultraestructura de las membranas biológicas es la microscopía electrónica. Esto se debe a que la resolución de un microscopio está limitada a la longitud de onda de su fuente de iluminación. La microscopía óptica está limitada a la longitud de onda de los fotones, de unos 200 nm, mientras que la microscopía electrónica se basa en el uso de electrones, con una longitud de onda de 0,1 nm. Existen diferentes técnicas de microscopía electrónica aplicables a muestras biológicas, que permiten estudiar la ultraestructura de la sinapsis (Siksou et al., 2009), pero la más comúnmente empleada es la fijación química combinada con la microscopía electrónica de transmisión (MET).

En esta técnica, las muestras biológicas se fijan empleando fijadores químicos para su preservación y posteriormente se deshidratan. Además, debido al bajo poder de penetración de los electrones, las muestras deben ser preparadas en secciones ultrafinas, para lo que deben ser incluidas en una resina. Dado que de forma natural las muestras biológicas no interaccionan con el haz de electrones, estas deben tratarse con metales pesados que se concentran en ciertas estructuras

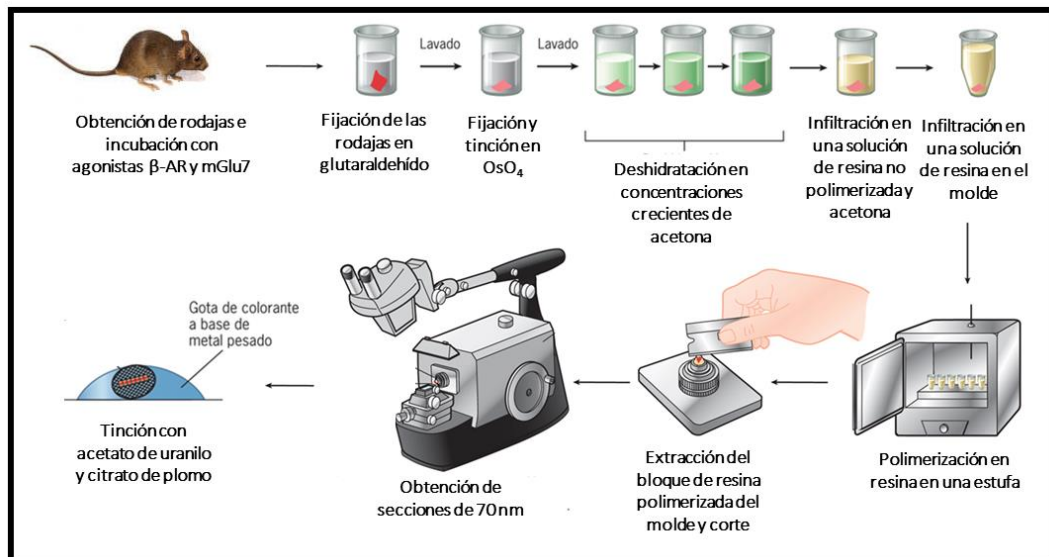
celulares, fundamentalmente membranas y complejos macromoleculares. Los electrones que impactan con estos metales rebotan y no atraviesan el tejido, mientras que los electrones que atraviesan el tejido inciden sobre una pantalla fluorescente, creando la imagen de las muestras. Las muestras biológicas que se emplearon en este trabajo fueron rodajas de cerebro de hipocampo y cerebelo de ratones tratadas con agonistas de los receptores mGlu7 y β -adrenérgicos, respectivamente .

Las rodajas de 325 μm se obtuvieron mediante el empleo de un vibrátomo y mantenidas durante 15 minutos en una cámara con perfusión de medio ACSF oxigenado. En algunos experimentos, los agonistas de los receptores mGlu7 (L-AP4 500 μM) o β -adrenérgicos (isoproterenol 100 μM) se perfundieron durante los últimos 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se colocaron en una placa de 12 pocillos que contenía 1,5 mL de una solución de glutaraldehído al 3,5% (v/v) a 37°C, donde permanecieron durante 45 minutos. Después, se transfirieron a otra placa de 12 pocillos con la misma cantidad de glutaraldehído al 3,5% (v/v) a temperatura ambiente y se mantuvieron durante 30 minutos más. A continuación, las placas se conservaron a 4°C hasta el día siguiente.

Finalizada la fijación, el glutaraldehído se retiró y las rodajas se lavaron 3 veces con medio PB 0,1 M (pH 7,4). Tras el lavado, se procedió al tratamiento con una mezcla de OsO_4 al 1% (p/v) con $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ al 1,5% (p/v) durante 1 hora, seguida de tres lavados con agua ultrapura. A continuación, se llevó a cabo la deshidratación de las rodajas mediante su incubación en una serie de soluciones de acetona a distintas concentraciones (en v/v: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y absoluta) durante 15 minutos cada una, repitiendo la incubación en la solución de acetona absoluta una vez más durante 15 minutos.

Seguidamente las rodajas se trataron con una mezcla de resina/acetona en distintas proporciones v/v y tiempos, utilizándose la resina SPURR: 1:3 durante 1 hora, 1:1 durante 1 hora, 3:1 durante 2 horas y pura durante 12 horas. Al día siguiente las rodajas se colocaron en un molde de silicona con resina pura y se mantuvieron 72 horas a 70°C para su polimerización.

Materiales y Métodos



Esquema 7. Pasos de la preparación de microscopía electrónica de transmisión

Los cortes ultrafinos y la obtención de imágenes se realizaron en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Facultad de Químicas, Av. Complutense s/n, 28040 Ciudad Universitaria, Madrid). Las rodajas se cortaron con un ultramicrotomo Leica Ultracut E en secciones de 70 nm y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se tomaron imágenes aleatorias de las sinapsis a 80.000 aumentos, con un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010. Las imágenes se analizaron con el programa Image J y los datos se procesaron usando Origin 8.0. Se midió la distancia desde el exterior de la membrana de cada VS al interior de la membrana de la ZA, en la zona más cercana a la VS estudiada (0,72 nm/px a 80.000 aumentos). Las sinapsis PF-PC se identificaron en la capa molecular del cerebelo y se distinguieron de las sinapsis entre las fibras trepadora y las PC por su localización en dendritas distales, así como por su menor tamaño y número de VSs. Las ZAs se identificaron por la distribución de las VSs (presencia de al menos una VS en contacto con la membrana de la ZA) y por la presencia de densidad postsináptica. En el caso de las sinapsis simétricas axosomáticas sobre piramidales CA1, las zonas activas de las interneuronas PV se identificaron por la ausencia de densidad postsináptica, así como por la presencia de al menos una VS en contacto con la membrana de la ZA.

La distribución de las VSs se determinó según su distancia a la ZA, cuantificando el porcentaje de VSs en cada intervalo de 10 nm. Además, se determinó el número de VSs por cada ZA. Los análisis se realizaron mediante estudio ciego a genotipo y tratamiento.

3.2.5. Microscopía Inmunoeléctrica

Los experimentos de microscopía inmunoeléctrica fueron realizados por el grupo de investigación del Dr. Lujan (Laboratorio de Estructura Sináptica del Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas (IDINE), Departamento Ciencias Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Castilla-La Mancha). Los ratones adultos (> 60 días) se anestesiaron y se perfundieron intracardiamente con un medio fijador frío que contenía 4 % de paraformaldehído, 0,05% de glutaraldehído y 15% (v/v) de ácido pícrico diluido en tampón fosfato. Tras la perfusión, el cerebro se extrajo, se lavó con 0,1 M PB y se cortó en rodajas de 60 mm de grosor utilizando un vibrátomo. Las rodajas se incubaron en flotación con NGS 10 % (v/v) diluido en TBS y después con anticuerpos anti- β_1 -AR de cabra a una concentración de proteínas final de entre 3-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en TBS con NGS 1% (v/v). Tras varios lavados con TBS, las rodajas se incubaron con anticuerpos anti-cabra de conejo unidos a nanopartículas de oro de 1,4 nm. Las secciones se postfijaron con glutaraldehído 1% (v/v) y se lavaron dos veces con agua destilada antes de aplicar un tratamiento de plata a las partículas de oro usando un HQ Silver Kit. A continuación, las rodajas se trataron con tetróxido de osmio (1 % (p/v) en PB 0,1 M), teñidas con acetato de uranilo y deshidratadas con una serie de diluciones crecientes de etanol para, finalmente, embeberlas en resina Durcupan. Las regiones de interés se cortaron con un grosor de 70 – 90 nm en un ultramicrotomo y se recogieron en unas rejillas de bronce cubiertas de Pioloform. Después se tiñeron, primero con gotas de acetato de uranilo 1% (p/v) y, a continuación, con una tinción de citrato de plomo de Reynold. La microestructura del tejido se analizó con un microscopio JEM1010.

Para establecer la abundancia relativa de las subunidades β_1 de la capa molecular del cerebelo, se cuantificó el inmunomarcaje en rodajas coronales del 60 mm, procesadas antes de la inclusión en resina con inmunodetección con partículas de oro como se indica en el apartado anterior. Se emplearon tres muestras de tejido obtenidas de tres animales diferentes. Para minimizar los falsos negativos se realizaron secciones ultrafinas obtenidas de la superficie de las preparaciones. Se estimó la calidad del inmunomarcaje seleccionando áreas con un marcaje de oro óptimo a la misma distancia de la superficie cortada. Se seleccionaron áreas aleatorias que se fotografiaron a 45.000 aumentos para, posteriormente, cuantificar el marcaje con las partículas de oro en diferentes áreas de muestreo de un total de

Materiales y Métodos

~ 1.500 μm^2 . En cada área de muestreo se contaron las inmunopartículas unidas a subunidades β_1 individuales en la membrana plasmática de terminales axónicos, analizando el neuropilo de la capa molecular con compartimentos postsinápticos y presinápticos. En cuanto al compartimento presináptico, solamente se analizaron los terminales axónicos (terminales de PF) que establecían contactos sinápticos con espinas dendríticas de PCs. Se analizaron un total de 285 partículas de oro en terminales axónicos con marcaje de β_1 -AR. A continuación, se calculó la proporción de inmunopartículas de subunidades β_1 -AR en la ZA y en la membrana plasmática extrasináptica de terminales axónicos, así como la proporción de elementos postsinápticos frente a elementos presinápticos con marcaje de β_1 -AR. Para determinar la especificidad del marcaje se realizaron preparaciones en las cuales el anticuerpo primario o bien fue omitido o reemplazado por NGS 5% (v/v) y se confirmó que no se observaba ningún marcaje específico durante estas condiciones. El marcaje también se comparó con el obtenido con calretinina y calbindina y se confirmó que solamente los anticuerpos contra β_1 -AR marcaban consistentemente la membrana plasmática.

3.2.6. Genotipado

Para extraer el ADN de los ratones mutantes se recurrió al kit comercial Wizard SV Genomics ADN Purification System. Una muestra de tejido de la oreja de los ratones se incubó en 275 μL de tampón de lisis de núcleos suplementado con EDTA 100 mM (pH 8,0), RNAsa A 182 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Proteinasa K 1,46 mg/mL , durante 16-18 horas a 55°C con agitación suave a 300 rpm, para su digestión. Después, las muestras se centrifugaron a 6.000 g durante 5 minutos y se descartó el precipitado, añadiendo al sobrenadante 250 μL de tampón de lisis.

La mezcla se transfirió a unas microcolumnas de afinidad, que retuvieron el ADN tras una centrifugación a 16000 g durante 5 minutos. A continuación, se lavaron las columnas añadiendo una solución de lavado con etanol al 60% (v/v) y centrifugando a 16.000 g durante 1 minuto. Este proceso se repitió 4 veces, se realizó una centrifugación más para eliminar cualquier resto de solución de lavado. Finalmente, para eluir el ADN, se añadieron 250 μL de agua estéril, previamente calentada a 65°C, que se mantuvo 2 minutos y se centrifugó a 16.000 g durante 1 minuto. Los 250 μL volvieron a trasvasarse a la columna y se repitió el proceso anterior, con el

fin de aumentar el rendimiento. Tras la centrifugación a 16.000 g durante 1 minuto se obtuvo el ADN purificado.

Para el genotipado de la línea *mGlu7^{-/-}* se envió el ADN purificado al Servicio de Genómica de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, para su procesamiento mediante el uso de un kit de genotipado TaqMan para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP *del inglés* Single Nucleotide Polymorphism).

En el caso de la identificación de los ratones *Fmr1KO* y *Epac2^{-/-}* se realizó una PCR con las siguientes mezclas:

PCR de <i>Fmr1KO</i>	
Compuesto	μL/muestra
ddH ₂ O	10,7
5X Go Taq Buffer	4
MgCl ₂ 25 mM	1,6
dNTPs 10 mM	0,4
oIMR6735 10 μM	0,4
oIMR6734 10 μM	0,4
oIMR2060 10 μM	0,4
GoTaq Pol (5U/μL)	0,1
ADN genómico	2

PCR de <i>Epac2^{-/-}</i>	
Compuesto	μL/muestra
ddH ₂ O	10,7
5X Go Taq Buffer	4
MgCl ₂ 25 mM	1,6
dNTPs 10 mM	0,4
oIMR6735 10 μM	0,4
oIMR6734 10 μM	0,4
oIMR2060 10 μM	0,4
GoTaq Pol (5U/μL)	0,1
ADN genómico	2

Los oligonucleótidos utilizados en la PCR de *Fmr1KO* fueron:

-**oIMR₂₀₆₀** CACGAGACTAGTGAGACGTG Primer Forward Mutante

-**oIMR₆₇₃₄** TGTGATAGAATATGCAGCATGTGA Primer Forward WT

-**oIMR₆₇₃₅** CTTCTG GCACCTCCAGCTT Primer Reverse Común

Y en la PCR de *Epac2^{-/-}* fueron:

-**Epac2_{WTF}** TGAACAGATTTGTGACCGGAT Primer Forward WT

-**Epac2_{WTR}** CTGATCACATTAGCAAGCTC Primer Reverse WT

Material y Métodos

-**Epac2**_{KOF} GCATACATTATACGAAGTTATC Primer Forward Mutante

-**Epac2**_{KOR} CTGATCACATTAGCAAGCTTC Primer Reverse Mutante

El protocolo de PCR utilizado para identificar ratones *Fmr1*KO fue:

94°C	2 min	
94 °C	20 sec	10 ciclos
65°C	15 sec (con -0,5°C por ciclo)	
68°C	10 sec	
94°C	15 sec	28 ciclos
60°C	15 sec	
72°C	10 sec	
72°C	2 min	
10°C	<i>hold</i>	

Debido a que los oligonucleótidos de *Epac2*^{+/+} y *Epac2*^{-/-} presentan diferentes temperaturas de anillamiento, todas las muestras se analizaron mediante dos protocolos diferentes. El protocolo de PCR para *Epac2*^{+/+} fue:

94°C	3 min	
94°C	30 sec	30 ciclos
54°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
10°C	<i>hold</i>	

Y para la PCR de ratones *Epac2*^{-/-} fue:

94°C	3 min	
94°C	30 sec	35 ciclos
51°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
10°C	<i>hold</i>	

Las secuencias de ADN amplificadas se separaron en geles de agarosa al 2% (p/v) para *Fmr1KO* y al 4% (p/v) para *Epac2^{-/-}* en TAE con SYBR Safe y posteriormente se obtuvieron las imágenes utilizando un equipo Fluor-S Multimager.

3.2.7. Aplicación de fármacos en experimentos “in vivo”

Las inyecciones de fármacos se realizaron en ratones jóvenes (22-30 días) y en ratones de ≥ 3 meses macho *Fmr1KO* y hermanos de camada WT, aunque los experimentos de comportamiento se realizaron solamente con los ratones adultos. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales hasta acabar el experimento. Se mantuvieron en ciclos de 12 h de luz/oscuridad con temperatura ambiente (22 ± 0.5 °C) y humedad ($55 \pm 3\%$) constantes y comida y agua *ad libitum*. Los ratones se inyectaron intraperitonealmente (i.p) con el PAM de mGluR4 (VU 0155041, 5 mg/Kg) (Duvoisin et al., 2011) ,o únicamente con el vehículo (suero salino al 0,9%), 2 h antes de preparar las rodajas para electrofisiología o de realizar las pruebas comportamentales. Se establecieron cuatro grupos experimentales: los grupos WT y *Fmr1KO* se inyectaron o bien con VU 0155041 o con suero salino. Los animales de cada genotipo se asignaron aleatoriamente a estos dos grupos. En las pruebas del rotarod, paso elevado, condicionamiento de parpadeo y VOR se usaron dos cohortes independientes de ratones, dividiendo cada cohorte en los cuatro grupos experimentales. En el caso de la prueba de motricidad fina y para las pruebas de interacción social se usaron cinco cohortes independientes de ratones.

Las pruebas de rotarod, paso elevado, condicionamiento clásico de parpadeo y registro del reflejo vestíbulo-ocular (VOR) fueron realizados por el grupo de investigación de los Dres. Gruart y Delgado-García (Division de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide).

3.2.8. Rotarod

En la prueba de rotarod el animal se coloca en un cilindro horizontal que rota en su eje longitudinal. Se trata de una prueba que principalmente pone a prueba la coordinación motora del animal, aunque también requiere unos niveles adecuados de fortaleza en las extremidades delanteras (Deacon, 2013). El primer día los animales se situaron en el cilindro y este se aceleró de 2 a 20 rpm durante un tiempo máximo de 5 min. Además, durante este mismo día los animales realizaron esta

Materiales y Métodos

prueba dos veces más con un intervalo de una hora. Se repitió la prueba, pasadas 24 y 48 h. Después de las pruebas, se permitió a los animales descansar en sus jaulas. El tiempo total que permaneció cada animal en el cilindro se registró como latencia hasta caer (s), que fue registrada automáticamente por un mecanismo sensor situado en el suelo de cada rotarod. Los resultados se evaluaron realizando la media de los datos de 4 intentos (Rossi et al., 2020).

3.2.9. Paso elevado

El paso elevado consistió en una barra de 40 cm de larga y 5 cm de ancha, colocada a 60 cm de altura sobre una superficie blanda. Cada ratón se colocó en el centro de la barra y se le dio un máximo de 40 s para alcanzar uno de los extremos, donde había una plataforma (12 x 12 cm). Se registró el tiempo empleado en llegar al extremo de la barra (Rossi et al., 2020).

3.2.10. Test de motricidad fina

El test de motricidad fina se utiliza para comprobar la habilidad motora de las extremidades anteriores de ratones y ratas. Los ratones se sometieron a una restricción alimentaria (70% de su ingesta normal) antes de realizar el test (Tomassy et al., 2010). Se empleó una caja de Plexiglas (20 cm de largo x 8 cm de ancho x 20 cm de alto) con una ranura vertical de 1 cm de ancho en la parte frontal. Los animales debían alcanzar los *pellets* de sacarosa colocados en una plataforma (8 cm de largo x 4 cm de ancho) situada en frente de la ranura vertical. La plataforma con el *pellet* estaba separada 4 mm de la caja, para que los animales tuvieran necesariamente que agarrar adecuadamente el *pellet* y no sólo arrastrarlo. Los animales fueron habituados a los *pellets* (20 min) durante dos días antes de comenzar la prueba. Los animales que ni siquiera intentaron agarrar un *pellet* se descartaron del estudio. El primer día los *pellets* se situaron en la caja y el segundo día se situaron en la plataforma. Los 5 días de pruebas consistieron en sesiones de 20 min por día, el agarre y recuperación de los *pellets* se puntuó como un éxito, mientras que el desplazar el *pellet* sin recuperarlo, intentar agarrar el *pellet* sin lograrlo, o tirarlo antes de recuperarlo se consideraron intentos fallidos. Los resultados se presentaron como la ratio de éxitos totales/intentos totales. Todas las pruebas se grabaron en video y se analizaron posteriormente de forma ciega a genotipo y tratamiento.

3.2.11. Preparación de los animales para experimentos de registros crónicos (condicionamiento clásico y reflejo vestibulo-ocular).

Los animales se anestesiaron profundamente con isofluorano (1.5-2% en una mezcla de 80% aire sintético/20% oxígeno) vaporizado con un flujo de oxígeno de 0,8 L/min. El gas se administró utilizando una máscara de anestesia adaptada para ratones. Se implantaron electrodos de registro bipolares en el músculo orbicular izquierdo con la punta doblada para facilitar el anclaje en el músculo y electrodos de estimulación bipolares en el nervio supraorbital ipsilateral. Se utilizaron electrodos de 50 μm de acero inoxidable anillado y cubiertos de teflón con los últimos 0,5 mm de teflón eliminados. Además, dos cables de 0,1 mm de plata se colocaron en el cráneo para actuar como tierra. Los 6 cables en total se soldaron a un cajetín de 6 huecos y este se fijó al cráneo con la ayuda de dos pequeños tornillos y cemento dental. Para finalizar, se colocó un sistema de fijación en el cráneo para asegurar una correcta estabilización durante las rotaciones de cabeza y para registrar adecuadamente los movimientos de los ojos.

3.2.12. Condicionamiento clásico de parpadeo.

Las pruebas comenzaron una semana después de la cirugía y se realizaron en tandas de 6 animales. Los animales se situaron en cámaras individuales y ventiladas de plástico (5 cm de largo x 5 cm de ancho x 10 cm de alto) localizadas dentro de cajas de Faraday (35 cm de largo x 35 cm de ancho y 10 cm de alto). Se utilizó un protocolo que consistió en un tono de 350 ms 2,4 kHz, 85 dB) como estímulo condicionado (EC) y, al acabar, un choque eléctrico (un pulso catodal cuadrado de 0,5 ms), aplicado en el nervio supraorbital, como estímulo no condicionado (EI). Se realizaron 2 sesiones de habituación y 10 pruebas con cada animal. Las sesiones de condicionamiento consistieron en la aplicación de 60 pares de EC-EI y duraron unos 30 min. El apareamiento EC-EI se realizó en intervalos aleatorios de 30 ± 5 s. En las sesiones de habituación se aplicó el EC individualmente, también 60 veces por sesión y a intervalos de 30 ± 5 s (Gruart et al., 2006). La actividad electromiográfica (EMG) del músculo orbicular del párpado se registró con un amplificador diferencial, con un ancho de banda de 0,1 Hz-10kHz. La actividad EMG sin rectificar del músculo orbicular y los pulsos rectangulares de 1-V que corresponden a la administración de EC y EI se grabaron digitalmente en un ordenador mediante un convertidor analógico/digital para su análisis cuantitativo. Los datos recolectados de los registros de actividad EMG se muestrearon a 10 kHz con una resolución de amplitud de 12

Materiales y Métodos

bits. Se utilizó el programa Spike2 de CED para representar dicha actividad EMG. Estos registros fueron analizados por un experimentador ciego para el genotipo y el tratamiento.

3.2.13. Estimulación vestibular y registro del reflejo vestibulo-ocular (VOR)

Para la estimulación vestibular, se colocó un animal en una mesa rotatoria. La cabeza se inmovilizó con ayuda del sistema de fijación implantado, mientras que el animal era libre de moverse en una rueda. La rotación de la mesa se realizó manualmente, mostrando un recorrido sinusoidal en una pantalla de ordenador. La rotación de la mesa se registró con un potenciómetro unido a su eje rotador. El animal se rotó ± 20 grados a 3 frecuencias (0,1, 0,3 y 0,6 Hz) durante 10 ciclos, con intervalos de 5 s entre cada una de las frecuencias. El ojo derecho de los ratones se iluminó con una luz roja fría, unida al sistema de fijación de la cabeza. Las posiciones del ojo durante la rotación se registraron con una cámara infrarroja unida a la mesa de rotación, a un ritmo de 50 o 100 fotogramas/s. Los registros de la rotación de la cabeza y de las posiciones de los ojos se sincronizaron y analizaron *offline* con un convertidor análogo/digital para calcular la ganancia y la fase. Se grabó digitalmente la posición de la cabeza y los ojos en el mismo convertidor, analógico/digital y se procesaron usando una secuencia de comandos de Matlab con un programa de seguimiento diseñado *ad hoc* por el laboratorio. La ganancia se calculó como el desplazamiento angular medio del ojo dividido por el desplazamiento angular de la cabeza evocado experimentalmente. La ganancia del VOR en el ratón es normalmente $\ll 1$ (de Jeu & De Zeeuw, 2012; Stahl et al., 2006). La fase se determinó como la diferencia angular media (en grados) entre la posición del ojo en relación a la posición de la cabeza (de Jeu & De Zeeuw, 2012; Sergaki et al., 2017).

3.2.14. Pruebas de interacción social

Para evaluar la interacción social se situó al animal (un ratón macho ≥ 3 meses) en un recinto (69 cm de largo x 41 cm de ancho x 37 cm de alto) en el que podía moverse libremente, y que contenía 1 jaula circular, de la misma medida, a cada lado. Esta prueba constó de tres fases consecutivas: habituación, sociabilidad y novedad social. Para la **habituación**, cada ratón se colocó en dicho recinto durante 5 min con ambas jaulas vacías, para descartar los ratones que tenían una clara preferencia por una de las dos jaulas. En la prueba de **sociabilidad**, se colocó un

ratón joven macho (22-30 días) con el que el ratón sujeto de estudio no había interactuado previamente (no familiar) dentro de una de las dos jaulas. Finalmente, en la prueba de **novedad social** se colocó otro ratón no familiar en la jaula que estaba vacía. Cada sesión duró 10 min y todos los experimentos se grabaron en vídeo desde un plano cenital, y se analizaron de forma ciega al genotipo y tratamiento. Los ratones no familiares eran los mismos para cada cohorte de ratones (5-6 ratones para cada una de las cuatro condiciones experimentales). Se midió el tiempo de interacción del ratón con cada una de las jaulas (en contacto directo u olfateando activamente la jaula a menos de 1 cm). El tiempo de interacción se utilizó para calcular el índice de Discriminación (ID) = $(X_2 - X_1) * 100 / (X_2 + X_1)$. De este modo, en el test de sociabilidad, X_2 y X_1 se corresponden con el tiempo de interacción con la jaula que contenía un ratón juvenil y con la jaula vacía, respectivamente; y en el test de novedad social, X_2 y X_1 representan el tiempo de interacción con el ratón no familiar y con el ratón familiar, respectivamente.

3.2.15. Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos de electrofisiología se realizaron a partir de ≥ 6 rodajas por tratamiento procedentes de ≥ 4 ratones de cada uno de los genotipos. Sólo se registró una célula de cada rodaja. Los experimentos de microscopía electrónica se realizaron a partir de ≥ 3 preparaciones independientes de rodajas cerebrales (2 rodajas por tratamiento) procedentes de ≥ 3 ratones de cada uno de los genotipos estudiados. Los experimentos de liberación de glutamato, determinación de los niveles de cAMP, determinación de Ca^{2+} citosólico e inmunocitofluorescencia, se llevaron a cabo, al menos, por triplicado empleando 4 ratones en cada experimento. Los experimentos conductuales se realizaron en ≥ 3 cohortes independientes de ratones que contenían todos los grupos experimentales (≥ 11 animales por grupo experimental).

Para el análisis estadístico se utilizó GraphPad InStat v2.05a, SigmaPlot 10 y OriginPro 8.0. Para comparar entre los distintos conjuntos de datos se utilizó el test de t de Student no pareado de dos colas o el test de Welch cuando las varianzas de las poblaciones fueron significativamente diferentes. Cuando se compararon más de dos conjuntos de datos se utilizó un ANOVA de una vía (con el test post hoc de Holm-Sidak), ANOVA de dos vías (con los test post hoc de Bonferroni o Tukey) o un ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguida por los test post hoc de Holm-

Materiales y Métodos

Sidak o LSD. Cuando las varianzas de las poblaciones eran significativamente diferentes se utilizó el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn. Se calculó el valor de p para los efectos fijos y sus interacciones se obtuvieron mediante un test de Wald y los test post hoc se ajustaron con el método Tukey HSD. Los datos se representaron como la media \pm S.E.M (barras de error) y se estableció que existía una significación estadística si el valor de $p < 0,05$ con un intervalo de confianza del 95%.

Resultados

4. Resultados

4.1. La señalización por el receptor β_1 -Adrenérgico/Epac2 aumenta el número de vesículas competentes para la exocitosis (RRP) y es necesaria para la LTP de las fibras paralelas

El AMP cíclico (cAMP) es un segundo mensajero importante en la regulación de la función presináptica y su incremento está asociado a la potenciación de la liberación de glutamato (Herrero & Sánchez-Prieto, 1996; Millán et al., 2002) y de la transmisión sináptica (Chavez-Noriega & Stevens, 1994; Chen & Regehr, 1997; Kaneko & Takahashi, 2004; Sakaba & Neher, 2001). El cAMP también juega un papel fundamental en los procesos de plasticidad presinápticos, que requieren de un aumento de la liberación de NT (Castillo et al., 2002; Salin et al., 1996; Villacres et al., 1998). El mecanismo por el cual el cAMP aumenta la liberación de NT no depende de la entrada de Ca^{2+} ni de la excitabilidad del terminal sináptico (Chen & Regehr, 1997; Kaneko & Takahashi, 2004) sino de modulaciones en la maquinaria exocitótica. Se ha descrito que la vía de señalización del cAMP incrementa tanto el tamaño de la RRP como la probabilidad de liberación de las sinapsis (Chen & Regehr, 1997; Kaneko & Takahashi, 2004; Sakaba & Neher, 2001; Yao & Sakaba, 2010). Los receptores β_1 -adrenérgicos se localizan en los axones que establecen sinapsis asimétricas glutamatérgicas (Ferron et al., 2014) y pueden activar la adenilato ciclasa y generar cAMP, promoviendo así la liberación de glutamato (Ferrero et al., 2016; Herrero & Sánchez-Prieto, 1996; Millán et al., 2002), la transmisión sináptica y la plasticidad sináptica (Huang et al., 1996; Huang & Hsu, 2006).

El cerebelo recibe una extensa inervación noradrenérgica proveniente del *locus coeruleus* que se distribuye por la corteza cerebelar y los núcleos cerebelosos profundos (Abbott & Sotelo, 2000). Estudios de hibridación *in situ* indican que en la corteza cerebelar se expresan todos los subtipos de receptores α_1 y α_2 adrenérgicos, tanto en las interneuronas de la capa molecular como en las dendritas de las células de Purkinje (PC) (Hirono et al., 2008; Papay et al., 2006). La activación de los receptores α adrenérgicos produce una inhibición de la transmisión excitadora en las PC mediante un mecanismo postsináptico. En cuanto a los receptores β -adrenérgicos, se sabe que hay expresión del receptor β_1 en las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje (Paschalis et al., 2009). También se ha encontrado una expresión alta del receptor adrenérgico β_2 en la capa molecular y el soma de las PC y que su activación provoca un aumento en la

Resultados

amplitud de los EPSCs que es principalmente de origen postsináptico (Lippiello et al., 2015). Por otro lado, aun cuando estudios previos de nuestro grupo han identificado receptores β adrenérgicos (β -ARs) en axones glutamatérgicos capaces de potenciar la liberación mediante la activación de la adenilato ciclasa y de Munc13-1 en preparaciones de sinaptosomas de corteza cerebral (Ferrero et al., 2013), se desconoce la relevancia fisiológica de esta vía de señalización en mecanismos de plasticidad sináptica que implican incremento de los niveles de cAMP, como la potenciación a largo plazo descrita en las sinapsis entre los terminales de las células granulares (Fibras Paralelas) y las células de Purkinje del cerebelo (PF-PC LTP) (Salin et al., 1996).

Caja 1. Cerebelo

Nuestra capacidad de relacionarnos con el entorno depende de la capacidad de nuestro cerebro de crear un modelo de lo que nos rodea que nos permita predecir las consecuencias de nuestros movimientos (Llinás & Roy, 2009). El cerebelo compara la intención de nuestras acciones motoras con su ejecución y resultados (D'Angelo, 2011). Esta estructura se localiza en la fosa posterior y está formado por la corteza cerebelosa y los núcleos cerebelares profundos (DCN del inglés *Deep Cerebellar Nuclei*). La corteza cerebelosa, a su vez, puede dividirse sagitalmente en el lóbulo floculonodular en la región central, rodeado por la vermis y la paravermis, y en la región más distal, los hemisferios laterales. Las vías eferentes del cerebelo transcurren a través de los DCN que proyectan a varios núcleos del tronco encefálico (formación reticular primaria, núcleo rojo, núcleo vestibular y oliva inferior) así como a la corteza cerebral pasando por el tálamo. Las aferencias del cerebelo se originan en la corteza cerebral, en los núcleos del tronco encefálico y en la médula espinal dando lugar a los tractos espinocerebelares dorsal y ventral.

Funcional y conectivamente, el cerebelo puede dividirse en tres regiones principales: el vestibulocerebelo, el espinocerebelo y el cerebrocerebelo. Estas regiones están implicadas en distintos circuitos junto con otras regiones del cerebro y participan en distintos procesos. El vestibulocerebelo está formado por el núcleo floculonodular y la vermis anterior y está funcionalmente conectado al sistema vestibular. Lesiones en esta región provocan disfunción de los aferencias vestibulocerebelares causando problemas en el equilibrio y en el control de los movimientos oculares. El espinocerebelo está formado por la vermis y la región paravérmica y está conectado a los sistemas sensoriales y motores de la corteza cerebral. Lesiones en esta región provocan problemas en la marcha y en el tono postural. Por último, el cerebrocerebelo está formado por los hemisferios laterales y está fundamentalmente conectado a la corteza cerebral. Lesiones en esta región causan impedimentos en los movimientos voluntarios planeados, incluyendo temblor, problemas de escritura, disartria y dismetría.

A nivel microscópico la corteza, cerebelosa está formada por una capa granular, una capa molecular y una capa de células de Purkinje y tiene dos vías de información principales, las fibras musgosas y las fibras trepadoras. Las fibras musgosas activan a las células granulares en la capa granular. Las células granulares proyectan las fibras paralelas (PF) las cuales establecen sinapsis con las dendritas de las neuronas de Purkinje (PC) en la capa molecular, activándolas y produciendo así la inhibición de los DCN. Además de ser activadas por las PF, las neuronas de Purkinje también son activadas por las fibras trepadoras (CF) generadas por la oliva inferior (IO). Estas fibras excitadoras también activan neuronas GABAérgicas como las células de Golgi, las células en cesto y las células estrelladas, dando lugar a distintos tipos de inhibición.

4.1.1. La NA y el isoproterenol potencian la transmisión sináptica en las sinapsis PF-PC mediante un mecanismo presináptico dependiente de β_1 -AR

Las fibras noradrenérgicas se encuentran distribuidas por el cerebelo estableciendo inervaciones noradrenérgicas en la corteza cerebelar que modulan su actividad. Las varicosidades noradrenérgicas están en contacto con secciones dendríticas que pertenecen principalmente a PCs (Abbott & Sotelo, 2000). Por tanto, parece razonable pensar que un protocolo de inducción de la LTP presináptica de las sinapsis PF-PC (Salin et al., 1996) puede producir una liberación de noradrenalina (NA) que active los receptores β_1 -AR de las PF, desenmascarando así la fuente del cAMP que se requiere para esta LTP. Para contrastar esta teoría se realizaron experimentos de electrofisiología en rodajas sagitales de cerebelo de ratón que mantienen la funcionalidad del circuito entre las PF y las PC. En estas rodajas se estimularon las PF y se registraron los EPSCs del soma de las PC. La NA indujo un aumento en la amplitud de los EPSCs del $100,9 \pm 3,4$ % al $194,1 \pm 11,2$ % (Fig. 1, A, B) que fue bloqueado por el antagonista específico de β_1 -AR, metoprolol (del $97,9 \pm 7,7$ % al $101,9 \pm 4,1$ %, Fig. 1A, B). Además, este incremento de la transmisión sináptica inducido por NA se acompañó de una disminución en el cociente de pares de pulsos (PPR) de $1,72 \pm 0,05$ en condiciones basales hasta $1,41 \pm 0,02$ tras la exposición a NA (Fig. 1C, D). Estos resultados indican que la potenciación de la transmisión sináptica mediada por NA depende de un aumento de la liberación de NT dependiente de la activación de β_1 -ARs.

Resultados

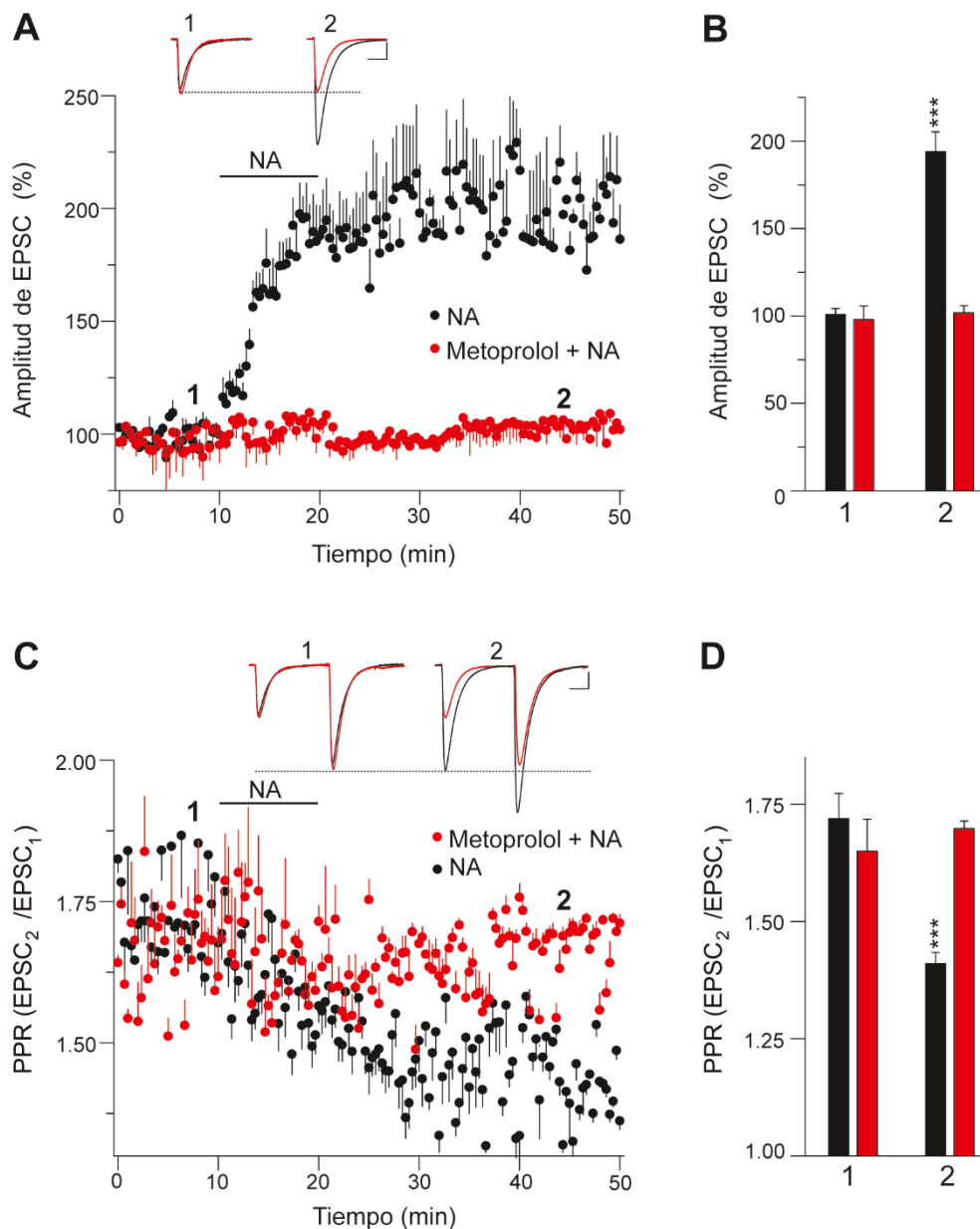


Figura 1. La noradrenalina potencia la transmisión en las sinapsis PF-PC. EPSCs registrados en las células de Purkinje mediante estimulación a 0,05 Hz de las fibras paralelas. **A**, La aplicación de NA (10 min, 100 μ M) produjo un aumento de la amplitud de los EPSCs mantenido en el tiempo y sensible al antagonista de los receptores β_1 -ARs, metoprolol (60 μ M, 30 min). **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los EPSCs. Se analizaron los EPSCs 40 minutos después (2) de aplicar NA en ausencia ($n = 10$ células/10 rodajas/5 ratones, $***p < 0,001$, test de Welch) o presencia de metoprolol ($n = 4$ células/4 rodajas/2 ratones, $p > 0,05$, test de t de Student) y se compararon con los valores previos (1) a la aplicación de NA. **C**, Análisis de los cambios en la PPR (EPSC₂/EPSC₁) durante los experimentos realizados en A: (1) valores basales y (2) 40 min después de la aplicación de NA. **D**, Cuantificación de los cambios en la PPR inducidos por la aplicación de NA en ausencia ($***p < 0,001$, test de Welch) o presencia de metoprolol ($p > 0,05$, test de Welch) relativos a los valores basales (1). Los ejemplos de trazos de los EPSC (A, C) representan la media de seis EPSCs consecutivos a 0,05 Hz antes (1) y 40 minutos después (2) del tratamiento. Escala: 50 pA y 15 ms. Los datos representan la media \pm SEM.

En este mismo sentido, observamos que el agonista de β -AR, isoproterenol, también aumentó la amplitud de los EPSCs de un nivel basal del $101,9 \pm 3,4$ al $202,6 \pm 13,6$ % (Fig. 2A, B) y disminuyó la PPR (de $1,71 \pm 0,09$ a $1,38 \pm 0,05$, Fig. 2C, D) y que ambas respuestas fueron inhibidas por el antagonista específico de β_1 -AR, metoprolol (Fig. 2A, B). Para excluir la posibilidad de que estuviesen participando receptores β -ARs postsinápticos (Lippiello et al., 2015), bloqueamos la actividad de los GPCRs postsinápticos sustituyendo el GTP por su análogo no hidrolizable guanosina 5'-O-(γ tio-trifosfato) (GTP γ S) en la pipeta de registro, y observamos que tanto el aumento de la amplitud de los EPSCs como la disminución de la PPR asociada permanecieron intactas en estas condiciones (del $104,46 \pm 4,1$ % al $187,1 \pm 13,2$ % de amplitud del EPSC y de $1,96 \pm 0,16$ a $1,42 \pm 0,05$ en cuanto a la PPR Fig. 2A, B, C, D). Por lo tanto, el aumento en la amplitud de los EPSCs inducido por isoproterenol es el resultado de la activación de β_1 -ARs presinápticos que aumentan la liberación de glutamato.

Resultados

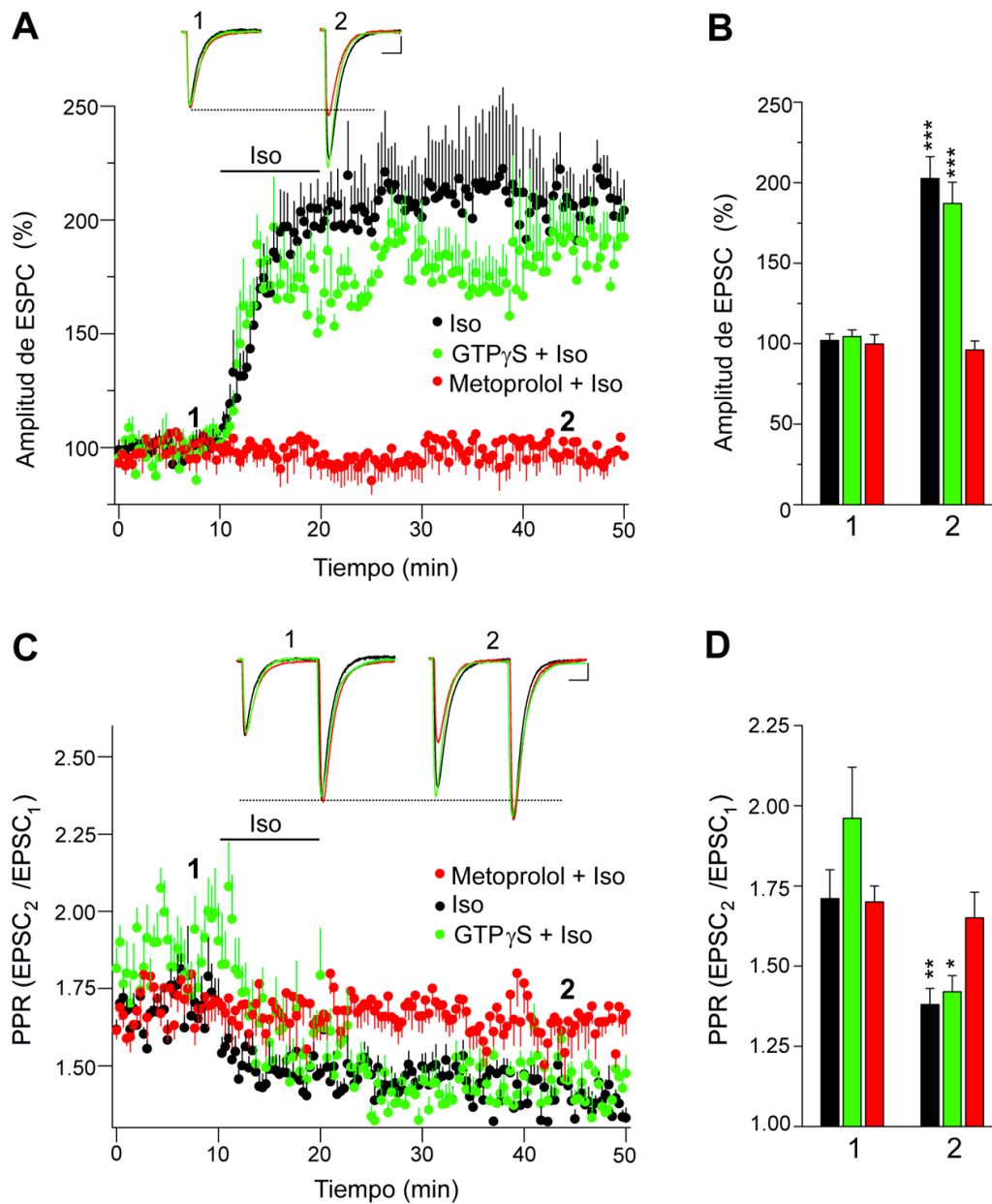


Figura 2. El isoproterenol potencia la transmisión sináptica en la sinapsis PF-PC mediante la activación de β_1 -ARs presinápticos. EPSCs registrados en las células de Purkinje mediante estimulación a 0,05 Hz de las fibras paralelas. **A**, La aplicación del agonista de β_1 -ARs isoproterenol (100 μ M, 10 min) produjo un aumento de la amplitud de los EPSCs mantenido en el tiempo, que fue sensible al antagonista específico de β_1 -ARs metoprolol (60 μ M, 30 min), pero no fue afectado por la presencia del análogo no hidrolizable de GTP, GTP γ S (1 mM, 15min) en la pipeta de registro. **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los EPSCs inducidos por isoproterenol. Se analizaron los EPSCs 40 minutos después (**2**) de la aplicación de isoproterenol en ausencia ($n = 13$ células/13 rodajas/6 ratones, $***p < 0,0001$, test de Welch) y en presencia de metoprolol ($n = 11$ células/11 rodajas/5 ratones, $p > 0,05$, test de t de Student) o de GTP γ ($n = 11$ células/11 rodajas/5 ratones, $***p < 0,001$, test de Welch) comparándolos con los valores previos a la aplicación de isoproterenol (**1**). **C**, Cambios en la PPR (EPSC₂/EPSC₁) inducidos por la aplicación de isoproterenol en las diferentes condiciones. **D**, Cuantificación de los cambios en la PPR inducidos por la aplicación de isoproterenol (**2**) en ausencia ($p < 0,01$, test de t de Student) o presencia de metoprolol ($p > 0,05$, test de t de Student) o de GTP γ S ($p < 0,05$, test de t de Student) relativos a los valores basales (**1**). Los ejemplos de trazos de los EPSC (A, C) representan la media de seis EPSCs consecutivos a 0,05 Hz tomados antes (**1**) y después (**2**) del tratamiento. Escala: 50 pA y 15 ms. Los datos representan la media \pm SEM.

4.1.2. Localización subcelular del receptor β_1 -adrenérgico en los compartimentos presinápticos del cerebelo

Para comprobar la presencia de β_1 -ARs presinápticos en las sinapsis PF-PC, se realizaron experimentos de microscopía electrónica con inmunodetección con partículas de oro en rodajas de cerebelo en las que se analizó su distribución en la capa molecular. Las inmunopartículas asociadas a β_1 -AR se observaron a lo largo de la membrana plasmática (cabezas de flecha) de los terminales de PFs (Fig. 3A-C, pf) estableciendo sinapsis asimétricas con espinas dendríticas (Fig. 3A-C, s) de PCs. Era menos frecuente encontrar inmunopartículas de β_1 -AR en posiciones postsinápticas a lo largo de la membrana plasmática (flechas) de espinas dendríticas pertenecientes a PCs (Fig. 3A-C, s) y de tallos dendríticos (Fig. 3A-C, Den). La distribución del receptor β_1 -AR también se estudió en la capa molecular de micrografías electrónicas de cerebelos con marcaje para la tirosina hidroxilasa (TH) usando una reacción de inmunoperoxidasa. Se observó marcaje de β_1 -AR a lo largo de la membrana plasmática (Fig. 3D, E, cabezas de flecha) de terminales de PFs (Fig. 3D, E, pf), siempre próximos a las fibras inmunopositivas a TH (Fig. 3D, E, asteriscos blancos). La cuantificación de las inmunopartículas de β_1 -AR en la capa molecular del cerebelo (3 preparaciones con $n = 502$) reveló que estas eran más frecuentes en los compartimentos presinápticos ($57,0 \pm 0,9 \%$, $p < 0,001$, t de Student), concretamente en la zona activa de terminales axónicos ($66,4 \pm 1,1 \%$, $p < 0,001$, t de Student), que en localizaciones extra-sinápticas ($33,6 \pm 1,1 \%$, Fig. 3F). Estos resultados confirman la presencia de β_1 -ARs presinápticos en las sinapsis PF-PC.

Resultados

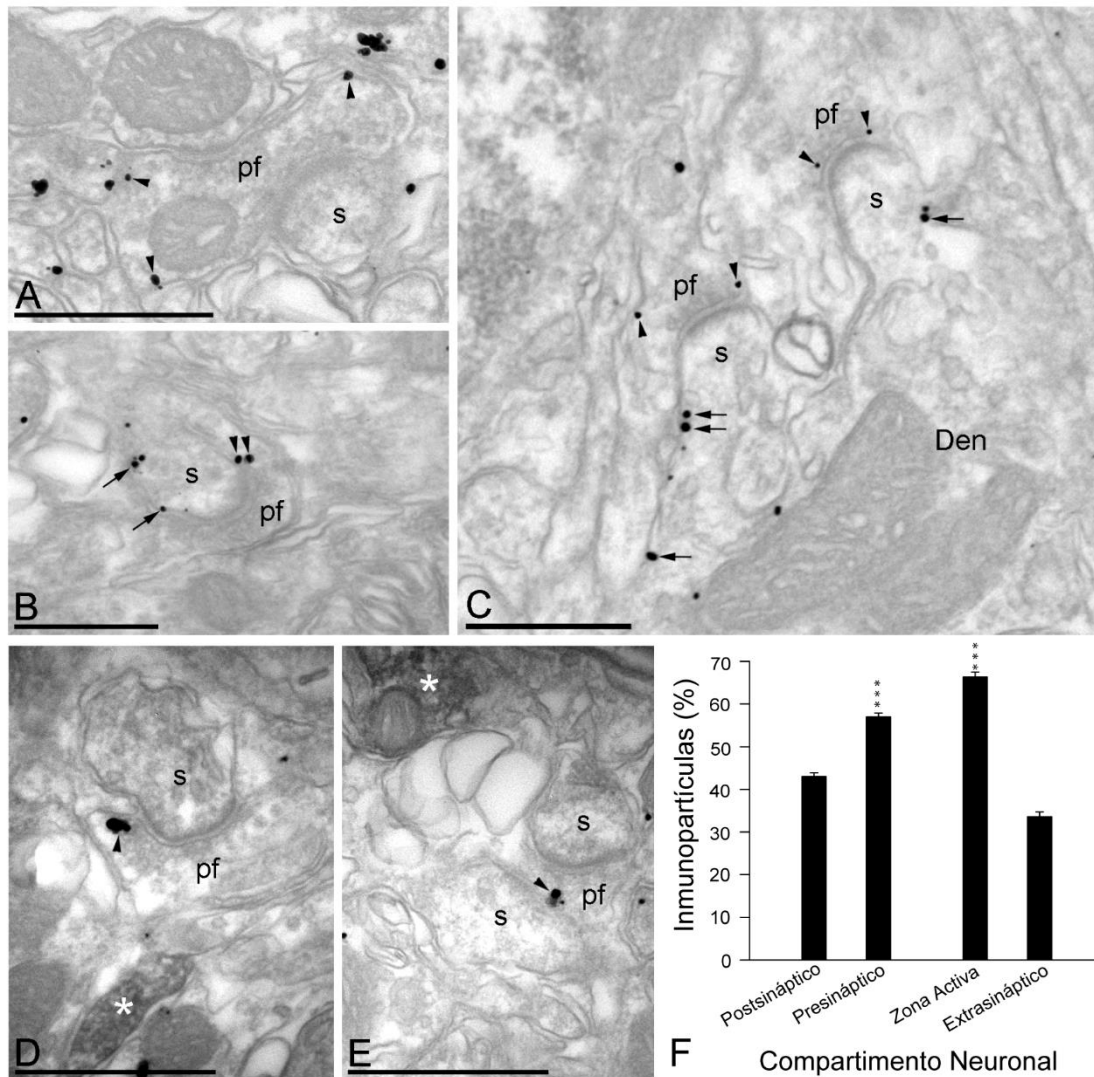
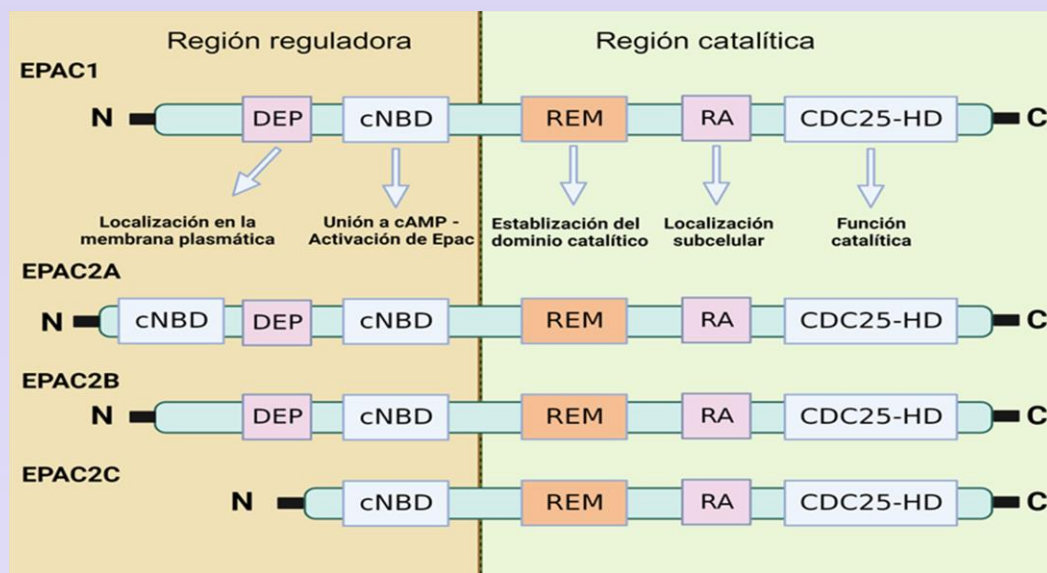


Figura 3. Localización subcelular de los receptores β_1 -AR en los compartimentos presinápticos del cerebelo. A-C, Micrografías electrónicas de la capa molecular del cerebelo mostrando inmunomarcaje con partículas de oro para el receptor β_1 -AR, realizado antes de la inclusión en resina. Las inmunopartículas de β_1 -AR se observaron a lo largo de la membrana plasmática (**cabezas de flecha**) de los terminales de las fibras paralelas (**pf**) estableciendo sinapsis excitadoras con las espinas dendríticas (**s**) de las PCs. Se observó con menor frecuencia la presencia de inmunopartículas de β_1 -AR en las localizaciones postsinápticas a lo largo de la membrana plasmática (**flechas**) de las espinas dendríticas (**s**) y en los tallos dendríticos (**Den**) de las PCs. D, E, Micrografías electrónicas de la capa molecular del cerebelo con el doble marcaje mediante las inmunopartículas de β_1 -AR y la reacción de la peroxidasa usada para detectar la TH. Las inmunopartículas de β_1 -AR se observan a lo largo de la membrana plasmática (**cabezas de flechas**) de los terminales de las **pf**, siempre en proximidad al marcaje de TH (**asteriscos blancos**). F, análisis cuantitativo mostrando el porcentaje de inmunopartículas β_1 -AR en la capa molecular del cerebelo. Las inmunopartículas (502) de β_1 -AR se observaron con más frecuencia en los compartimentos presinápticos ($57,0 \pm 0,9\%$, $***p < 0,001$) y en los terminales axónicos que en los compartimentos postsinápticos ($43,0 \pm 0,9\%$). Además, se encontraban con mayor frecuencia en la zona activa ($66,4 \pm 1,1\%$, $***p < 0,0001$) que en regiones extrasinápticas ($33,6 \pm 1,1\%$). Los datos se compararon usando el test de t de Student no pareado. Escala: A, D, E 500 nm; B, C 200 nm. Los datos representan la media \pm SEM.

Caja 2. Epac

Hasta que se encontraron las proteínas Epac (de Rooij et al., 1998) se pensaba que PKA y los canales operados por nucleótidos cíclicos eran las únicas dianas para el cAMP. EPAC es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina. Existen dos variantes de la proteína Epac (Epac1 y 2) codificadas por los genes RAPGEF3 y RAPGEF4 respectivamente. Mientras que Epac 1 se expresa de manera ubicua en la mayoría de los tejidos, Epac2 está solo presente en el cerebro, glándulas adrenales, páncreas e hígado. Las distintas isoformas de Epac2 (Epac2A1, Epac2A2, Epac2B y Epac2C) tienen distintos patrones de expresión bien definidos (Hoivik et al., 2013). Ambas isoformas de Epac presentan una estructura similar, con una región amino-terminal reguladora, y una región C-terminal catalítica. La región reguladora consta de un dominio cNBD (de unión a nucleótidos cíclicos) y un dominio DEP (Dishevelled, Egl10, Pleckstrina). Por otro lado, su región catalítica comprende un dominio de intercambio de RAS (REM) y el dominio catalítico (CDC25HD) y un dominio de interacción con RAS activada (RA).



El dominio DEP será importante tanto para la localización como para la función de Epac ya que la unión de cAMP al dominio cNBD permitirá que el DEP interactúe con el ácido fosfatídico de la membrana, facilitando así la activación de las moléculas de Rap1 presentes en ésta (Consonni et al., 2012). El dominio DEP participa en la localización en la membrana plasmática de Epac1 y en la localización subcelular de Epac2. El dominio REM estabilizará la hélice catalítica del dominio CDC25HD, que es el responsable del intercambio de nucleótidos de guanina. El dominio RA es un dominio de interacción con proteínas que ayuda a la localización perinuclear de Epac1 y regula la localización en la membrana plasmática de Epac2 (Banerjee & Cheng, 2015). Al unirse el cAMP, Epac sufrirá un cambio conformacional y se activará, catalizando el intercambio de GDP por GTP de las GTPasas pequeñas de tipo Ras, Rap1 y 2. Estas GTPasas, una vez activas, activarán un gran número de proteínas efectoras como PKC ϵ , PLC y MAPKs, que a su vez regularán numerosas funciones celulares (Gloerich & Bos, 2010; Rehmann et al., 2003).

Resultados

Debido a que cAMP activa tanto Epac como PKA y que su afinidad por cAMP in vivo es similar, la separación de los efectos mediados por ambas enzimas no ha sido posible hasta el desarrollo de fármacos selectivos (Holz et al., 2006). Estos compuestos son análogos sintéticos de cAMP en los que el grupo 2'-hidroxilo del cAMP ha sido sustituido por un grupo 2'-O-Me, haciendo que sean más selectivos para Epac. Uno de estos análogos, el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT), presenta una gran afinidad por Epac (Kd, 2.2 μ M) y una baja afinidad por PKA (Kd, 200 – 300 μ M) (Schwede et al., 2015). El uso de este y otros activadores específicos de Epac han permitido comprobar que la señalización mediada por Epac regula tanto la probabilidad de liberación como la RRP en las sinapsis del SNC, sin afectar a las corrientes de K⁺ o Ca²⁺, de manera similar a lo observado en la potenciación presináptica mediada por cAMP (Gekel & Neher, 2008; Zhong & Zucker, 2005).

Estudios de electrofisiología han demostrado que Epac regula la liberación de neurotransmisor y la plasticidad sináptica en el SNC. En el hipocampo de ratones KO para Epac1 y 2 se observó una reducción en la amplitud de los EPSCs y en la frecuencia, pero no en la amplitud de los mEPSCs en las sinapsis entre las SC y las neuronas piramidales de CA1. Aparte de estos efectos en la transmisión basal, también se produjo la pérdida de STP y de la LTP en estas sinapsis (Yang et al., 2012). Otro estudio demostró que la LTP mediada por cAMP entre las fibras musgosas del hipocampo y las neuronas piramidales de CA3 depende de Epac2. En estas sinapsis, la inducción de la LTP mediante un estímulo de alta frecuencia o aumentando los niveles de cAMP con el activador de la adenilato ciclasa, forskolina, estaba ausente en un ratón KO para Epac2, sin embargo, la inhibición selectiva de PKA no afectaba a la LTP. La función de Epac2 en esta sinapsis no afecta a la STP ni a la transmisión basal, sino que tenía un papel importante en la regulación de la RRP, en este caso sin afectar a la probabilidad de liberación (Fernandes et al., 2015).

También se ha descrito que Epac está implicado en la plasticidad postsináptica en el hipocampo. La activación de Epac dependiente de cAMP es necesaria para la LTD de las sinapsis SC-CA1 del hipocampo, donde Epac activará a Rap1 que, a su vez, activará la vía de p38-MAPK y dará lugar a una internalización de los receptores AMPA que contienen la subunidad GluR2/3 (Ster et al., 2009). Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio en sinaptosomas de corteza cerebral describió un mecanismo de potenciación de la liberación de glutamato mediado por el receptor adrenérgico β_1 y Epac. La activación farmacológica de este receptor, así como el aumento de la concentración de cAMP mediante el uso de forskolina, incrementaron la liberación de glutamato en estos terminales, efecto que también se observaba utilizando el agonista de Epac 8-pCPT, pero que era independiente de PKA. La activación de Epac conducía a la activación de PLC y a la síntesis de DAG. Este DAG promovía la translocación de Munc13-1 a la membrana de la ZA y la asociación de Rab3 con RIM1 α , dando lugar a un aumento en las vesículas ancladas a la membrana de la ZA (Ferrero et al., 2013).

4.1.3. La potenciación de la transmisión sináptica mediada por isoproterenol en las sinapsis PF-PC es dependiente de la proteína Epac y no de PKA

Existe controversia sobre si la señalización por cAMP asociada a la potenciación inducida por la activación de β -ARs es dependiente de PKA (Linden & Ahn, 1999) o independiente de ésta (Fernandes et al., 2015; Ferrero et al., 2013; Gekel & Neher, 2008; Huang & Hsu, 2006). Para comprobar si la potenciación es debida a PKA, se aplicó de nuevo isoproterenol y se vio que provocaba un aumento en la amplitud de los EPSCs del $100,8 \pm 4,1$ % al $201,8 \pm 15,4$ % en las sinapsis PF-PC, que resultó afectado por los inhibidores de PKA, H-89 ($99,8 \pm 4,4$ % a $206,5 \pm 11,4$ %) o KT5720 ($98,9 \pm 4,5$ % a $200,0 \pm 7,7$ % Fig. 4A, B). Se ha descrito que Epac es capaz también de mediar efectos presinápticos (Alonso et al., 2017; Fernandes et al., 2015; Ferrero et al., 2013; Gekel & Neher, 2008; Huang & Hsu, 2006a; Kaneko & Takahashi, 2004; Ramírez-Franco et al., 2014; Yang et al., 2012). De este modo, cuando aplicamos el inhibidor selectivo de Epac2, ESI-05, que se une a la interfaz formada entre los dos únicos dominios de unión a cAMP de Epac2 (Tsalkova et al., 2012), se inhibió el aumento de la amplitud de los EPSCs mediado por isoproterenol ($101,3 \pm 4,8$ % a $99,3 \pm 3,55$, Fig4. A, B). En concordancia con esto, el activador de Epac, 8pCPT, aumentó la transmisión sináptica del $104,3 \pm 4,6$ % al $204,3 \pm 7$ %, (Fig4. A, B). Esta potenciación estaba mediada por un mecanismo presináptico ya que se asoció con una disminución de la PPR (de $1,61 \pm 0,03$ en condiciones basales a $1,43 \pm 0,03$ con el 8pCPT, Fig. 4C, D). Por tanto, las proteínas Epac son activadas por cAMP en las sinapsis PF-PC y son necesarias para la potenciación de la transmisión sináptica mediada por β -ARs.

Resultados

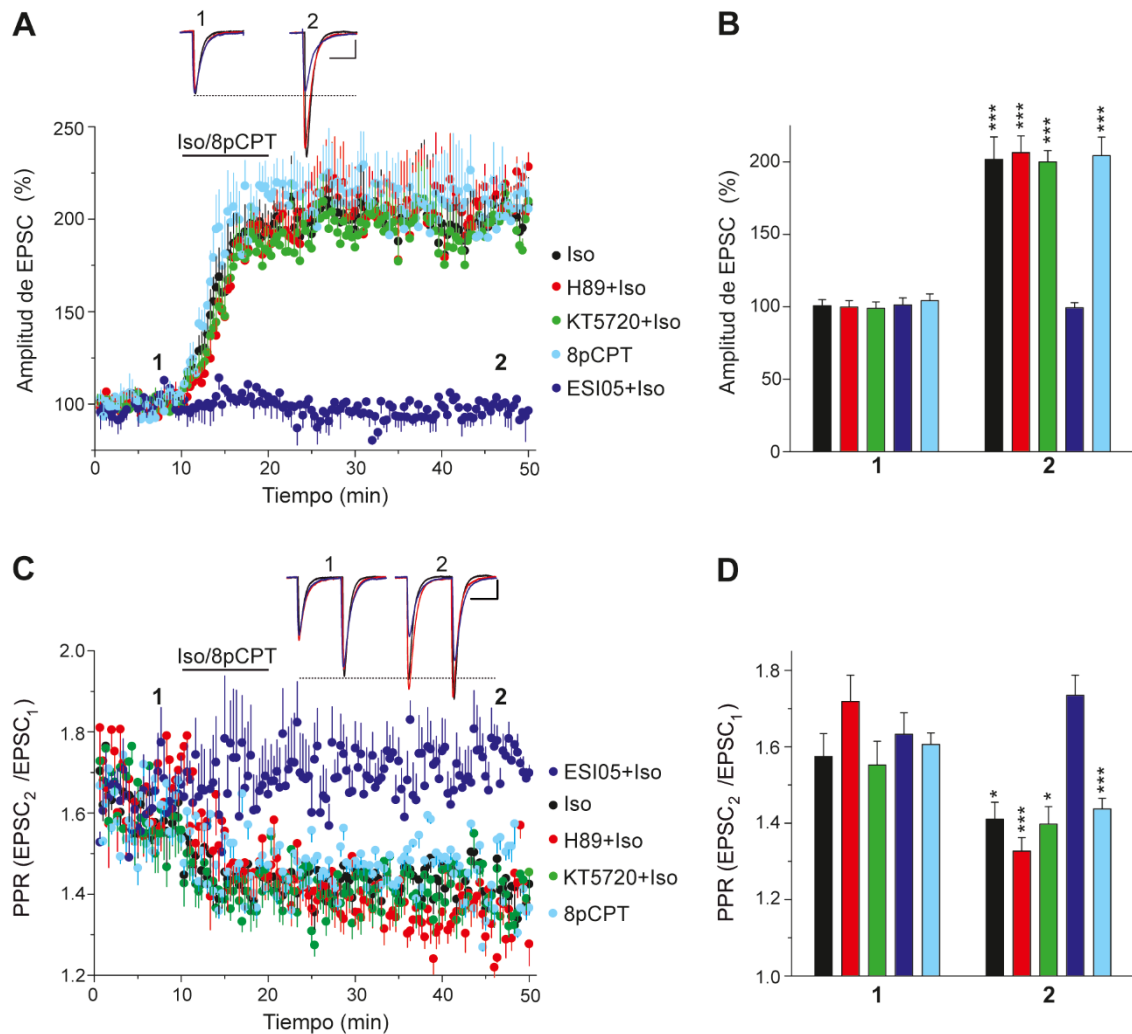


Figura 4. La potenciación de la transmisión en las sinapsis PF-PC por isoproterenol depende de la activación de Epac pero no de PKA. **A**, El agonista de β_1 -AR isoproterenol (100 μ M, 10 min) indujo un aumento de la amplitud de los EPSCs mantenida en el tiempo que no fue sensible a los inhibidores de PKA H-89 (10 μ M, 30 min) y KT-5720 (2 μ M, 30 min). Sin embargo, esta respuesta no se observó en presencia del inhibidor de Epac2 ESI-05 (10 μ M, 30 min) y, además, fue mimetizada por el activador de Epac 8pCPT (50 μ M, 10 min). **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los EPSCs 40 min después de la aplicación de isoproterenol/8pCPT (**2**). Efecto de la aplicación de isoproterenol en ausencia ($n = 11$ células/11 rodajas/5 ratones, $***p < 0,001$, test de Welch) o en presencia de H-89 ($n = 11$ células/11 rodajas/5 ratones, $***p < 0,001$, test de Welch), KT-5720 ($n = 11$ células/11 rodajas/5 ratones, $***p < 0,0001$, test de Welch), ESI-05 ($n = 10$ células/10 rodajas/4 ratones, $p > 0,05$, test de Welch) o 8pCPT ($n = 12$ células/12 rodajas/5 ratones, $***p < 0,001$, test de t de Student) por separado. Los datos fueron comparados con sus respectivos valores antes de la aplicación de isoproterenol o 8pCPT (**1**). **C**, Cambios en la PPR (EPSC₂/EPSC₁) (en los mismos experimentos que en **A**) inducidos por la aplicación de isoproterenol o 8pCPT en diferentes condiciones. **D**, Cuantificación de los cambios en la PPR inducidos por 8pCPT ($***p < 0,001$) e isoproterenol (**2**) en la ausencia ($*p < 0,05$) o presencia de H-89 ($***p < 0,001$), KT-5720 ($*p < 0,05$) o ESI-05 ($p > 0,05$), relativo a los valores basales (**1**). Los trazos de ejemplo de los EPSC (**A**, **C**) representan la media de seis EPSCs consecutivos a 0,05 Hz tomados antes y 40 min después del tratamiento. Escala: 50 pA y 15 ms. Los datos representan la media \pm SEM.

Caja 3. Liberación de NTs: sincrónica, asincrónica y espontánea

Las vesículas de los terminales sinápticos presentan distintas características moleculares y morfológicas que determinan su pertenencia a distintos grupos o “poblaciones” vesiculares. Estas poblaciones se caracterizan por la probabilidad de fusión de sus vesículas, su cercanía a la membrana plasmática y su participación en los distintos modos de liberación de NT. La liberación sincrónica de NT constituye la base de la neurotransmisión rápida, es la que ocurre en el rango de milisegundos después del aumento en la $[Ca^{2+}]$ en el terminal sináptico con la llegada del potencial de acción. Las VSs que forman parte de la RRP son las que se asocian a esta liberación sincrónica, se sitúan más cercanas a la membrana de la ZA y tienen una mayor probabilidad de fusión (Kaesler & Regehr, 2017). En sinapsis pequeñas del SNC, incluyendo las hipocámpales, se ha visto que esta población correlaciona con las VSs ancladas a la membrana (Holderith et al., 2012). La población de reciclaje es un grupo de vesículas que se fusionan también mediante la despolarización del terminal, pero que requieren estimulaciones más prolongadas, siendo importantes para el mantenimiento de la RRP y de la liberación de NT en estas condiciones (Marra et al., 2012; Sara et al., 2002). La población de reciclaje tiene como marcador molecular la proteína sinapsina, necesaria para el mantenimiento de esta población y para regular la movilización de vesículas de la población de reciclaje a la de la RRP (Zhang & Augustine, 2021). Mientras que la RRP representa únicamente en torno al 0.5 ~ 1 % de la población total de VSs, la población de reciclaje representa entre el 10 y el 60 % (Guo et al., 2015). El resto de las VSs se encuentran en una tercera población denominada de reserva y participarán en la liberación de NT durante actividad muy intensa, aunque otros estudios indican que dicha población nunca se fusiona, y que su función es la de actuar como un repositorio de proteínas y NTs (Denker et al., 2011).

La **liberación asincrónica** es el proceso que comprende la fusión de VSs desde decenas hasta cientos de milisegundos tras la finalización del potencial de acción. A pesar de no estar involucrado en la transferencia rápida de información, este mecanismo es importante para los procesos plásticos de larga duración, especialmente en aquellos regulados por receptores extrasinápticos (Jappy et al., 2016). También es importante en la generación de oscilaciones de baja frecuencia, como las observadas en las interneuronas hipocámpales encargadas de mantener las oscilaciones teta (Jappy et al., 2016). A pesar de ser una liberación dependiente de Ca^{2+} , como la liberación sincrónica, algunos estudios indican que, tanto el sensor como las fuentes de Ca^{2+} involucradas en esta liberación, son distintas.

Las proteínas implicadas en la liberación sincrónica son las proteínas SNARE canónicas sinaptobrevina 2, SNAP25 y sintaxina 1, las proteínas de la ZA y los sensores de Ca^{2+} sinaptotagmina 1 y 2, que son las isoformas con menor afinidad por el Ca^{2+} (Bacaj et al., 2013; Sugita et al., 2002).

Resultados

Por otro lado, la **liberación asincrónica** parece estar regulada mayormente por el sensor de Ca^{2+} sinaptotagmina 7 (Wen et al., 2010), involucrar proteínas SNARE no canónicas como SNAP-23 y VAMP-4 (Weber et al., 2014) y depender también de fuentes de Ca^{2+} independientes de los VGCC, como la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, la activación de receptores metabotrópicos de adenosina (Khakh, 2009) o del Ca^{2+} residual del terminal tras el potencial de acción (Rozov et al., 2019). A pesar de estas diferencias, existen evidencias de que ambos modos de liberación dependen de la misma población de VSs y de que cuando se impide la liberación sincrónica mediante la eliminación de la sinaptotagmina 1 se produce un aumento en la magnitud de la liberación asincrónica (Hagler & Goda, 2001; Maximov & Südhof, 2005). Uno de los métodos para estudiar la liberación asincrónica consiste en la sustitución del Ca^{2+} por Sr^{2+} . El Sr^{2+} es capaz de entrar en el terminal durante un potencial de acción y disparar la fusión de las VSs mediante una interacción menos eficiente con sinaptotagmina 1 que el Ca^{2+} , pero dando lugar a una liberación mucho más prolongada en el tiempo que este último. Se piensa que esto se debe a que el Sr^{2+} se elimina de manera más lenta del terminal sináptico (Xu-Friedman & Regehr, 2000).

Un tercer mecanismo de liberación es la **liberación espontánea**, que ocurre sin la necesidad de un potencial de acción. Inicialmente se pensaba que esta liberación era causada por eventos de fusión espontáneos debidos a cambios en la maquinaria de fusión vesicular y que las vesículas que participaban en ésta eran las de la RRP, que participan en la liberación inducida por la llegada de un potencial de acción. Sin embargo, experimentos recientes contradicen esta teoría y afirman que la liberación espontánea procede de una población de VSs distinta, que presentaría diferente regulación y unos marcadores moleculares. Se ha comprobado que, aunque cerca del 80 % de los eventos de fusión espontánea están regulados por complejos SNARE canónicos, hay un porcentaje importante compuesto por proteínas no canónicas como VAMP4, VAMP7 o VTI1A (Kavalali, 2015). Además, el dominio H_{abc} de la sintaxina 1 es imprescindible para este proceso, cosa que no ocurre en los otros modos de liberación (Zhou et al., 2013), por lo que, aunque dependen parcialmente de la misma maquinaria SNARE, las interacciones moleculares necesarias para ambos tipos de liberación son distintas. Esta liberación es sensible a los niveles de Ca^{2+} presinápticos subumbrales, posiblemente mediante las proteínas DOC2 (del inglés *DOuble C2-like-domain protein*) (Groffen et al., 2010). Se ha visto que la liberación espontánea tiene importancia en la excitabilidad neuronal, facilitando la sumación eléctrica de eventos a nivel dendrítico (Sharma & Vijayaraghavan, 2003) y también está implicada en la activación de vías de señalización en la postsinapsis (Sutton et al., 2007). Para estudiar la liberación espontánea se registran las corrientes sinápticas en presencia del bloqueante de canales de Na^+ dependientes de voltaje, tetrodotoxina (TTX), que previene los potenciales de acción. Estos eventos se denominan EPSCs/IPSCs miniatura (mEPSCs/mIPSCs).

4.1.4. Isoproterenol y 8pCPT aumentan la frecuencia pero no la amplitud de los eventos de liberación asincrónicos

Uno de los métodos más eficaces para comprobar la naturaleza presináptica de los procesos plásticos es el análisis de los EPSCs en miniatura (mEPSCs). Un cambio en la frecuencia de los mEPSCs, pero no en su amplitud, nos estaría confirmando el origen presináptico de esta modulación. Sin embargo, las células de Purkinje no sólo reciben aferencias de las células granulares, sino también de las fibras trepadoras, que establecen sinapsis con dendritas principales preferentemente. Por tanto, no es posible distinguir entre los mEPSCs que provienen de las PFs y de las fibras trepadoras (Carey & Regehr, 2009). Para conseguir distinguir entre ambas aferencias, reemplazamos el Ca^{2+} de la solución extracelular de registro por Sr^{2+} . En presencia de Sr^{2+} , la liberación asincrónica está potenciada respecto de la sincrónica (Augustine & Eckert, 1984; Goda & Stevens, 1994; Miledi, 1966; Xu-Friedman & Regehr, 1999). Esta prolongación de la liberación asincrónica en respuesta a la estimulación de las PFs en la capa molecular nos permite aislar los eventos que provienen de estas aferencias, a los que llamaremos EPSCs asincrónicos (aEPSCs). El isoproterenol provoca un aumento en la amplitud de los EPSCs sincrónicos (sEPSCs) de $207,7 \pm 14,1$ pA a $332,9 \pm 24,6$ pA (Fig. 5A, B) y en la frecuencia media de los aEPSCs respecto del control, aumentando de $10,0 \pm 1,1$ Hz a $14,5 \pm 1,5$ Hz (Fig. 5C, D).

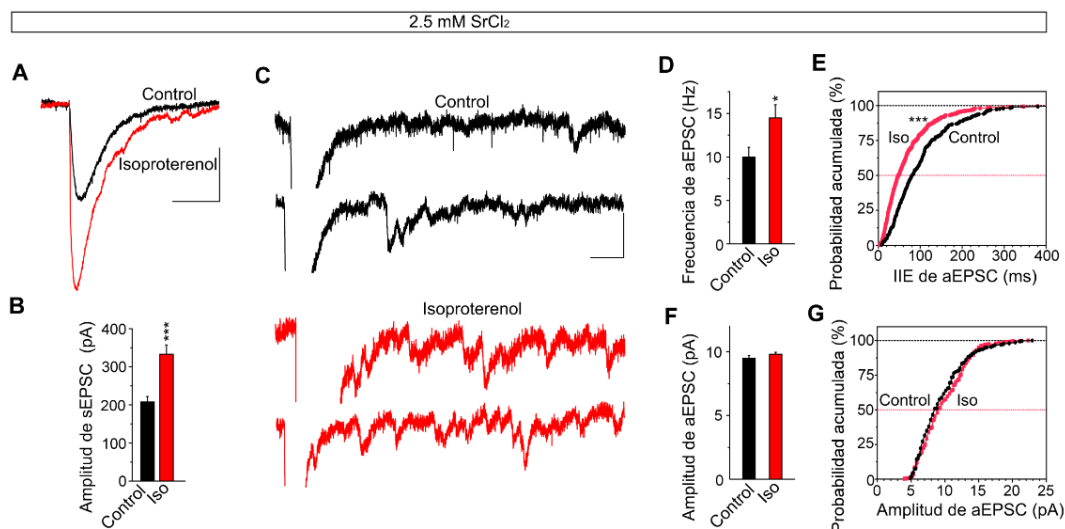


Figura 5. El isoproterenol incrementa la frecuencia pero no la amplitud de los eventos de liberación asincrónicos. **A**, Efecto de la aplicación de isoproterenol ($100 \mu\text{M}$, 10 min) en la amplitud de los EPSCs sincrónicos (sEPSCs) registrados en presencia de Sr^{2+} ($2,5$ mM). **C**, Trazos individuales mostrando eventos de liberación asincrónica en condiciones control (**negro**) y después de la aplicación de isoproterenol (**rojo**). **B**, Cuantificación de los efectos de la aplicación de isoproterenol ($n = 10/10$ rodajas/8 ratones, $*** p < 0,0001$, test de Welch) en la amplitud de los EPSCs. **D-G**, Cuantificación de efectos de la aplicación de isoproterenol en la frecuencia y la amplitud de los aEPSCs. La frecuencia de los aEPSCs aumentó con la aplicación de isoproterenol (**D**, $n = 10$ células/10 rodajas/8 ratones, $*p < 0,05$, test de t de Student) y se redujo el intervalo inter-evento (IIE) (**E**, $***p < 0,001$, test de Kolmogorov-Smirnov), sin afectar a la amplitud (**F**, $n = 10$ células/10 rodajas/7 ratones, $***p < 0,0001$, test de Welch) ni a la distribución de esta (**G**, $p > 0,05$, test de Kolmogorov-Smirnov). Escala: **A**, 100 pA y 50 ms; **C**, 25 pA y 50 ms. Los datos representan la media \pm SEM.

Resultados

Además, el isoproterenol redujo significativamente la duración de los intervalos inter-evento de los aEPSCs (Fig. 5E) sin afectar a la amplitud media ($9,50 \pm 0,20$ pA, $n = 301$, y $9,80 \pm 0,16$ pA, $n = 435$, Fig. 5F) o a la distribución de las amplitudes (Fig. 5G). De igual manera, el 8pCPT aumentó la amplitud media de los aEPSCs de $198,2 \pm 10,8$ pA al $340,2 \pm 25,5$ pA (Fig. 6B) y aumentó la frecuencia media de los aEPSCs de $9,30 \pm 0,6$ Hz a $16,2 \pm 1,3$ Hz ($n = 10$, $p < 0,001$, test de Welch, Fig. 6D), reduciendo la duración de los intervalos inter-evento de los aEPSCs Fig. 6E) sin cambiar la amplitud media de éstos (de $9,89 \pm 0,28$ pA, $n = 280$, a $9,96 \pm 0,17$ pA, Fig. 6F), aunque sí modificó ligeramente la distribución de amplitudes (Fig. 6G). Esto último se debe, probablemente, al efecto que tiene Epac en la probabilidad de apertura de los receptores AMPA en las PCs (Gutierrez-Castellanos et al., 2017). Dichos resultados indican que tanto el isoproterenol y el 8pCPT potencian la transmisión sináptica principalmente mediante efectos presinápticos.

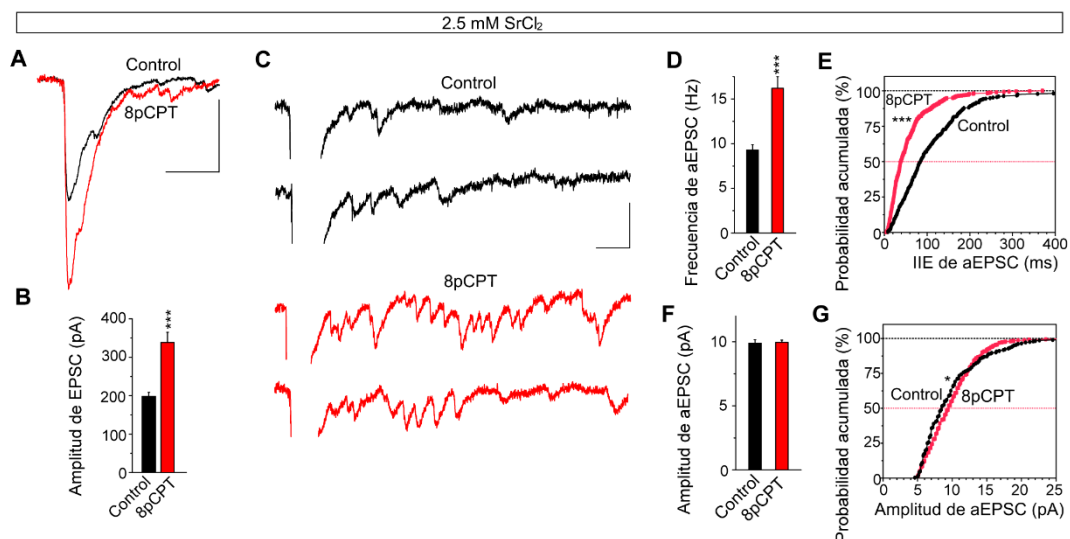


Figura 6. El 8pCPT incrementa la frecuencia pero no la amplitud de los eventos de liberación asincrónicos. A, Efectos de la aplicación de 8pCPT (50 μ M, 10 min) en la amplitud de los EPSCs sincrónicos (sEPSCs) registrados en presencia de Sr^{2+} (2,5 mM). **C,** Trazos individuales mostrando eventos de liberación asincrónica en condiciones control (negro) y después de la aplicación de 8pCPT (rojo). **B,** Cuantificación de los efectos de la aplicación de 8pCPT ($n = 10$ células/10 rodajas/8 ratones, *** $p < 0,0001$, test de Welch) en la amplitud de los aEPSCs. **D-G,** Cuantificación de efectos de la aplicación de 8pCPT en la frecuencia y la amplitud de los aEPSCs. La frecuencia de los aEPSCs aumentó con la aplicación de 8pCPT (**D**, $n = 10$ células/10 rodajas/7 ratones, *** $p < 0,0001$, test de Welch) y provocó una disminución en el IIE (**E**, *** $p > 0,0001$, test de Kolmogorov-Smirnov) sin afectar a la amplitud (**F**, $n = 10$ células/10 rodajas/7 ratones, $p > 0,05$, test de Welch). Sin embargo, sí tuvo un efecto en la distribución de amplitudes (**G**, * $< 0,05$, test de Kolmogorov-Smirnov). Escala: **A**, 100 pA y 50 ms; **C**, 25 pA y 50 ms. Los datos representan la media \pm SEM.

La cinética de los EPSCs depende en gran medida de la composición de receptores postsinápticos presentes en la sinapsis. Para descartar que la activación de la vía de señalización mediada por β_1 -AR /Epac afectaba a dicha composición, se analizó la cinética de los sEPSC tanto en presencia de Sr^{2+} como de Ca^{2+} (Fig. 7 A-C). En presencia de Sr^{2+} 2,5 mM, ni el isoproterenol ni el 8pCPT modificaron el tiempo de caída de los

sEPSCs (en milisegundos, de $20,7 \pm 2,5$ a $20,3 \pm 2,6$ con isoproterenol, y de $16,2 \pm 1,5$ a $14,8 \pm 0,9$ con 8pCPT, Fig. 7A, B), la pendiente de caída (en pA por ms, de $7,2 \pm 1,1$ a $8,9 \pm 1,2$ con isoproterenol, y de $7,0 \pm 0,5$ a $8,3 \pm 0,7$ con 8pCPT, Fig. 7C) o la variable tau de la caída (en milisegundos, de $28,5 \pm 2,1$ a $39,0 \pm 6,1$ con isoproterenol, y de $26,9 \pm 3,3$ a $23,9 \pm 1,6$ con 8pCPT, Fig. 7D). Del mismo modo, el efecto del isoproterenol y el 8pCPT en la cinética de los sEPSCs se analizó en un medio con Ca^{2+} a 2,5 mM, sin que se observase tampoco efecto alguno ni en el tiempo de caída de los sEPSCs (en milisegundos, de $13,9 \pm 1,1$ a $12,9 \pm 1,2$ con isoproterenol, y de $11,9 \pm 0,9$ a $12,3 \pm 0,9$ con 8pCPT, Fig. 7E), ni en la pendiente de caída (en pA por ms, de $6,0 \pm 1,3$ a $7,9 \pm 1,3$ con isoproterenol, y de $8,4 \pm 1,9$ a $8,9 \pm 1,5$ con 8pCPT, Fig. 7F), o en la variable tau de caída (en milisegundos, de $19,1 \pm 1,8$ a $22,5 \pm 2,3$ con isoproterenol, y de $15,4 \pm 1,9$ a $17,2 \pm 1,2$ con 8pCPT, Fig. 7G).

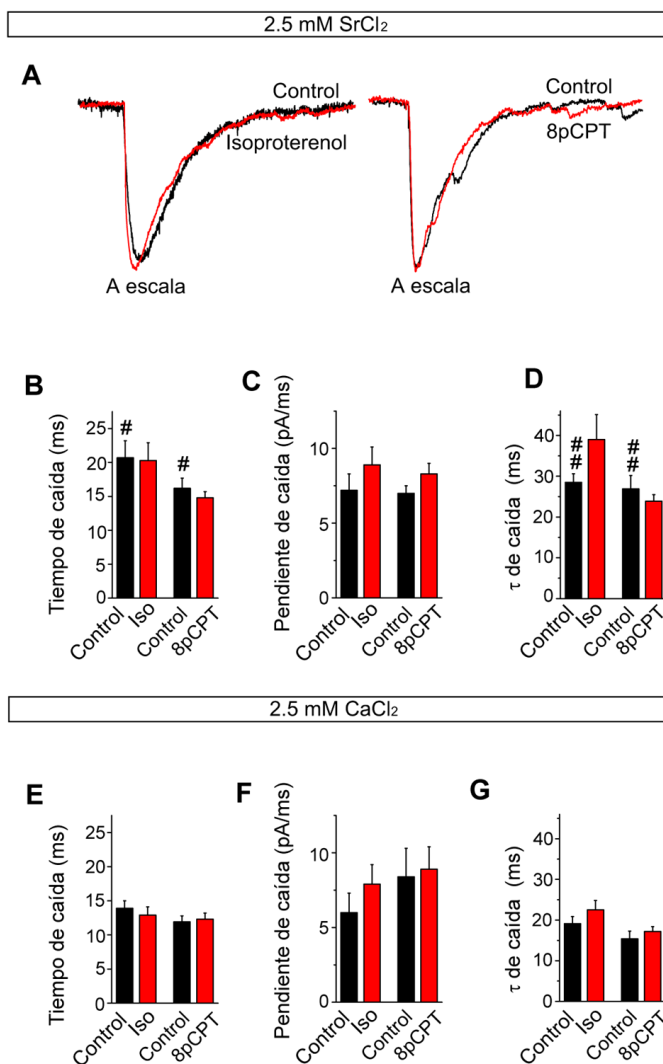


Figura 7. Efecto del isoproterenol y 8pCPT en la cinética de los sEPSCs en presencia de Sr^{2+} y de Ca^{2+} . **A**, Trazos representativos que muestran sEPSCs en condiciones control y tras la aplicación de isoproterenol y 8pCPT. Escala: 100 pA y 50 ms. **B-D**, Cinética de los sEPSC en presencia de Sr^{2+} . **B**, el tiempo de caída (ms) no fue afectado por la aplicación de isoproterenol ($p > 0,05$, test de t de Student, comparando con las condiciones control) ni de 8pCPT ($p > 0,05$, test de t de Student). **C**, la pendiente de caída (pA/ms) no se modificó al aplicar isoproterenol ($p > 0,05$, test de t de Student) o 8pCPT ($p > 0,05$, test de t de Student). **D**, La variable tau (ms) no fue alterada por la aplicación de isoproterenol ($p > 0,05$, test de t de Student) ni de 8pCPT ($p > 0,05$, test de T de Student). **E-G**, Efecto del isoproterenol y del 8pCPT en la cinética de los eEPSC en presencia de Ca^{2+} . **E**, el tiempo de caída (ms) no fue afectado por la aplicación de isoproterenol ($p > 0,05$, test de t de Student) ni de 8pCPT ($p > 0,05$, test de t de Student). **F**, La pendiente de caída (pA/ms) no cambió ni con Isoproterenol ($p > 0,05$, test de t de Student) ni con 8pCPT ($p > 0,05$, test de t de Student). **G**, La variable tau (ms) no cambió al aplicar isoproterenol ($p > 0,05$, test de t de Student) ni 8pCPT ($p > 0,05$, test de t de Student). Sin embargo, reemplazar el Ca^{2+} por Sr^{2+} sí causó un incremento en el tiempo de caída control ($*p < 0,05$, test de Welch) y en la variable tau de caída ($**p < 0,01$, test de t de Student). Los datos representan la media \pm SEM.

Caja 4. La sinapsis PF-PC

Las células granulares son las neuronas más abundantes en el SNC con un número estimado de 92×10^6 en el cerebro de rata (Harvey & Napper, 1988) y 69×10^9 en el humano (Azevedo et al., 2009). La mayoría de las sinapsis PF-PC son silentes, lo cual confiere ventajas a la hora de optimizar la información (Brunel et al., 2004). La sinapsis entre las fibras musgosas y las neuronas granulares es el punto de mayor divergencia de información en el cerebelo. Las aferencias de las fibras musgosas codificarán, prácticamente, todos los tipos de información que puede ser procesada por el SNC y cada una establecerá sinapsis con hasta 500 células granulares (Ito, 2008). A su vez, cada neurona de Purkinje recibirá, aproximadamente, 10^{14} sinapsis en el cerebelo humano (Azevedo et al., 2009), representando una enorme convergencia de información. El procesamiento de información en el cerebelo se basa en la selección y regulación de esta gran cantidad de señales en las sinapsis PF-PC (D'Angelo et al., 2016). Por tanto, la modulación de estas sinapsis y su plasticidad, tanto a corto como a largo plazo, son determinantes a la hora de la función cerebelar.

La principal señal generada por el glutamato liberado por las PF en las PC es una breve despolarización mediada por la activación de los receptores AMPA. Estos receptores son impermeables al Ca^{2+} debido a la sustitución de una glutamina por una arginina en la subunidad Glu2A mediante un proceso de edición de mRNA (Sommer et al., 1991). Estas sinapsis tienen una alta probabilidad de liberación (Isope & Barbour, 2002) y una tasa de reposición de vesículas rápida (Valera et al., 2012). Esto permite a las células granulares mantener unas frecuencias de disparo de hasta 1 kHz pero también asegurar una transferencia lineal de la información hasta los 300 Hz (Beugen et al., 2013). Además de los receptores AMPA, las neuronas de Purkinje presentan receptores mGluR1 perisinápticos que se activarán con despolarizaciones de alta frecuencia de las células granulares y que también darán lugar a corrientes despolarizantes en las PC. Aún no existe consenso sobre el origen de esta corriente, aunque se piensa que depende, en parte, de la activación de un canal catiónico dependiente de potenciales transitorios TRPC3 (Hartmann et al., 2008) y de la activación de un canal de glutamato delta-2 (GluD2) (Ady et al., 2014). Estas corrientes poseen unas características temporales y una amplitud que les permiten codificar la frecuencia y el número de potenciales de acción de las PF (Tempia et al., 1998). Además, la activación del receptor mGluR1 activará una proteína Gq que producirá un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular. La coincidencia de este aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ junto con el aumento de Ca^{2+} causado por la estimulación de las fibras trepadoras se considera crítica para la plasticidad sináptica (Tempia & Konnerth, 1994).

La **LTD postsináptica** de la sinapsis PF-PC está implicada en la adaptación del reflejo vestíbulo-ocular (VOR), el condicionamiento de parpadeo y en el ajuste de desequilibrios posturales (Ito, 1982, 1989; Krupa & Thompson, 1997). Esta LTD se produce por la coincidencia de activación de las PCs por las PFs y las fibras trepadoras (CFs), que provoca una depresión duradera de los *inputs* de las PFs a las PCs. La entrada de Ca^{2+} provocada por la activación del receptor mGluR1 y por los canales P/Q en respuesta a la despolarización provocada por las CFs activará a la PKC, en concreto a la PKC α (Leitges et al., 2004). La activación de esta isoforma de PKC provocará una fosforilación de los receptores AMPA en el serina-880 resultando en su eliminación de las espinas dendríticas mediante una endocitosis mediada por clatrina (Yt & Dj, 2000).

Aparte de la LTD, que requiere altas concentraciones de Ca^{2+} postsináptico, estas sinapsis pueden experimentar una **LTP postsináptica** provocada por estimulaciones de baja frecuencia (1 Hz) de las PFs y la consiguiente menor entrada de Ca^{2+} (Anggono & Huganir, 2012). Estas $[\text{Ca}^{2+}]$ activarán a las proteínas PP1, PP2A y PP2B, las cuales promoverán la interacción entre las subunidades Glu2A de los receptores AMPA y la proteína GRIP, estabilizando al receptor AMPA en la membrana (Belmeguenai & Hansel, 2005). Experimentos en ratones carentes de proteínas PP2B no encontraron esta LTP y demostraron que esta plasticidad sináptica es importante para el aprendizaje motor en pruebas como el VOR o el condicionamiento de parpadeo (Schonewille et al., 2010).

Finalmente, estudios en los que se observó que, incluso con el bloqueo de todos los receptores postsinápticos, seguía observándose una LTP en estas sinapsis sugirieron la existencia de la **LTP presináptica**, la cual se ha explicado previamente en el apartado 1.2.1.

4.1.5. β_1 -AR y Epac son necesarios para la PF-PC LTP

En las sinapsis entre las células granulares y las PC, la LTP depende de un aumento en el cAMP mediado por Ca^{2+} (Salin et al., 1996) y de la activación de la proteína de la zona activa (ZA) RIM1 α para potenciar la transmisión sináptica (Castillo et al., 2002; Lonart et al., 2003). La estimulación de las PFs con 10 Hz durante 10 s induce la PF-PC LTP en las rodajas cerebelares control del $99,7 \pm 6,7\%$ al $149,2 \% \pm 17,7$ (Fig. 8A, B) y el origen presináptico de esta LTP se evidencia mediante la disminución de la PPR de $1,79 \pm 0,08$ a $1,51 \pm 0,04$ (Fig. 8C, D). Para comprobar la contribución de los β_1 -ARs a dicha PF-PC LTP, utilizamos el antagonista de β -ARs propranolol, el cual impidió dicha respuesta (del $98,9 \pm 4,8\%$ al $96,5 \pm 5,4\%$, Fig. 8A, B). Esta plasticidad también fue bloqueada por el antagonista específico de β_1 -ARs metoprolol (del $102,7 \pm 3,5\%$ al $98,3 \pm 5,1\%$, Fig. 8A, B). Estudios anteriores han empleado el Rp-8-CPT-cAMPS para comprobar la participación de PKA en la PF-PC LTP, sin embargo, este compuesto análogo al cAMP también inhibe las proteínas Epac (Chen et al., 2014).

Resultados

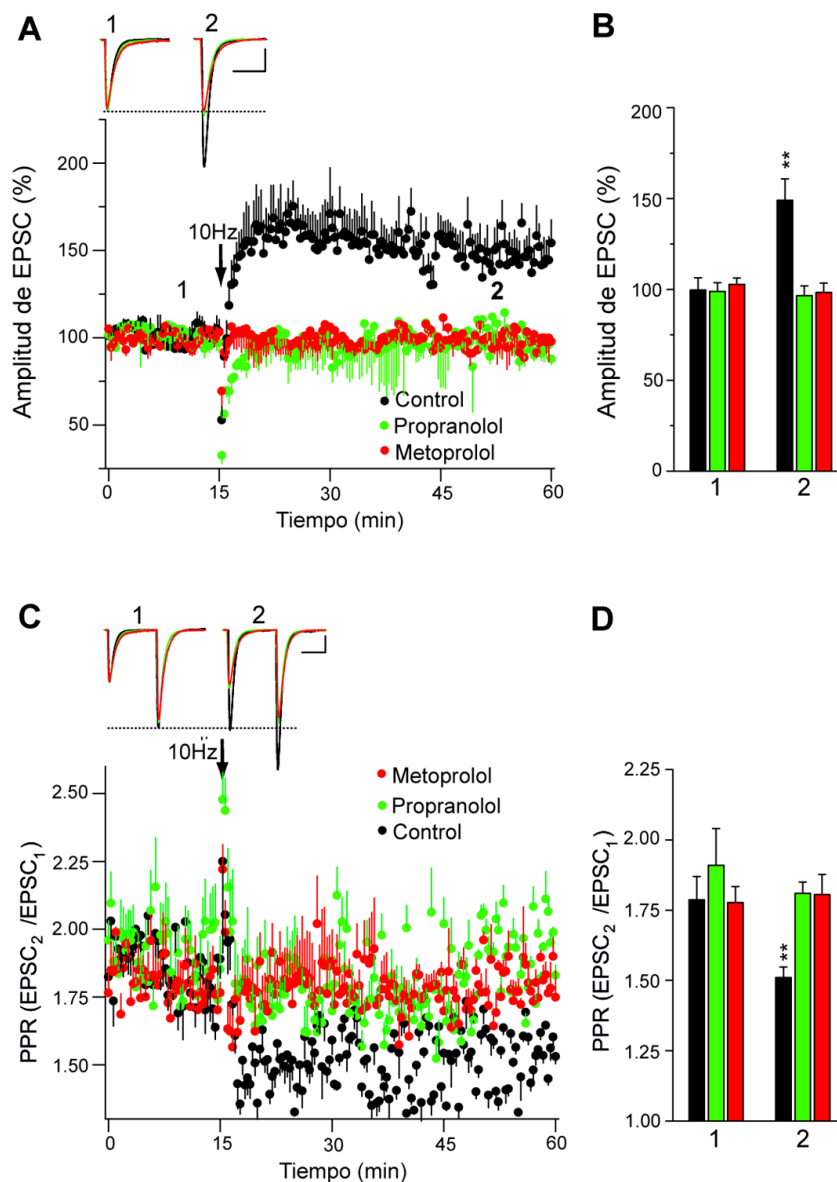


Figura 8. Los receptores β_1 -ARs son necesarios para la PF-PC LTP. **A, B** Cuantificación de los cambios en amplitud de los EPSCs analizados 40 minutos después de la estimulación (2) de 10 Hz durante 10 s en rodajas control ($n = 16$ células/ 16 rodajas/ 14 ratones, $*p < 0,05$, test de Welch) y en presencia de los antagonistas de β -ARs propranolol (100 mM, 30 min) ($n = 12$ células/ 12 rodajas/ 8 ratones, $p > 0,05$, test de Welch) y metoprolol (60 mM, 30 min) ($n = 10$ células/10 rodajas/ 5 ratones, test de t de Student). **C**, Cambios en la PPR (EPSC₂/EPSC₁) inducidos por una estimulación de 10 Hz en las condiciones mostradas en **A**. **D**, Cuantificación de los cambios en la PPR 40 minutos después de la estimulación con 10 Hz en la condición control [$** p < 0,01$, comparado con (1)] y en la presencia de propranolol [$p > 0,05$, comparado con (1)] y metoprolol ($p > 0,05$, comparado con (1)). Los trazos de ejemplo representan la media de seis EPSCs consecutivos a 0,05 Hz tomados antes (1) y 40 minutos después (2) de una estimulación de 10 Hz. Escala: 50 pA y 10 ms. Los datos representan la media \pm SEM.

Para distinguir cuál de las dos proteínas participa en la PF-PC LTP utilizamos el inhibidor selectivo de Epac2, ESI 05, el cual bloqueó dicha plasticidad (del $103,6 \pm 5,1\%$ al $96,3 \pm 6,9\%$, $n = 11$, Fig. 9A, B). Por el contrario, la PF-PC LTP no se afectó por los inhibidores específicos de PKA, H-89 (del $103,0 \pm 3,8\%$ al $161,2 \pm 19,0\%$, y KT5720 (del

103,8 ± 5,5% al 179,5 ± 16,4%, Fig. 9A, B). Estos resultados sugieren que la PF-PC LTP requiere la activación de los β_1 -ARs y de la proteínas Epac2.

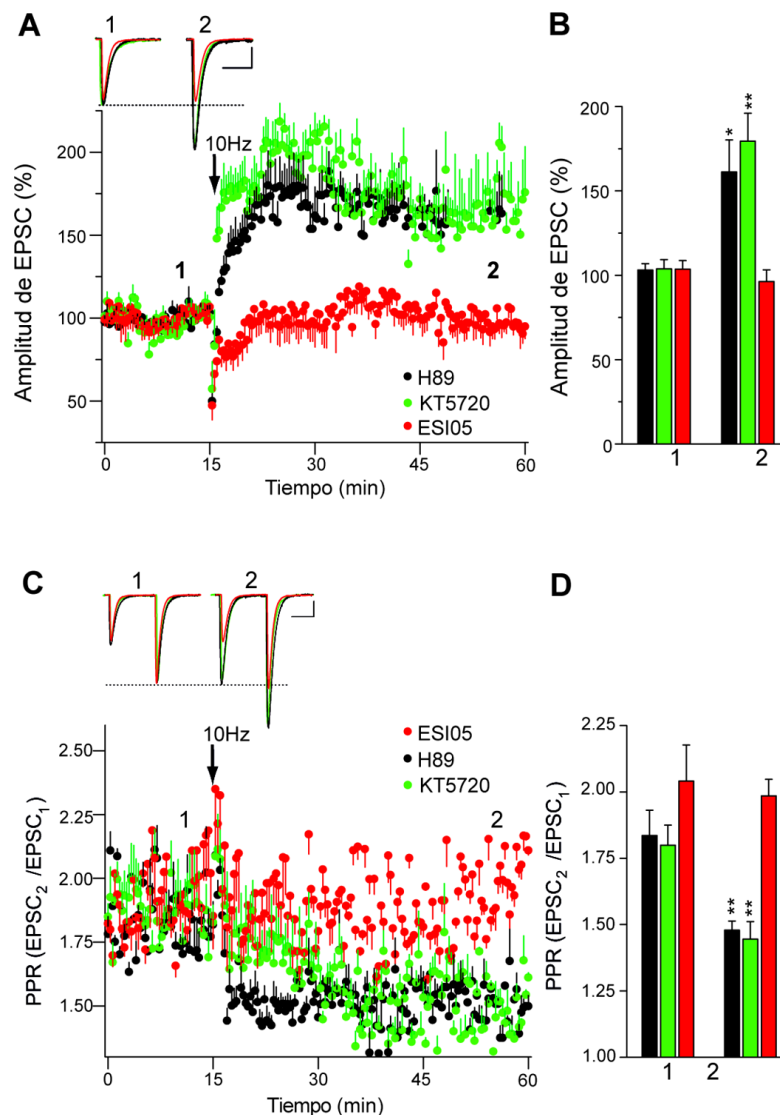


Figura 9. La activación de Epac2 es necesaria para la PF-PC LTP. **A, B,** Una estimulación de 10 Hz indujo un aumento en la amplitud de los EPSCs en las rodajas tratadas con KT-5720 (2 mM, 30 minutos antes de la estimulación con 10 Hz) y con H-89 (10 mM, 30 minutos antes de la estimulación con 10 Hz). Este incremento en la amplitud se bloqueó en las rodajas tratadas con el inhibidor de Epac2 ESI-05 (10 mM, 30 min). **B,** Cuantificación de los cambios de la amplitud de los EPSCs analizados 40 minutos después de la estimulación (**2**) en rodajas tratadas con H-89 (n = 13 células/13 rodajas/6 ratones, * p < 0,05, test de Welch), con KT-5720 (n = 10 células/10 rodajas/ 7 ratones, ** p < 0,01, test de Welch) y con ESI-05 (n = 11 células/11 rodajas/9 ratones, p > 0,05, test de t de Student) comparándolos a los valores previos a la estimulación (**1**). **C,** Cambios en la PPR (EPSC₂/EPSC₁) inducidos por una estimulación de 10 Hz en las condiciones mostradas en **A**. **D,** Cuantificación de los cambios en la PPR 40 minutos después de la estimulación con 10 Hz en presencia de H-89 [p > 0,05, comparado con (**1**)], KT-5720 [p > 0,05, comparado con (**1**)] y ESI 05 [p > 0,05, comparado con (**1**)]. Los ejemplos de trazos de EPSCs representan la media de seis EPSCs consecutivos a 0,05 Hz antes y 40 min después de una estimulación de 10 Hz. Escala: 50 pA y 10 ms. Los datos representan la media ± SEM.

Resultados

Para confirmar la participación de los β -ARs en la PF-PC LTP se hicieron experimentos en los que se estudió si su activación previa producía un efecto techo que impedía una potenciación posterior debida a la PF-PC LTP (Fig. 10). El agonista de β -AR, isoproterenol, aumentó la amplitud de los EPSCs del $98,5 \pm 5,4 \%$ al $190,7 \pm 19,6 \%$, sin embargo, una estimulación posterior de 10 Hz no logró potenciar más la amplitud de los EPSCs (de $190,7 \pm 19,6$ a $191,0 \pm 17,1\%$, Fig. 10A, B). Así mismo, el agonista de Epac 8pCPT indujo un aumento de la amplitud de los EPSCs del $98,4 \pm 4,1\%$ al $194,3 \pm 12,7\%$ que ocluyó la potenciación por una posterior estimulación de 10 Hz (del $194,3 \pm 12,7\%$ al $205,7 \pm 18,9\%$, Fig. 10C, D). Estos experimentos muestran que tanto la potenciación inducida por la activación farmacológica de Epac o de los β -ARs, como por estimulaciones de 10 Hz de las PFs, comparten la misma vía de señalización.

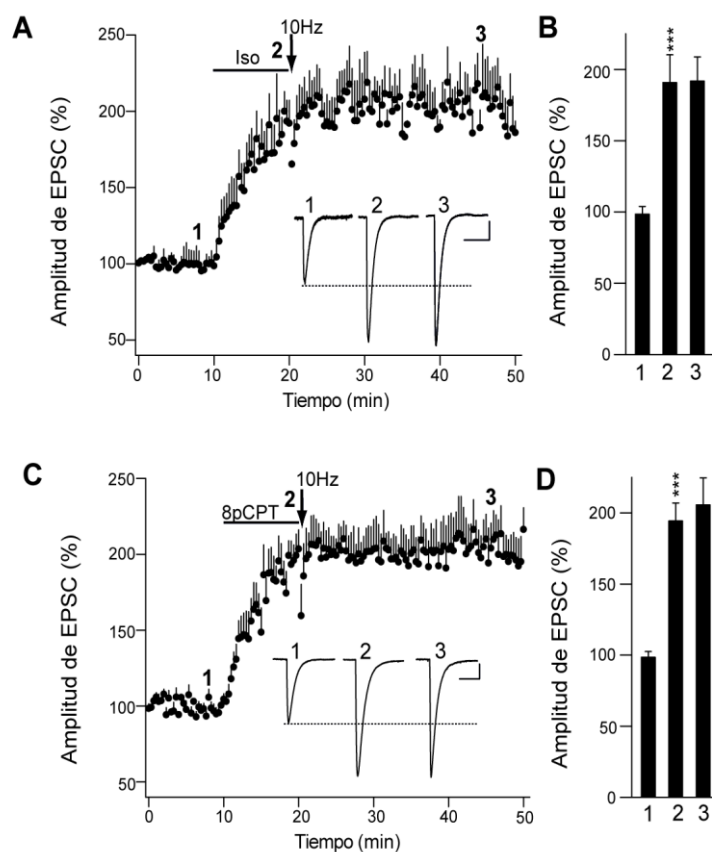
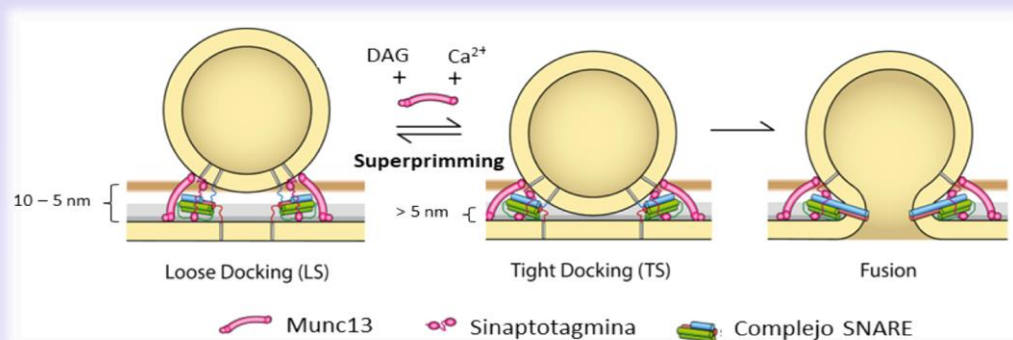


Figura 10. El tratamiento con isoproterenol o 8pCPT ocluye la potenciación inducida por 10 Hz. A, B, Los agonistas de β -ARs isoproterenol (10 min, 100 mM; A) y el activador de Epac 8pCPT (50 mM, 10 min; C) inducen un aumento de la amplitud de los EPSCs. B, D, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los EPSCs inducidos por isoproterenol (B) y 8pCPT (D) seguida por una estimulación de 10 Hz. Los datos se analizaron 10 min después de la aplicación de isoproterenol/8pCPT (2) [$n = 12$ células/12 rodajas/ 6 ratones, $p > 0,05$, test de t de Student, $n = 13$ células/13 rodajas/6 ratones y $n = 13$ células/ 13 rodajas/ 6 ratones, $p > 0,05$, test de t de Student, respectivamente, comparados con (1)]. Los datos también se analizaron 30 min después de la estimulación con 10 Hz (3) [$p > 0,05$, test de t de Student y $p > 0,05$, test de t de Student, respectivamente, comparados con (2)]. Los trazos de ejemplo (A, C) representan la media de seis EPSCs consecutivos a 0,05 Hz tomados antes (1) y 10 minutos después (2) del tratamiento con isoproterenol/8pCPT y 30 minutos después de una estimulación de 10 Hz (3). Escala: 50 pA y 10 ms. Los datos representan la media \pm SEM.

Caja 5. Complejos SNARE parcial y totalmente ensamblados

La proteína Munc18-1 junto con las proteínas SNARE sintaxina-1, SNAP-25 y sinaptobrevina son las responsables de la fusión vesicular, y el ensamblaje de estas proteínas está estrechamente relacionado con los procesos de cebado de las VSs y con el mantenimiento de la RRP. Aunque tradicionalmente se pensaba que el ensamblaje del complejo SNARE comenzaba con la formación de un complejo trans-SNARE a través de los dominios SNARE de las tres proteínas, estudios recientes indican que para llegar a este estado hay un paso previo, en el que se forma un complejo entre la proteína Munc18-1 y la sintaxina-1 que requiere a la proteína Munc13-1. A continuación se formará un complejo ternario entre la sintaxina-1, Munc18-1 y la sinaptobrevina o SNAP-25 en el que los dominios SNARE están parcialmente ensamblados (Baker et al., 2015; Sitarska et al., 2017). La formación de este complejo ternario favorecerá la velocidad y la precisión de la unión del complejo SNARE. Las interacciones entre Munc18-1 (Shen et al., 2007) y los dominios NDR y H_{abc} de la sintaxina-1 (Jiao et al., 2018) impedirán la formación de complejos aberrantes y actuarán como chaperonas de esta estructura, a la que finalmente se unirá una tercera proteína SNARE. Munc13-1 también se unirá a la sintaxina-1 y a la sinaptobrevina y asegurará la correcta formación de este complejo (Lai et al., 2017; Wang et al., 2017). Otras proteínas implicadas en la generación de la RRP son las CAPS, se piensa que su contribución al mantenimiento de la RRP se debe a su dominio de homología con Munc13 (Jockusch et al., 2007) y las proteínas ELKS. Finalmente, las complexinas y las sinaptotagminas 1 y 7 se unirán a los complejos SNARE y serán importantes para estabilizar estas VSs en un estado cebado, contribuyendo así al tamaño de la RRP (Bacaj et al., 2013; Kaeser-Woo et al., 2012). Al unirse Ca²⁺ a los dominios C₂ de la sinaptotagmina comenzará la fusión de ambas membranas, liberando el neurotransmisor. Munc13-1 será, de nuevo, importante en este proceso de fusión de membranas, uniéndose mediante sus dominios C₁-C₂B a la membrana y su dominio C₂C a las VSs facilitará la aproximación de las membranas (Quade et al., 2019).



Experimentos de microscopía electrónica y de electrofisiología permiten distinguir dentro de estas VSs a menos de 10 nm de la membrana entre unas en un estado de anclaje (*docking*) y cebado (*priming*) denominado TS (del inglés *tightly docked state*) o uno más laxo denominado LS (del inglés *loosely docked state*). Las vesículas en un estado TS son aquellas con un complejo SNARE en un estado de ensamblaje más avanzado y que se fusionarán al entrar el Ca²⁺ en el terminal.

Resultados

Estas VSs TS son distinguibles en experimentos de microscopía electrónica por encontrarse a 5 nm o menos de la membrana de la ZA. Por otro lado, las VSs LS son aquellas que se encuentran entre 10 y 5 nm de la membrana y tendrán un complejo SNARE parcialmente ensamblado (Neher & Brose, 2018). Aunque ambos grupos de vesículas son mutuamente excluyentes, las VSs TS serán rápidamente repuestas por las LS, manteniendo así la RRP durante una actividad sináptica continuada. La transición de VSs LS a TS durante esta actividad está regulada por la $[Ca^{2+}]$ intracelular a través de proteínas de la ZA. En concreto, se piensa que el paso al estado TS está asociado al proceso de supercebado (*superpriming*) regulado por la unión de DAG y de calmodulina a los dominios C₁ y C_{2B} de Munc13 respectivamente. (Neher & Brose, 2018).

4.1.6. Los ratones *Epac2*^{-/-} mostraron una ausencia tanto de la PF-PC LTP como del incremento de la RRP y del número de vesículas en contacto con la membrana de la ZA asociados a esta plasticidad

La participación de Epac en la LTP presináptica de las PFs concuerda con la abundancia de esta proteína en el cerebelo (Kawasaki et al., 1998). Para confirmar la participación concreta de Epac2, estudiamos la transmisión sináptica en las sinapsis PF-PC de un ratón que carece de esta proteína (ratón *Epac2*^{-/-}). De este modo, se observó que mientras en rodajas de cerebelo de ratones WT una estimulación de 10 Hz inducía la PF-PC LTP (de $101,3 \pm 5,0\%$ a $169,1 \pm 15,6\%$), en sus hermanos de camada *Epac2*^{-/-}, esta potenciación estaba ausente (del $100,6 \pm 4,1\%$ al $98,7 \pm 2,0\%$, Fig. 11A, B). Dicha plasticidad presináptica en las rodajas WT se asoció a una disminución de la PPR (del $1,80 \pm 0,07$ al $1,52 \pm 0,05$, Fig. 11C), que no ocurrió en las rodajas *Epac2*^{-/-} (de $1,75 \pm 0,06$ a $1,73 \pm 0,08$, Fig. 11C).

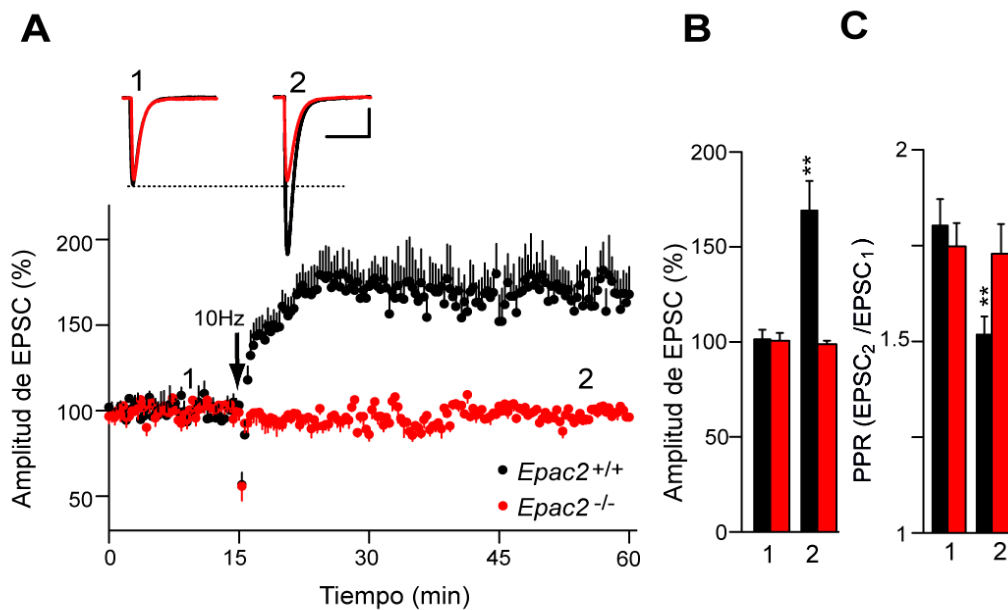


Figura 11. Ausencia de PF-PC LTP en las rodajas de ratones *Epac2*^{-/-}. **A**, La estimulación de 10 Hz de 10 s de duración indujo un aumento sostenido de la amplitud de los EPSCs en rodajas cerebelares de ratones WT que no ocurrió en los ratones *Epac2*^{-/-} de la misma camada. **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los EPSCs analizada 40 min después de la estimulación (2) en rodajas de ratones WT (n = 13 células/13 rodajas/ 6 ratones, ** p < 0,01, test de Welch) o *Epac2*^{-/-} (n = 15 células/15 rodajas/8 ratones, p > 0,05, test de Welch) comparados con los valores previos a la estimulación (1). **C**, Cuantificación de los cambios en la PPR analizados 40 min después de la estimulación (2) en rodajas de ratones WT (** p < 0,01, test de t de Student) y de ratones *Epac2*^{-/-} (p > 0,05, test de t de Student) comparados con los valores antes de la estimulación (1). Escala: 50 pA y 15 ms. Los datos representan la media ± SEM.

A continuación, para confirmar que, al igual que la LTP inducida por isoproterenol o 8-pCPT, la LTP inducida por estimulaciones de 10 Hz de las PF también estaba asociada a un incremento del número de vesículas competentes para su fusión (Fig. 5,6), analizamos los efectos del protocolo de inducción de la PF-LTP sobre la amplitud y frecuencia de aEPSCs. Se utilizó un estímulo de 10 Hz y, 30 minutos después, se reemplazó el Ca²⁺ por Sr²⁺. En las rodajas de ratones WT dicho protocolo provocó un incremento de la frecuencia media de los aEPSCs (de 9,72 ± 0,76 Hz, n= 6 a 14,43 ± 0,77 Hz, n = 7, Fig. 12A, B) y una reducción de los intervalos inter-evento de los aEPSCs (Fig. 12C) de igual manera que hacían isoproterenol y 8pCPT. Sin embargo, en rodajas de ratones *Epac2*^{-/-} no se apreció el aumento en la frecuencia ni la reducción de los intervalos inter-evento (de 10,0 ± 1,00 Hz en condición basal, a 9,21 ± 0,60 Hz, Fig. 12B, y, Fig. 12C, respectivamente). La estimulación con 10 Hz no provocó cambios en la amplitud media de los aEPSCs en las rodajas de WT en estas condiciones (de 10,55 ± 0,31 pA a 10,03 ± 0,29 pA, Fig. 12D), aunque sí hubo una reducción de la amplitud de los aEPSCs en la probabilidad acumulada (Fig. 12E), que, al igual que se observó con la

Resultados

potenciación inducida por 8pCPT (Fig. 6) podría atribuirse al efecto de Epac2 en la probabilidad de apertura de los receptores AMPA postsinápticos en las PCs (Gutierrez-Castellanos et al., 2017). Igualmente, no hubo cambios después del protocolo de estimulación en la amplitud media de los aEPSCs en rodajas de ratones *Epac2^{-/-}* (de $9,96 \pm 0,33$ a $9,76 \pm 0,33$ pA, Fig. 12D) o en la distribución de amplitudes de los aEPSCs (Fig. 12E). Por tanto, la LTP presináptica de las PFs implica cambios en la probabilidad de liberación que dependen de la proteína Epac2.

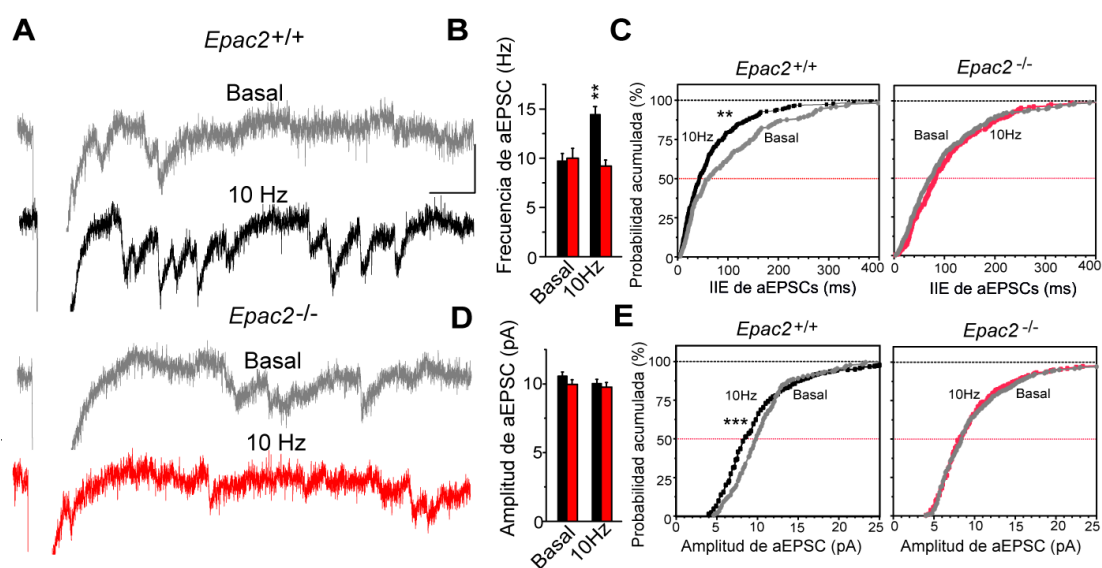


Figura 12. Las rodajas de ratones *Epac2^{-/-}* no muestran cambios en la frecuencia de los aEPSCs tras la inducción de PF-PC LTP. A, aEPSCs después de reemplazar el Ca^{2+} por Sr^{2+} (2,5 mM) 30 min después de una estimulación de 10 Hz. Después de 5 min se analizaron trazos individuales con aEPSCs (durante 2 min) basales (gris) y después de la estimulación en rodajas WT (negro) o *Epac2^{-/-}* (rojo). **B,** Cambios en la frecuencia de los aEPSCs inducidos por una estimulación de 10 Hz en rodajas de ratón WT (** $p < 0,01$, test de t de Student) y *Epac2^{-/-}* ($p > 0,05$, test de t de Student). **C,** Cambios en el intervalo inter-evento (IIE) inducidos por una estimulación de 10 Hz en rodajas de ratón WT (** $p < 0,01$, test de Kolmogorov-Smirnov) y *Epac2^{-/-}* ($p > 0,05$, test de Kolmogorov-Smirnov). **D,** Cambios en la amplitud de los aEPSCs inducidos por una estimulación de 10 Hz en ratones WT ($p > 0,05$, test de Welch) y *Epac2^{-/-}* (** $p > 0,05$, test de Welch). **E,** Cambios en la distribución de amplitudes de los aEPSCs inducidos por una estimulación de 10 Hz en rodajas de ratones WT (** $p < 0,001$, test de Kolmogorov-Smirnov) y *Epac2^{-/-}* ($p > 0,05$, test de Kolmogorov-Smirnov). Escala: 20 pA y 40 ms. Los datos representan la media \pm SEM.

A continuación, se realizaron experimentos de microscopía electrónica en rodajas del mismo tipo para comprobar si la PF-PC LTP provocaba cambios en la distribución de las vesículas de 0 a 100 nm de la membrana de la ZA en terminales sinápticos de la PFs

de ratones *Epac2^{-/-}* (Fig. 13 C, H). Dado que la PF-PC LTP inducida por 10 Hz comparte mecanismo de señalización con la inducida por isoproterenol (Fig. 10), optamos por esta segunda aproximación experimental para asegurar un efecto homogéneo sobre todas las sinapsis susceptibles de ser potenciadas. El tratamiento con isoproterenol aumentó el número promedio de vesículas localizadas a menos de 10 nm de la membrana de la ZA en rodajas de ratones WT (de $4,21 \pm 0,12$ a $5,15 \pm 0,12$, Fig. 13A, B, C). Dicha respuesta desapareció en ratones *Epac2^{-/-}* ($4,64 \pm 0,13$ en ausencia y $4,35 \pm 0,12$ en presencia de isoproterenol Fig. 13F, G, H). Además, el isoproterenol aumentó el número promedio de vesículas a menos de 5 nm de la membrana de la ZA en rodajas WT de $3,31 \pm 0,12$ a $4,04 \pm 0,11$ sin afectar al promedio de vesículas de 5-10 nm de la membrana de la ZA (de $0,9060 \pm 0,07$ a $1,11 \pm 0,08$, Fig. 13D). En la condición control no hubo diferencias en las VSs a menos de 5 nm de la ZA de la membrana en las rodajas *Epac2^{-/-}* comparado con las rodajas WT ($3,49 \pm 0,11$), sin embargo, en las rodajas *Epac2^{-/-}* el isoproterenol no aumentó esta población ($3,24 \pm 0,12$, $n = 160$, Fig. 13I). Por tanto, la ausencia de *Epac2* impide un aumento inducido por isoproterenol en las vesículas a menos de 5 nm de la membrana que se corresponden con un ensamblaje total del complejo SNARE. Además, demostramos que dicha respuesta a isoproterenol se debía a una redistribución de las vesículas sinápticas, ya que no se observaron efectos ni del genotipo ni del tratamiento en el número total de vesículas analizado (de 0-100 nm) (Fig. 13, E, J). Estos resultados indican que el aumento en la liberación de NT que tiene lugar durante la PF-PC LTP requiere un aumento de la población de VSs con su complejo SNARE totalmente ensamblado dependiente de la activación de la proteína *Epac2*.

Resultados

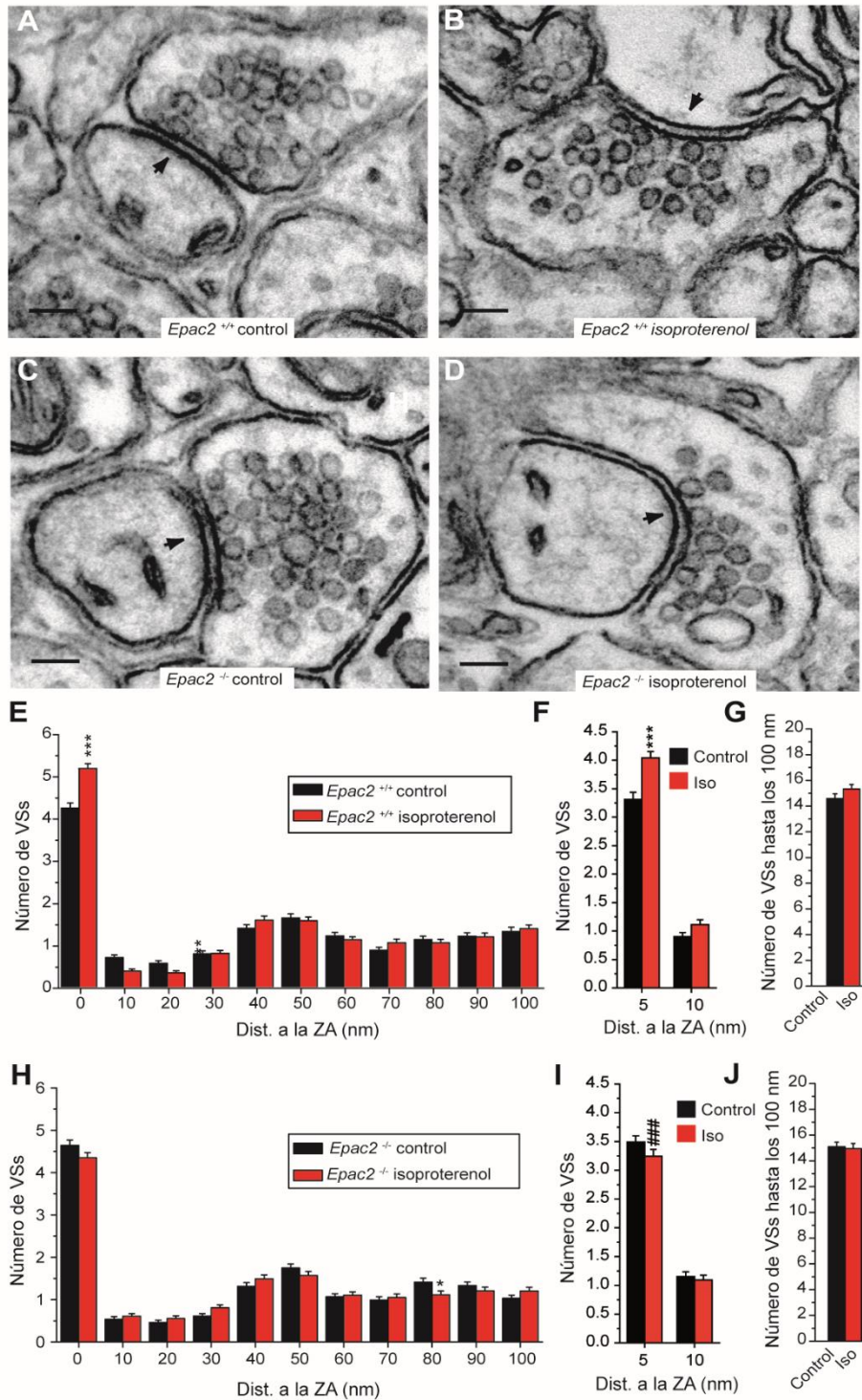


Figura 13. Ausencia del incremento de las VSS ancladas a la ZA inducido por isoproterenol en rodajas de ratones Epac2^{-/-}. Micrografías electrónicas de ratones WT (A, B) y Epac2^{-/-} (C, D). E, H, Cuantificación del cambio producido en el número de vesículas a distintos intervalos por la aplicación de isoproterenol (100 μ M, 10 min) en los ratones WT (E) (n = 182 en condición basal y n = 168 con isoproterenol) y Epac2^{-/-} (H) (n = 160 en condición basal y n = 180 con isoproterenol). Cuantificación del número de vesículas de 0 – 5 nm y de 5 – 10 nm en las rodajas de ratones WT (F) y Epac2^{-/-} (I). El isoproterenol aumenta el número de VSS de 0 – 5 nm de la membrana de la ZA sin cambiar el número de VSS de 5 a 10 nm de la ZA en rodajas de ratones WT (F) (p < 0,001, ANOVA con test de Bonferroni) pero no en las rodajas de ratones Epac2^{-/-} (I) (p > 0,05, ANOVA con test de Bonferroni). El tratamiento con isoproterenol no cambia el número total de VSS en los primeros 100 nm de distancia desde la ZA en las rodajas WT (G) ni en las rodajas Epac2^{-/-} (J). Barras de escala: A-B, F-G: 100 nm. Los datos representan la media \pm SEM.

4.1.7. PF-PC LTP está asociada con un aumento en el tamaño de la RRP que no ocurre en las rodajas de ratones *Epac2*^{-/-}

El número de vesículas ancladas a la membrana de la ZA está asociado al tamaño de la RRP (Rosenmund & Stevens, 1996; Schikorski & Stevens, 2001). Como la PF-PC LTP se asocia con la aproximación de las VSs a la ZA, se comprobó si el protocolo de inducción de esta LTP aumentaba el tamaño de la RRP, que se calculó mediante los gráficos de amplitud acumulada como la intersección con el eje de ordenadas de un ajuste lineal del estado estacionario, al cual se llega mediante trenes de alta frecuencia que agotan las vesículas de la RRP (Gioia et al., 2016; Schneggenburger et al., 1999). Para lograr este estado estacionario, las rodajas se estimularon durante 2.5 s con un estímulo de 40 Hz en condiciones basales o 30 min después de inducir la LTP (Fig. 14 A, B). En las rodajas WT, el tamaño de la RRP aumentó tras la inducción de la PF-PC LTP (de $4347,5 \pm 513,8$ pA a $8586,9 \pm 848,3$ pA, Fig. 14C, D). Sin embargo, el protocolo de estimulación con 10 Hz no logró inducir la LTP en las rodajas de ratones *Epac2*^{-/-} (Fig. 14G) y tampoco aumentó el tamaño de la RRP (de $4006,6 \pm 481,2$ pA a $3544 \pm 711,3$ pA, Fig. 14I, J).

Se comprobó que la LTP no cambiaba la tasa de reposición de la RRP ni en rodajas de ratones WT (de $1,64 \pm 0,47$ pA/ms a $1,60 \pm 0,4$ pA/ms, Fig. 14E) ni en rodajas de animales *Epac2*^{-/-} (de $1,21 \pm 0,27$ a $1,47 \pm 0,38$, Fig. 14K). La PF-PC LTP disminuyó ligeramente la probabilidad de fusión vesicular (p_{ves}) en las rodajas WT (de $0,035 \pm 0,004$ a $0,025 \pm 0,002$ Fig. 14F), sin embargo, esta pequeña disminución fue compensada con el considerable aumento en el tamaño de la RRP, dando lugar a un aumento en la probabilidad de liberación, como evidencia la disminución en la PPR tras la inducción de la PF-PC LTP (Fig. 9C, D). Sin embargo, la p_{ves} no cambió en las rodajas *Epac2*^{-/-} (de $0,029 \pm 0,003$ a $0,034 \pm 0,005$, Fig. 14L). Por tanto, los β -ARs inducen un aumento en el tamaño de la RRP que depende de la proteína *Epac2* y que contribuye a la PF- PC LTP.

Resultados

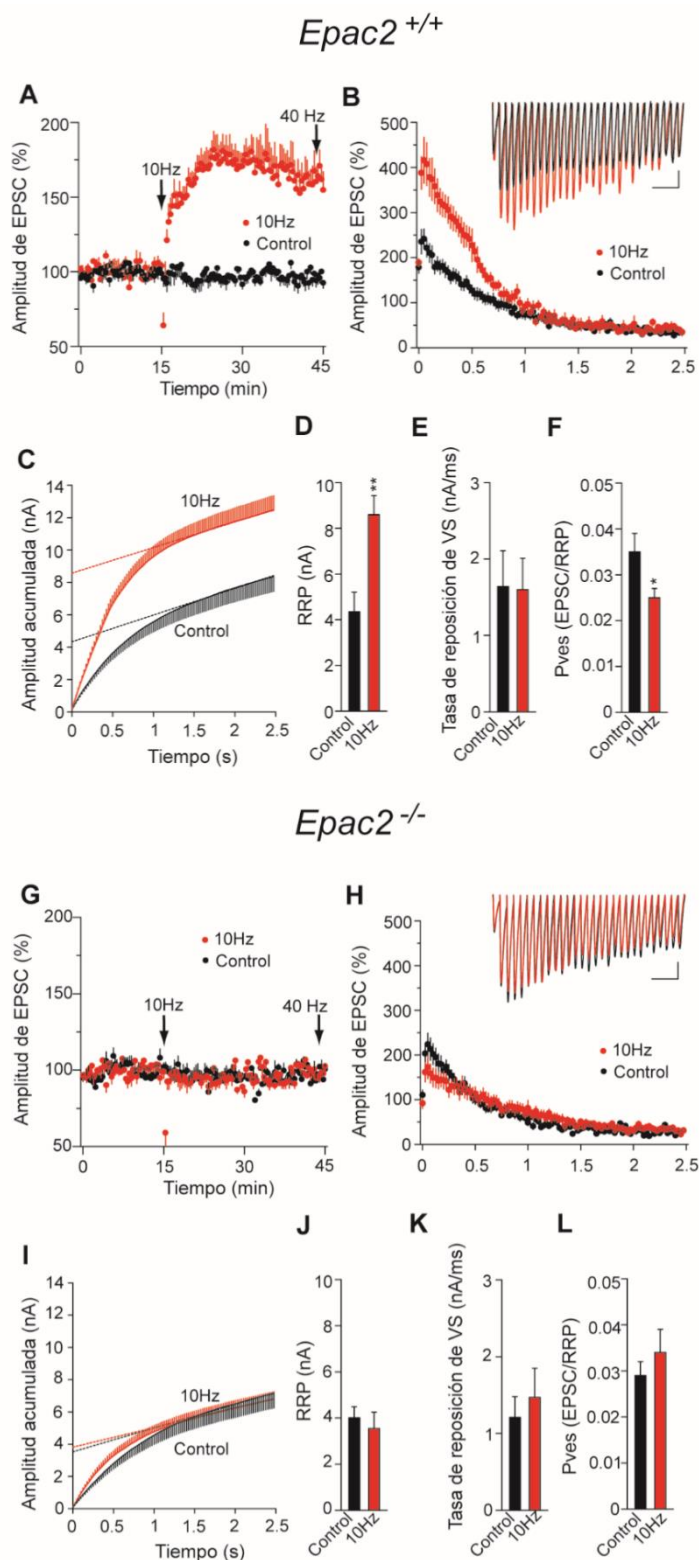


Figura 14. La PF-PC LTP está asociada con un incremento de la RRP, que no ocurre en los ratones *Epac2^{-/-}*. **A, G**, El tamaño de la RRP se midió después de la estimulación con 100 pulsos a 40 Hz, 30 minutos después de la inducción de la LTP y en rodajas de condiciones control (sin estimulación) en rodajas de ratones WT y de sus compañeros de camada *Epac2^{-/-}*. **B, H**, Amplitud de los EPSCs durante un tren de 40 Hz en condiciones control o tras aplicar el protocolo de inducción de la PF-LTP (10 Hz), los trazos muestran ejemplos individuales. Escala: 100 pA y 100 ms. **C, I**, Amplitudes acumuladas de los EPSCs en la condición control y después de inducir la LTP. El tamaño de la RRP se calculó mediante las gráficas de la amplitud acumulada como la intersección con el eje de ordenadas de un ajuste lineal del estado estacionario obtenido durante la estimulación de 40 Hz. **D, J**, Cuantificación de los cambios en la RRP inducidos por una estimulación de 10 Hz en rodajas de ratones WT (**D**: rodajas control, n = 18 células/ 18 rodajas/ 8 ratones, rodajas estimuladas con 10 Hz, n = 21 células/21 rodajas/ 9 ratones, * p < 0,05, test de t de Student) y de ratones *Epac2^{-/-}* (**J**: rodajas control, n = 21 células/21 rodajas/10 ratones, y en rodajas estimuladas con 10 Hz, n = 24 células/24 rodajas/12 ratones, p > 0,05, test de Welch). **E, K**, Cuantificación de la tasa de reposición (pA/ms) en rodajas de ratones WT (**E**: p > 0,05, test de t de Student) y de *Epac2^{-/-}* (**K**: p > 0,05, test de Welch). **F, L**, Cuantificación de la p_{ves} en rodajas de ratones WT (p < 0,05, test de Welch) y de *Epac2^{-/-}* (p > 0,05, test de Welch). Los datos representan la media ± SEM.

4.2. La activación de mGlu4 rescata la transmisión sináptica, la PF-PC LTP y el aprendizaje motor y el social en un modelo de ratón del Síndrome del X frágil

Estudios en la sinapsis entre CA3 y CA1 en el hipocampo han demostrado que las sinapsis de ratones *Fmr1KO* muestran un incremento del tamaño de la RRP debido a una mayor entrada de Ca^{2+} presináptico durante estimulaciones de alta frecuencia (Deng et al., 2011). Un trabajo previo de nuestro laboratorio en sinaptosomas cerebrocorticales de ratones *Fmr1KO* mostraban una mayor entrada de Ca^{2+} ante despolarizaciones y tenían un mayor número de vesículas colocadas en la ZA de manera basal que en los sinaptosomas control. En este caso, la ausencia de FMRP causaba una oclusión de la potenciación mediada por receptores βA y cAMP y la inhibición de la PDE2A conseguía rescatar esta plasticidad (García-Font et al., 2019). Por tanto, en esta tesis nos planteamos si este aumento de vesículas colocadas podría alterar aquellas formas presinápticas de plasticidad asociadas a aumentos en el tamaño de la RRP como la LTP presináptica en la sinapsis entre PFs y PCs en el cerebelo descrita en el apartado anterior.

4.2.1. Las sinapsis *Fmr1KO* tienen más VSs ancladas a la membrana de la ZA que las WT y no son sensibles al isoproterenol

Mediante experimentos de ME en rodajas de cerebelo comprobamos que el promedio de vesículas ancladas a la membrana en las sinapsis PF-PC de ratones WT (las localizadas a menos de 10 nm de la membrana de la ZA) se incrementó tras el tratamiento con isoproterenol (100 μM , 10 min) de $4,168 \pm 0,107$ a $4,990 \pm 0,110$ a expensas de las vesículas situadas en el intervalo contiguo (10-20 nm) (Fig. 15A, C, D). Sin embargo, dicha respuesta desapareció en las rodajas de ratones *Fmr1KO*, (de $4,878 \pm 0,125$ a $4,955 \pm 0,122$ Fig. 15 E, G, H) debido a que este parámetro estaba incrementado en condiciones basales respecto las rodajas de sus hermanos WT (Fig. 15A, E). FMRP está implicada en el desarrollo de las espinas dendríticas y en la estabilidad de las sinapsis (Antar & Bassell, 2003). Sin embargo, no se encontró ningún cambio en la longitud de la ZA entre las sinapsis de ratones WT ($617,616 \pm 10,89$ nm) y los *Fmr1KO* ($615 \pm 0,119$ nm, $n = 238$, Fig. 15I). Por tanto, las sinapsis PF-PC en los ratones *Fmr1KO* tienen un mayor número de vesículas ancladas a la membrana de la ZA de manera basal, lo que concuerda con resultados previos de laboratorio en sinapsis de corteza cerebral (García-Font et al., 2019). Este incremento basal provoca un efecto

Resultados

techo que ocluye los incrementos en este parámetro dependientes de la activación de β -ARs.

También analizamos potenciales alteraciones en las subpoblaciones de vesículas ancladas. De este modo, observamos que el agonista β -adrenérgico incrementó significativamente el promedio de vesículas entre 0-5 nm en rodajas WT (de $2,608 \pm 0,096$ a $3,82 \pm 0,107$) a expensas de las vesículas del intervalo contiguo (5-10 nm) (de $1,56 \pm 0,08$ a $1,16 \pm 0,07$ Fig. 15B). Esta redistribución de vesículas no se observó en las sinapsis PF-PC de rodajas *Fmr1*KO (de $3,58 \pm 0,11$ a $3,62 \pm 0,11$ Fig. 15F), seguramente debido al significativo incremento del número basal de vesículas en el intervalo más próximo a la membrana (0-5 nm) respecto a las rodajas WT (Fig. 15B, F). Estos resultados indican que las sinapsis *Fmr1*KO tienen más vesículas con complejos SNARE totalmente ensamblados y, por tanto, preparadas para su fusión, lo cual parece estar impidiendo modulaciones al alza de este parámetro por la activación de los β -ARs.

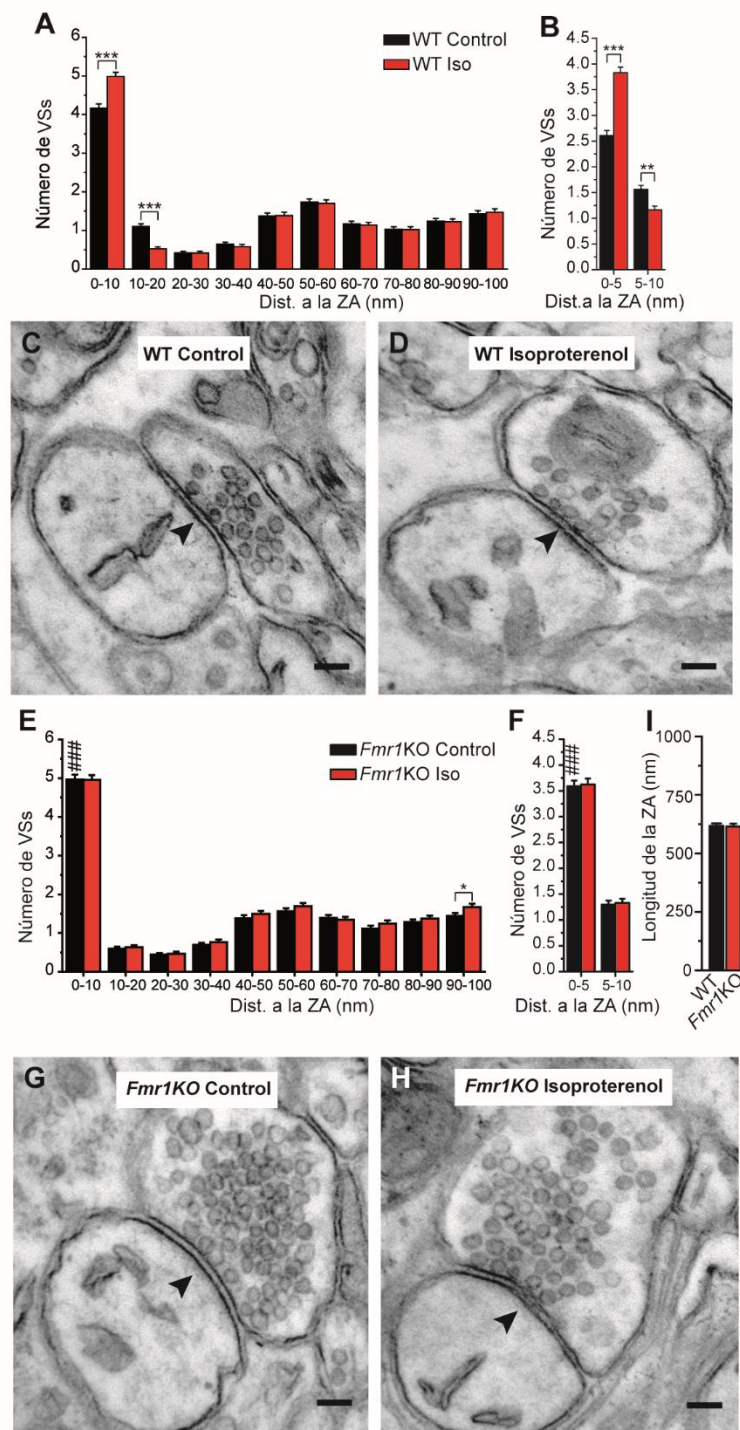


Figura 15. Las sinapsis PF-PC de ratones *Fmr1KO* presentan un mayor número de VSs ancladas y no aumentan en respuesta al isoproterenol. La aplicación de isoproterenol (100 μ M, 10 min) aumenta el número de VSs ancladas en las sinapsis PF-PC de ratones WT (**A, C, D**), pero no de ratones *Fmr1KO* (**E, G, H**). El isoproterenol incrementa el número de VSs ancladas (0 – 10 nm) en ratones WT (**A**) ($n = 250/3$ y $203/3$ sinapsis/ratón, *** $p < 0,001$) pero no en las rodajas de ratones *Fmr1KO* (**E**) (0 – 10 nm) ($n = 238/4$ y $224/4$ sinapsis/ratón, $p > 0,05$). Nótese el incremento en las vesículas ancladas en el ratón *Fmr1KO* en comparación con las rodajas WT control (### $p < 0,001$). **C-D, G-H**, Micrografías electrónicas de sinapsis PF-PC. **B, F**, El efecto de la aplicación de isoproterenol en la distribución de las VSs: WT (0-5 nm: *** $p < 0,001$); WT (5 – 10 nm: ** $p < 0,01$); *Fmr1KO* (0 – 5 nm: $p > 0,05$) y (5 – 10 nm: $p > 0,05$). *Fmr1KO* control comparado con WT control a 0 – 5 nm (### $p < 0,001$). **I**, Longitud de la ZA en sinapsis de ratones WT ($n = 250$) y *Fmr1KO* ($n = 238$) ($p > 0,05$). Los valores representan la media \pm S.E.M. Escala: C-D, G-H: 100 nm. Los datos se compararon mediante la ANOVA de dos vías seguida de una comparación múltiple con test de Bonferroni en **A, B, E, F** y con un test de t de Student no pareado en **I**. n representa el número de sinapsis, se analizaron múltiples sinapsis por rodaja y utilizaron varias rodajas de cada ratón

Resultados

4.2.2. La pérdida de FMRP aumenta la frecuencia de aEPSCs y previene la potenciación inducida por isoproterenol a pesar de una expresión normal de β -ARs y de la generación de cAMP

Teniendo en cuenta las alteraciones observadas en el incremento mediado por los β -ARs en el número de vesículas ancladas en las sinapsis PF-PC *Fmr1KO*, decidimos estudiar si dichas alteraciones también tenían consecuencias en la liberación de neurotransmisor y, por tanto, en el aumento de la frecuencia de aEPSCs inducido por el agonista β -AR que observamos con anterioridad en las sinapsis PF-PC (Fig. 5). Por tanto, analizamos la liberación asincrónica evocada por la estimulación de las PFs reemplazando el Ca^{2+} por el Sr^{2+} . Observamos que, en las rodajas WT, el isoproterenol aumentó la amplitud de EPSCs sincrónicos (sEPSCs) de $331,64 \pm 12,04$ pA a $434,51 \pm 18,26$ pA (Fig. 16A, B) y la frecuencia de eventos asincrónicos de $11,33 \pm 0,46$ Hz a $18,59 \pm 1,09$ Hz (Fig. 16C, D, E), pero no la amplitud de éstos (de $9,42 \pm 1,43$ a $10,09 \pm 1,41$ pA, Fig. 16F, G). Sin embargo, el isoproterenol no aumentó la amplitud de los sEPSCs en las rodajas *Fmr1KO* (de $408,47 \pm 16,95$ a $426,54 \pm 19,12$ pA Fig. 16A, B) así como tampoco aumentó la frecuencia de aEPSCs (de $16,94 \pm 0,98$ a $17,33 \pm 2,22$ Hz, Fig. 16C, D, E), que ya estaba aumentada basalmente en comparación con las rodajas WT ($11,33 \pm 0,46$ en WT y $16,94 \pm 0,98$ Hz en *Fmr1KO* Fig. 16D).

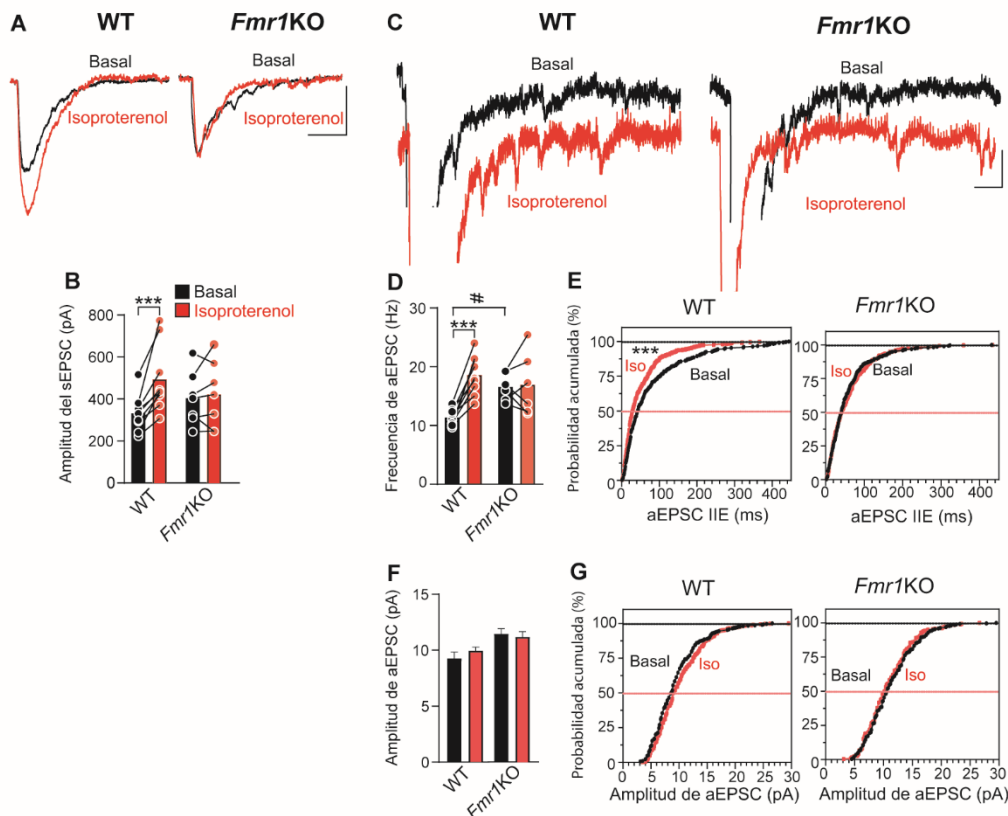


Figura 16. Las sinapsis *Fmr1KO* presentan un aumento en la frecuencia de aEPSCs y una ausencia de la potenciación inducida por isoproterenol. **A**, La aplicación de isoproterenol (100 μ M, 10 min) aumenta la amplitud de los EPSCs sincrónicos (sEPSCs) registrados en presencia de Sr^{2+} (2.5 mM) en rodajas de ratones WT pero no en rodajas de ratones *Fmr1KO*. **B**, Cuantificación de los efectos de la aplicación de isoproterenol en la amplitud de los sEPSCs en rodajas WT (n = 9 células/9 rodajas/4 ratones, *** p < 0,001) y en *Fmr1KO* (n = 6 células/6 rodajas/3 ratones, p > 0,05). Los valores se compararon con los obtenidos en condiciones control. **C**, Trazos individuales mostrando los eventos de liberación asincrónica en condiciones control (**negro**) y con la aplicación de isoproterenol (**rojo**) en rodajas WT y *Fmr1KO*. **D, F**, Cuantificación de los efectos de la aplicación de isoproterenol en la frecuencia de los aEPSCs (**D**) en rodajas WT (n = 306 eventos/9 rodajas y, n = 502 eventos/9 rodajas, *** p < 0,001) y *Fmr1KO* (n = 305 eventos/6 rodajas y n = 312 eventos/6 rodajas, p > 0,05 comparadas con los valores control, #p < 0,05 comparas con los valores control de la frecuencia de aEPSCs en rodajas WT), así como en la amplitud (**F**) en rodajas WT (p > 0,05) y en rodajas *Fmr1KO* (p > 0,05). **E, G** Cambios inducidos por la aplicación de isoproterenol en los intervalos inter-evento (IIE) de los aEPSCs en rodajas WT (***) p < 0,001) y en rodajas *Fmr1KO* (p > 0,05) y en la amplitud de los aEPSCs (**G**) en rodajas WT (p > 0,05) y *Fmr1KO* (p > 0,05). Escala: **A**, 100 pA y 10 ms; **C**, 25 pA y 10 ms. Para analizar los datos se utilizó una ANOVA de dos vías seguida de un test de Tukey en **B, D, F**, y en **E, G** se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos muestran la media \pm SEM.

Dado el papel de FMRP como modulador de la síntesis proteica, decidimos analizar si la pérdida de respuestas al agonista de los β -ARs en las sinapsis PF-PC de ratones *Fmr1KO* era consecuencia de cambios en la expresión y/o la actividad de β_1 -AR. Con este objetivo se realizaron preparaciones de terminales nerviosos de cerebelo purificados (sinaptosomas), que contienen alto grado de enriquecimiento en terminales sinápticos de neuronas granulares (Andersen et al., 1992), en las cuales se comprobó que la liberación espontánea de glutamato de sinaptosomas cerebelares WT aumentaba en

Resultados

presencia de isoproterenol (de $1,12 \pm 0,04$ nmol/mg de proteína, a $1,47 \pm 0,05$ nmol/mg de proteína, Fig. 17A) , y que dicha respuesta no ocurría en los sinaptosomas cerebelares de ratones *Fmr1KO* (de $1,28 \pm 0,02$ nmol/mg de proteína, a $1,30 \pm 0,03$ nmol/mg de proteína, , Fig. 17B), donde la liberación espontánea ya estaba aumentada de manera basal en comparación con los sinaptosomas WT ($1,12 \pm 0,04$ nmol/mg de proteína en WT, y $1,28 \pm 0,02$ en *Fmr1KO*). Por tanto, la oclusión de la potenciación observada en la transmisión sináptica en rodajas cerebelares *Fmr1KO* se encuentra también en los sinaptosomas cerebelares de animales *Fmr1KO*.

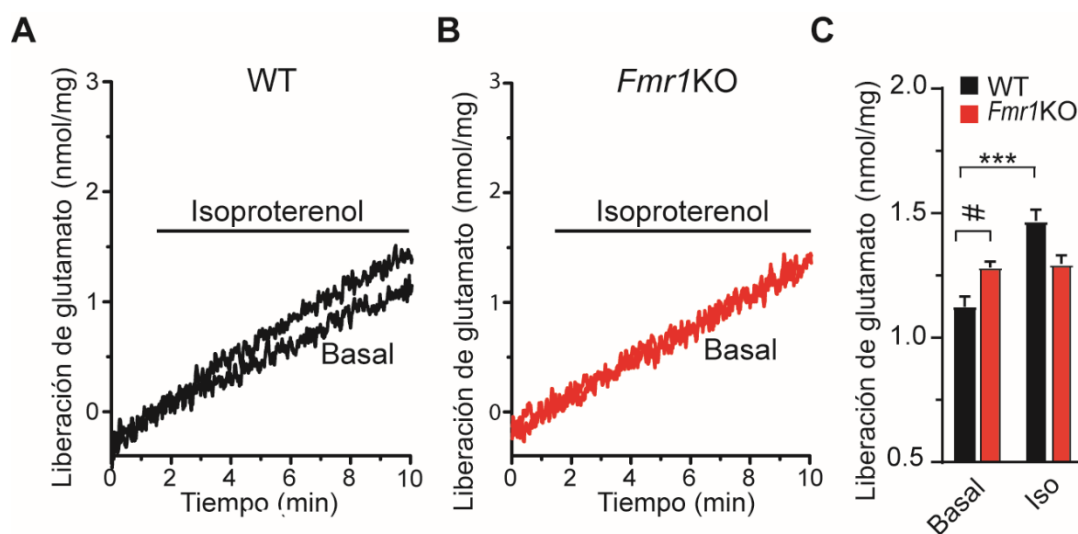


Figura 17. Ausencia de potenciación de la liberación de glutamato inducida por isoproterenol en los sinaptosomas cerebelares *Fmr1KO*. Trazos representativos de la liberación espontánea de glutamato en sinaptosomas cerebelares de ratones WT (A) y *Fmr1KO* (B) en presencia del bloqueante de canales de Na^+ , tetrodotoxina ($1 \mu\text{M}$), y en presencia o ausencia (control) de isoproterenol ($100 \mu\text{M}$). C, Diagrama mostrando los efectos de la aplicación de isoproterenol en la liberación de glutamato en las condiciones mencionadas anteriormente en los sinaptosomas WT ($n = 8/3$ preparaciones, *** $p < 0,001$) y *Fmr1KO* ($n = 7/3$ preparaciones, $p > 0,05$). La comparación de la liberación basal entre sinaptosomas *Fmr1KO* y WT (# $p < 0,05$). Los datos se compararon mediante un test ANOVA de dos vías seguida de una comparación múltiple con test de Tukey. Los datos muestran la media \pm SEM.

La ausencia de la potenciación de la liberación espontánea por β -ARs en sinaptosomas *Fmr1KO* puede deberse a una expresión más baja del receptor. Para comprobar esto realizamos western blots con preparaciones de sinaptosomas WT y *Fmr1KO* y comprobamos que la expresión de β_1 -AR era similar en ambas preparaciones ($100 \pm 14,84$ β_1 -AR/ β -actina en sinaptosomas WT, $112,32 \pm 13,90$ β -AR/ β -actina en sinaptosomas *Fmr1KO*, Fig. 18D, E). Para comprobar que el receptor β_1 -AR no se encontraba deslocalizado en los terminales cerebelares de ratones *Fmr1KO* utilizamos el marcaje con inmunofluorescencia. Utilizamos un doble marcaje con anticuerpos contra β_1 -AR y contra sinaptofisina, proteína localizada en las VSs, para evidenciar la presencia del receptor en los terminales. No hubo diferencias en el porcentaje de sinaptosomas marcados con sinaptofisina que también presentaban marcaje frente a β_1 -AR entre las preparaciones de sinaptosomas WT y *Fmr1KO* ($24,06 \pm 1,56$ % sinaptosomas inmunopositivos para β -AR/campo en WT y $25,18 \pm 1,43$ % sinaptosomas inmunopositivos para β -AR/campo en *Fmr1KO*, Fig. 18A, B, C). Estos experimentos indican que la ausencia de efecto del isoproterenol en los sinaptosomas *Fmr1KO* no se debe a cambios en la expresión o la localización del β_1 -AR.

Resultados

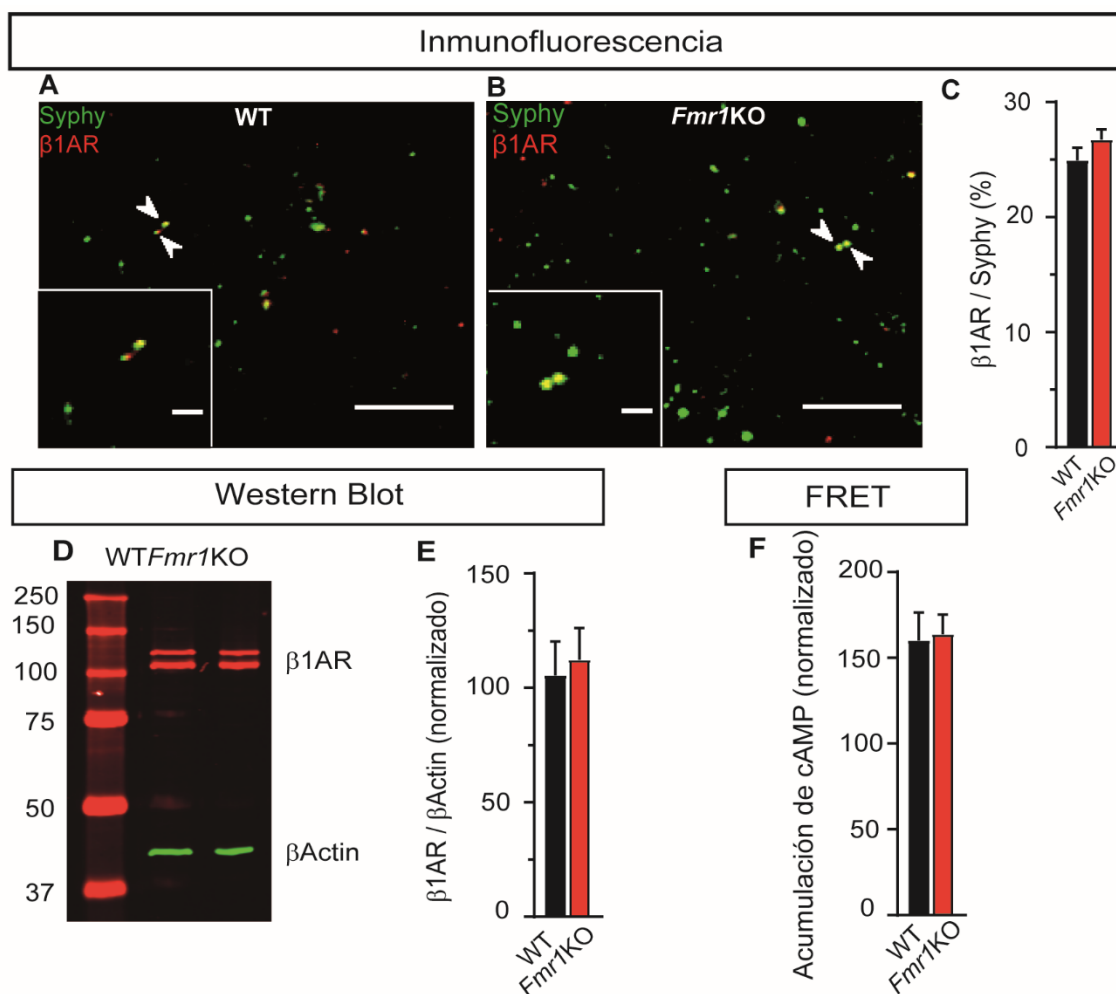


Figura 18. La expresión de β_1 -AR y la generación de cAMP no están alterados en los sinaptosomas cerebelares de ratones *Fmr1KO*. **A, B**, Cuantificación de los sinaptosomas cerebelares que expresan β_1 -AR en ratones WT y *Fmr1KO* con anticuerpos anti- β_1 -AR y el marcador vesicular sinaptofisina. La barra de escala representa 5 μ m. **C**, Co-expresión de β_1 -AR/sinaptofisina en WT ($24,9 \pm 1,1\%$, $n = 16.804/63$ campos/ 2 preparaciones) y en ratones *Fmr1KO* ($26,7 \pm 0,9\%$, $n = 18,712/ 75$ campos/ 2 preparaciones, $p > 0,05$). **D**, Análisis mediante Western Blot de β_1 -AR de sinaptosomas de ratones WT y *Fmr1KO*. **E**, Los datos se normalizaron con los valores WT ($n=3/3$ preparaciones) (*Fmr1KO*, $n=3/3$ preparaciones: $p > 0,05$). **F**, Efecto de la aplicación de isoproterenol en los niveles de cAMP en los sinaptosomas WT ($n = 14/3$ preparaciones) es similar a la de los sinaptosomas *Fmr1KO* ($n = 15/3$ preparaciones, $p > 0,05$). Los datos se compararon con un test de t de Student no pareado. Los datos muestran la media \pm SEM.

Dado que trabajos previos del grupo han mostrado alteraciones en la generación de cAMP mediada por β -ARs en terminales corticales de ratón *Fmr1KO* que afectan a su capacidad de potenciar la liberación de glutamato (García-Font et al., 2019), comprobamos si esto ocurría también en esta sinapsis. Para ello medimos la producción de cAMP al activar β -ARs en preparaciones de sinaptosomas y vimos que la pérdida de la potenciación no se debía a una pérdida de esta señalización ya que los niveles de cAMP se incrementaron de igual manera en respuesta al agonista β -AR en los sinaptosomas WT (de $100,00 \pm 5,27\%$ a $160,01 \pm 16,46\%$) y en los *Fmr1KO* (de $100,00$

$\pm 12,03\%$ a $163,82 \pm 11$, Fig. 18F). Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que la ausencia de potenciación por β -ARs en ratones *Fmr1KO* no se debe a alteraciones en la actividad o la expresión de estos receptores.

4.2.3. La PF-PC LTP no ocurre en las sinapsis *Fmr1KO*

El origen presináptico de las alteraciones en la transmisión de las sinapsis PF-PC de ratones *Fmr1KO* se confirmó analizando la relación de pares de pulsos (PPR). De este modo, encontramos una reducción en la PPR a intervalos inter-estímulo (IIE) de 20 ms ($2,72 \pm 0,16$ en WT y $2,31 \pm 0,07$ en *Fmr1KO*) y a 40 ms ($2,24 \pm 0,14$ en WT y $1,87 \pm 0,05$ en *Fmr1KO* Fig. 19A). Aunque no se encontraron cambios a IIEs más largos. El aumento en vesículas ancladas observado en sinapsis *Fmr1KO* también podría estar asociado a un aumento de la eficacia sináptica, medida como la media de la amplitud de los EPSCs inducidos mediante distintas intensidades de estimulación (incluyendo los fallos en la transmisión sináptica) (Perea & Araque, 2007). La eficacia sináptica de los ratones *Fmr1KO* no se vio alterada ante estímulos de 50 μ A ($30,6 \pm 16,8$ pA en WT y $92,0 \pm 52,0$ pA en *Fmr1KO*, pero aumentó a 100 μ A ($62 \pm 27,3$ pA en WT y $897,2 \pm 314,7$ en *Fmr1KO*) y a 200 μ A ($459,1 \pm 219,5$ pA en WT, y $1390,2 \pm 257,4$ pA en *Fmr1KO* Fig. 19B) en comparación con los ratones WT.

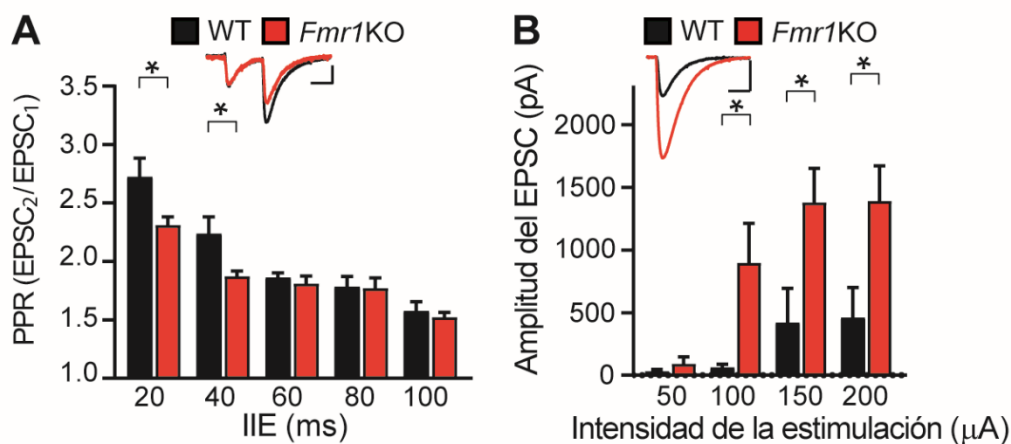


Figura 19. Cambios en la PPR y en la eficacia sináptica en rodajas de ratones *Fmr1KO*. **A**, Cambios en la PPR (la media de 6 pares de estímulos consecutivos inducidos a 0,05 Hz) de ratones *Fmr1KO* comparados con los de WT a distintos ISI (WT: n = 8 células/8 rodajas/3 ratones, *Fmr1KO*: n = 9 células/9 rodajas/3 ratones). **B**, Cambios en la eficacia sináptica de rodajas de ratones *Fmr1KO* (la media de 6 EPSC consecutivos a 0,05 Hz) comparada con ratones WT inducidos mediante diferentes intensidades de estímulo (WT: n = 6 células/6 rodajas/3 ratones. *Fmr1KO*: n = 7 células/7 rodajas/ 3 ratones). La barras de escala de A es 100 pA y 20 ms, en B representa 500 pA y 1 ms. Los estadísticos utilizados son el test de t de Student no pareado y el test de Welch cuando las varianzas de las poblaciones fueron significativamente diferentes. Los datos muestran la media \pm SEM.

Resultados

Dado que, la LTP de PF-PC requiere un aumento en el número de VSs ancladas dependiente de la activación de β -₁ARs (Fig. 14) y que los efectos de la activación de β -ARs no ocurrían en las sinapsis *Fmr1KO*, quisimos comprobar si la LTP de PF-PC estaba alterada en estas sinapsis. En efecto, comprobamos que dicha plasticidad no tenía lugar en las sinapsis de ratones *Fmr1KO* (de $95,9 \pm 4,5$ a $94,7 \pm 7,8$) pero sí en las rodajas de sus hermanos de camada WT (de $104,2 \pm 5,5$ a $160,0 \pm 9,6$ %, Fig. 20A). En estas rodajas WT, también demostramos que, como habíamos observado (Fig. 11), esta plasticidad era sensible al antagonista del β -AR, propanolol (de $101,1 \pm 6,5$ a $96,1 \pm 11,6$ %, $n = 10$) y de origen presináptico y, por tanto, acompañada de una disminución de la PPR (de $1,78 \pm 0,12$ a $1,46 \pm 0,06$ que no ocurrió en las rodajas *Fmr1KO* (de $1,79 \pm 0,16$ a $1,80 \pm 0,11$, Fig. 20C).

Como se vio antes, durante la PF-PC LTP tiene lugar un aumento en el tamaño de la RRP (Fig. 14), por lo que comprobamos si este aumento no ocurría en las sinapsis *Fmr1KO*. Efectivamente, el tamaño de la RRP no se incrementó 30 minutos después del protocolo de inducción de la PF-PC LTP en las sinapsis de ratones *Fmr1KO* (de $8209,6 \pm 836,0$ pA a $8831,3 \pm 952,4$ pA, Fig. 20G, H). De nuevo, debido a que dicho parámetro estaba significativamente incrementado en condiciones basales respecto a las sinapsis de sus hermanos de camada WT, que sí aumentaron el tamaño de la RRP 30 minutos tras el protocolo de inducción de la LTP ($5273,3 \pm 773,3$ pA en estado basal y $9177,7 \pm 747,5$ pA tras la LTP, Fig. 20E, F). Por tanto, las sinapsis PF-PC *Fmr1KO* tienen un tamaño de la RRP basal incrementado que produce un efecto techo que impide la LTP.

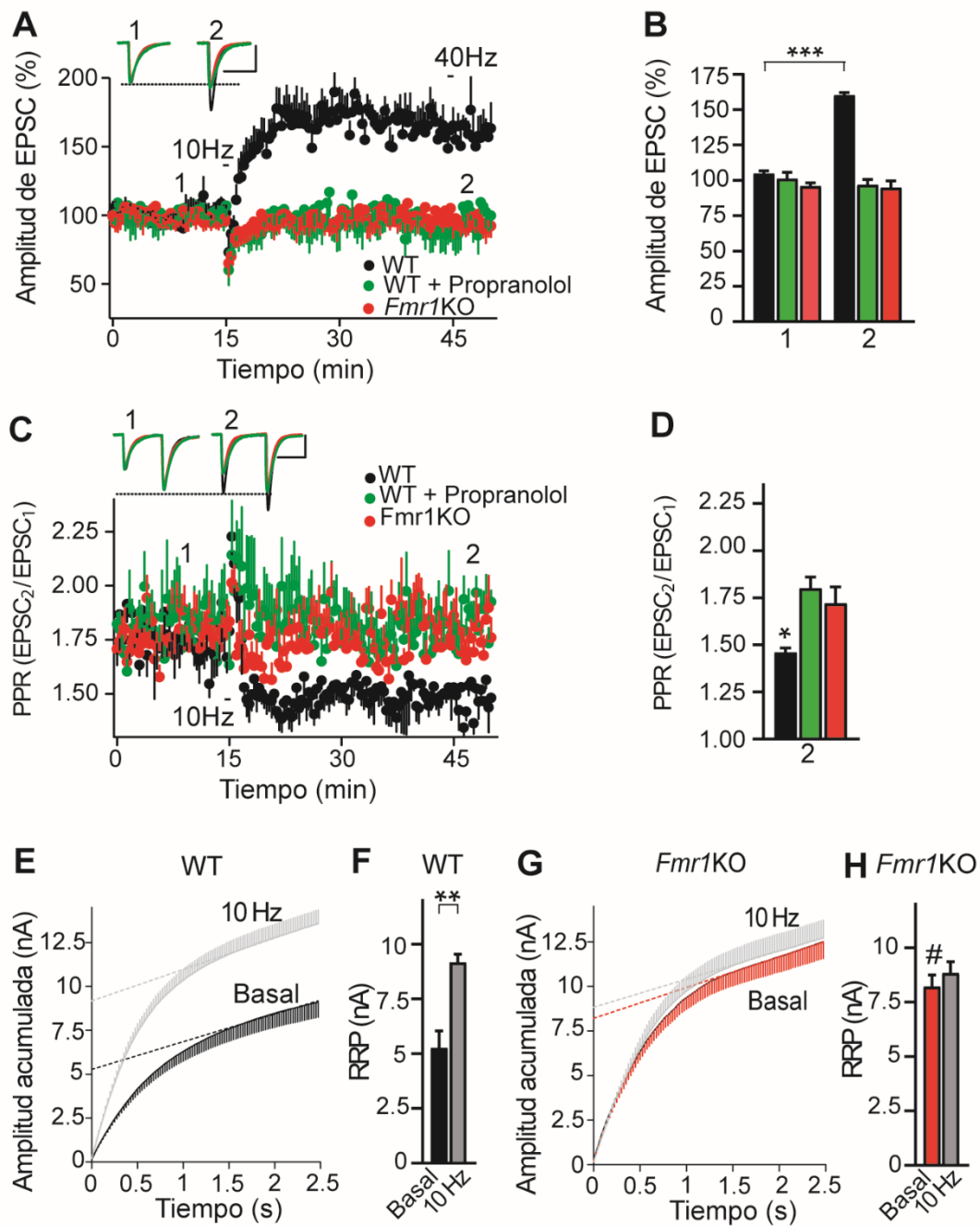


Figura 20. Las sinapsis PF-PC de ratones *Fmr1KO* tienen un tamaño de la RRP aumentado y no desarrollan la LTP en respuesta a una estimulación de 10 Hz. **A**, Cambios en la amplitud de EPSCs inducidos por una estimulación de 10 Hz. **D**, Cuantificación de la amplitud de los EPSCs (media de 6 EPSCs consecutivos a 0,05 Hz) 30 min después de la estimulación (2) comparada con los valores respectivos previos a la estimulación (1): WT, (n = 9 células/9 rodajas/5 ratones), WT/propranolol (100 μ M, 30 min, n = 10 células/10 rodajas/6 ratones); *Fmr1* KO (n = 12 células/12 rodajas/9 ratones). **C**, Cambios en la PPR. **D**, Cuantificación de los cambios en la PPR (media de 6 pares de estímulos consecutivos a 0,05 Hz) comparados con los respectivos valores antes de la estimulación: en WT (n = 9 células/ 9 rodajas/5 ratones), WT/propranolol (100 μ M, 30 min, n = 10 células/10 rodajas/6 ratones); *Fmr1* KO (n = 12 células/12 rodajas/9 ratones). **E**, **G**, Amplitudes acumuladas de EPSC en rodajas de ratones WT y *Fmr1* KO antes (basal) y 30 minutos después de la inducción de la LTP mediante una estimulación de 10 Hz (10 Hz). El tamaño de la RRP se calculó mediante las gráficas de la amplitud acumulada como la intersección en y, en un ajuste lineal del estado estacionario obtenido durante una estimulación de 40 Hz. **F**, **H**, Cuantificación del tamaño de la RRP en rodajas de ratones WT (n = 11 células/11 rodajas/5 ratones, **p < 0,01), *Fmr1*KO (n = 13 células/13 rodajas/6 ratones, p > 0,05, comparando los valores obtenidos después de 10 Hz con los valores basales). El tamaño de la RRP en rodajas de ratones WT comparado con ratones *Fmr1*KO en condición basal (#p < 0,05). Escala: **D**, 50 pA y 10 ms; **E**, 20 pA y 10 ms. Los datos muestran la media \pm SEM.

Resultados

4.2.4. La disminución del Ca^{2+} extracelular reduce la liberación asincrónica y rescata la PF-PC LTP en las rodajas de ratones *Fmr1KO*

Dado que FMRP interacciona con los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , que controlan la duración de los APs, la pérdida de FMRP provoca un ensanchamiento de los AP y un aumento del flujo de Ca^{2+} (Deng et al., 2013). Y que, se ha descrito que FMRP puede modular la entrada de Ca^{2+} sináptico por interacción directa con los VGCCs (Ferron et al., 2014). Comprobamos si, en efecto, una disminución en el Ca^{2+} presináptico mediante la reducción de la concentración extracelular de Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_e$ de 2,5 a 1 mM lograba rescatar la potenciación mediada por isoproterenol en las sinapsis *Fmr1KO*. Cuando las rodajas *Fmr1KO* se mantenían a 1mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$, el isoproterenol sí aumentó la amplitud de los sEPSCs (de $102,4 \pm 5,5$ a $147,1 \pm 8,3$ %, $n = 14$, $p < 0,0001$, test de t de Student, Fig. 21A, B). Además, la frecuencia de aEPSCs disminuyó a valores similares a los encontrados en las sinapsis WT con 2,5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ($11,3 \pm 0,46$ Hz en WT a 2,5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$, Fig. 16C, D y $10,16 \pm 1,56$ Hz en *Fmr1KO* a 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$, Fig. 21C, D) y, en estas condiciones, la exposición a isoproterenol sí aumentó la frecuencia de los aEPSCs en las rodajas *Fmr1KO* (de $10,16 \pm 1,56$ a $15,8 \pm 1,99$ Hz, Fig. 21D, E) sin afectar a su amplitud (de $10,28 \pm 1,53$ a $10,33 \pm 1,49$ pA, Fig. 21F, G).

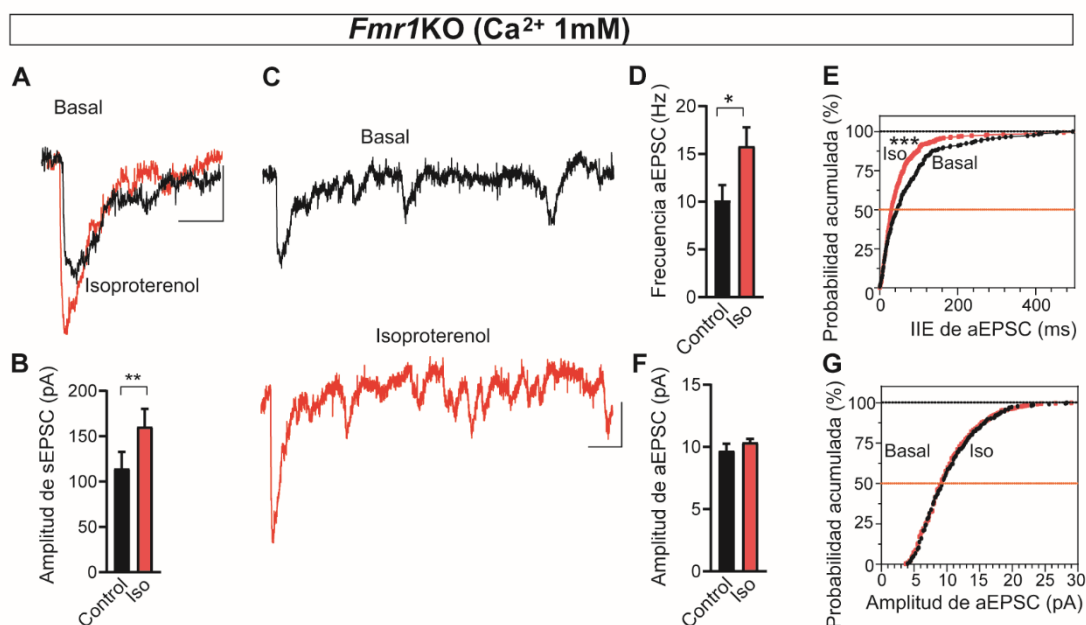


Figura 21. La reducción del Ca^{2+} extracelular rescata la potenciación inducida por isoproterenol en las rodajas *Fmr1KO*. **A**, El isoproterenol (100 μM , 10 min) aumenta la amplitud de los sEPSCs registrados en presencia de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ de 1 mM. **B**, La cuantificación de los efectos de la aplicación de isoproterenol en la amplitud de los sEPSC ($n = 6$ células/6 rodajas/3 ratones, $**p < 0,01$). **C**, Trazos individuales mostrando los eventos de liberación asincrónicos en la condición control (**negro**) y después de la exposición al isoproterenol (**rojo**). **D**, **F** Cuantificación de los cambios producidos por el isoproterenol en la frecuencia (**D**) ($n = 305$ eventos/10 rodajas/ 5 ratones y 474 eventos/10 rodajas/6 ratones, $*p < 0,05$) y en la amplitud de los aEPSCs (**F**) ($p > 0,05$). Nótese que la frecuencia de aEPSCs a $[\text{Ca}^{2+}]_e$ 1 mM es similar a la de ratones WT a $[\text{Ca}^{2+}]_e$ 2,5 mM ($p > 0,05$, Fig. 16D). **E**, **G**, Cambios inducidos por isoproterenol en la probabilidad acumulada de los IIE (**E**) ($***p < 0,001$) y de la amplitud de los aEPSCs (**G**) ($p > 0,05$). Escala: 10 pA y 100ms. Los datos muestran la media \pm SEM.

Además, al disminuir la $[Ca^{2+}]_e$ a 1 mM también se recuperó la PF-PC LTP en las rodajas *Fmr1KO* (de $102,4 \pm 5,5$ a $147,1 \pm 8,3$ %, Fig. 22A, B). En estas condiciones, dicha plasticidad no ocurría en las sinapsis de hermanos de camada WT (de $98,7 \pm 5,7$ a $98,1 \pm 9,4$ %, $n = 10$ Fig. 22A, B) lo cual concuerda con estudios previos acerca de la sensibilidad de esta plasticidad a disminuciones en el $[Ca^{2+}]_e$ (Myoga & Regehr, 2011). Además, demostramos que la LTP que experimentaban las sinapsis PF-PC *Fmr1KO* a $[Ca^{2+}]_e$ a 1 mM era de la misma naturaleza que la PF-PC LTP descrita en WT a $[Ca^{2+}]_e$ a 2,5 mM, ya que la primera también resultó sensible al antagonista β -AR propanolol (de $98,0 \pm 8,1$ a $98,8 \pm 3,1$ %, Fig. 22A, B) y estaba asociada a un aumento del tamaño de la RRP (de $4067,2 \pm 453,3$ pA, a $9192,7 \pm 927,8$ pA, Fig. 22C, D). Estos experimentos demuestran que la reducción en $[Ca^{2+}]_e$ revirtió el aumento de las VSs ancladas, de la liberación asincrónica y del tamaño de la RRP en las sinapsis PF-PC de los ratones *Fmr1KO*, eliminando el efecto techo que impedía la modulación al alza de dichos parámetros y rescatando así la LTP presináptica mediada por β -ARs.

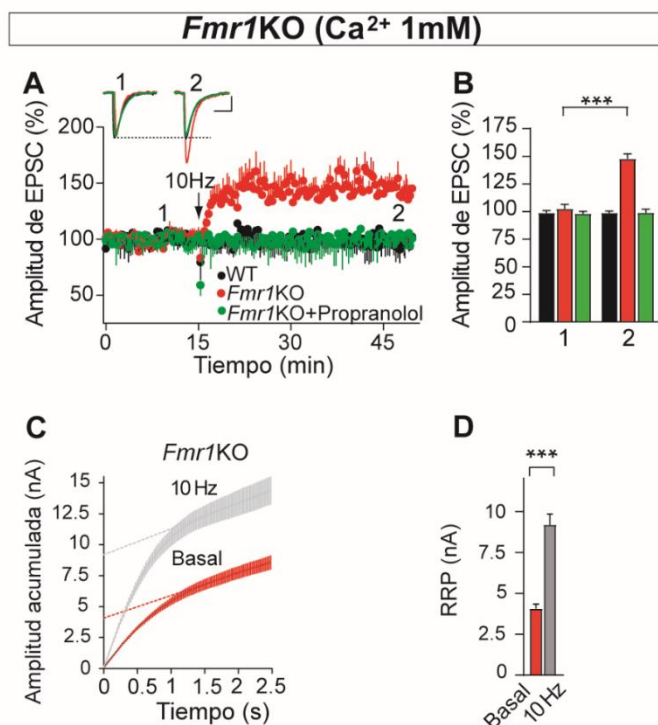


Figura 22. La LTP de las PF se reestablece en las rodajas *Fmr1KO* en presencia de 1 mM de Ca^{2+} , pero se pierde en las rodajas WT. Los experimentos en las rodajas *Fmr1KO* se realizaron también en presencia del antagonista de β -ARs propanolol (100 μ M, añadido 30 min antes de la inducción de la LTP). **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los EPSCs (media de 6 EPSC consecutivos a 0,05 Hz) 30 min después de la estimulación (2) comparados con la condición basal (1): en rodajas *Fmr1KO* ($n = 14$ células/14 rodajas/7 células, *** $p > 0,001$), en rodajas *Fmr1KO* tratadas con propanolol ($n = 9$ células/9 rodajas/4 ratones, $p > 0,05$, test de Welch) y en rodajas WT ($n = 10$ células/10 rodajas/4 ratones, $p > 0,05$, test de t de Student no pareado). **C**, Amplitudes acumuladas los EPSCs (en presencia de 1mM de Ca^{2+}) antes y 30 min después de la inducción de la LTP en rodajas *Fmr1KO*. El tamaño de la RRP se calculó mediante las gráficas de la amplitud acumulada como la intersección en y, en un ajuste lineal del estado estacionario obtenido durante una estimulación de alta frecuencia. **D**, Cuantificación de la RRP en rodajas *Fmr1KO* ($n = 12$ células/12 rodajas/4 ratones y $n = 12$ células/12 rodajas/5 ratones, antes y después de la inducción de la LTP: *** $p < 0,001$, test de Welch). Las gráficas muestran los datos crudos y la media. Escala: 50 pA y 30 ms. Los datos muestran la media \pm SEM.

Resultados

4.2.5. El PAM de mGlu4 VU0155041 rescata la PF-PC LTP de ratones *Fmr1KO*

Dado que la disminución de $[Ca^{2+}]_e$ restablece la LTP en las sinapsis *Fmr1KO*, parece razonable recurrir al uso de herramientas farmacológicas para reducir la entrada de Ca^{2+} en los terminales sinápticos de las PFs, por ejemplo, mediante la activación de GPCRs. mGlu4 es el único mGlu del grupo III presente en los botones de las PFs (Abitbol et al., 2008), es un receptor que presenta alta afinidad por el glutamato (Rosemond et al., 2004) y reduce de manera significativa la entrada de Ca^{2+} (Daniel & Crepel, 2001; Pekhletski et al., 1996). Cuando se activó mGlu4 mediante bajas concentraciones del agonista mGlu del grupo III L-AP4 (40 μ M) hubo una reducción en la amplitud de los EPSCs y, una vez se estableció una nueva línea base tras 5 min de tratamiento, la estimulación con 10 Hz indujo un aumento de la amplitud de los EPSCs sostenido en el tiempo (de $99,1 \pm 5,7$ % a $222,1 \pm 8,8$ %, Fig. 23, A, B). La aplicación de VU 0155041, un modulador alostérico positivo (PAM) selectivo de mGlu4 que puede utilizarse para ensayos in vivo (Niswender et al., 2008; Williams et al., 2009), también rescató la PF-PC LTP en rodajas de ratones *Fmr1KO* (de $99,7 \pm 4,8$ % a $226,9 \pm 5,1$ %, , Fig. 23A, B). Respuesta que también resultó sensible al antagonista de β -ARs propanolol (de $99,4 \pm 6,4$ a $83,8 \pm 7,3$ %, Fig. 23A, B). Por otro lado, comprobamos que la activación del receptor mGlu4 tenía el mismo efecto en las sinapsis de ratones WT y *Fmr1KO* porque, efectivamente, la reducción de la amplitud de la transmisión sináptica causada por VU 0155041 (100 μ m) era de igual magnitud en ambos casos ($35,6 \pm 3,7$ en ratones WT y $32,5 \pm 2,7$ %, en sus hermanos de camada *Fmr1KO* Fig. 23E, F), lo cual sugiere que no hay cambios aparentes en la expresión/señalización de mGlu4 en las sinapsis PF-PC *Fmr1KO*.

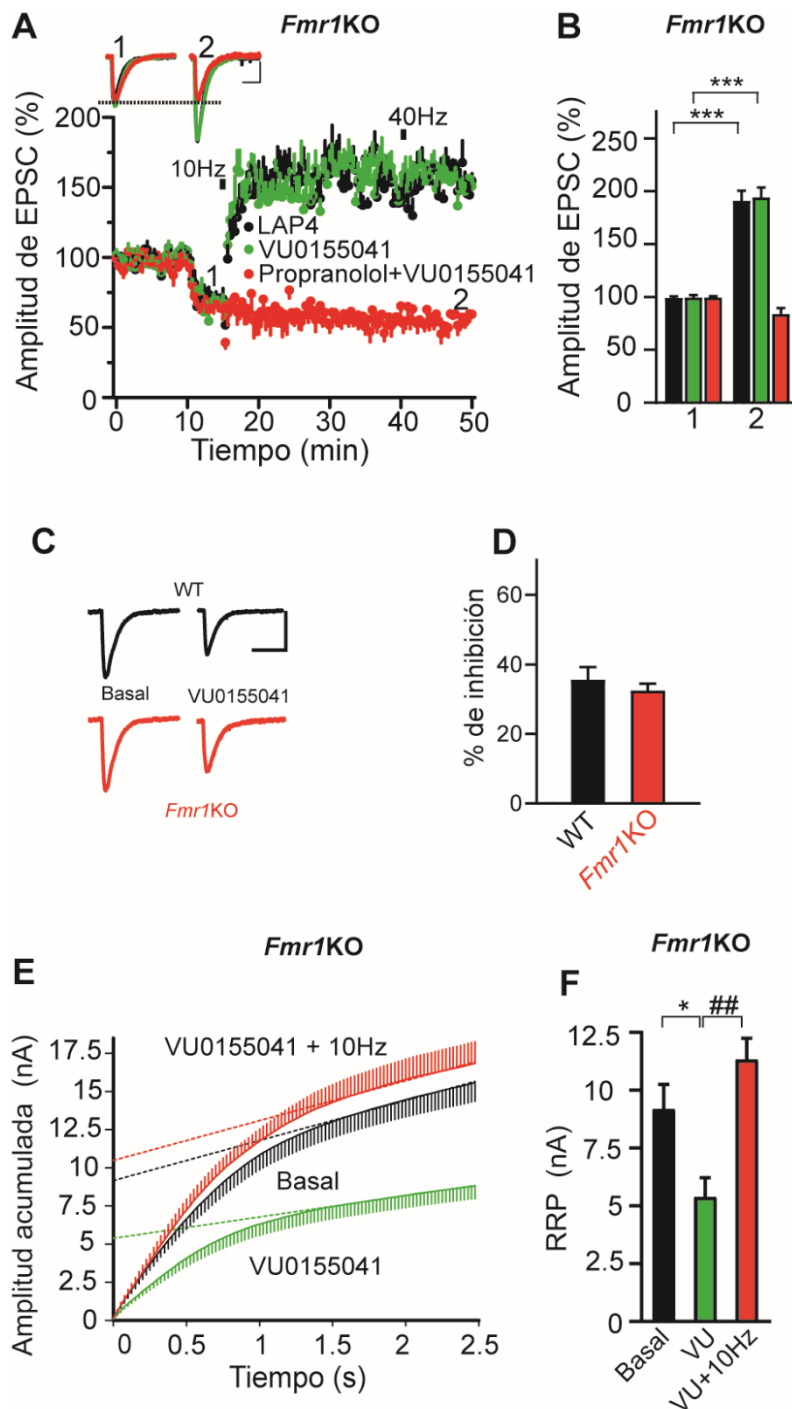


Figura 23. La activación de mGlu4 rescata la PF-PC LTP en las rodajas de ratones *Fmr1KO*. **A**, L-AP4 (40 μ M) y el PAM de mGluR4 VU 0155041 (100 μ M) rescata la PF-PC LTP en las rodajas *Fmr1KO*. El antagonista de β -ARs propranolol (100 μ M) se aplicó 30 min antes de la inducción de la LTP. **B**, Cuantificación de la amplitud de los EPSCs (media de 6 EPSCs consecutivos a 0,05 Hz) 30 min antes de la estimulación (1) comparados con los valores respectivos antes de la estimulación (2): L-AP4 (n = 10 células/ 10 rodajas/5 ratones, *** p < 0,001), VU (n = 11 células/11 rodajas/6 ratones, *** p < 0,001), propranolol + VU (n = 10 células/10 rodajas/6 ratones, p > 0,05). **C**, Amplitud acumulada de los EPSCs de rodajas *Fmr1KO* en presencia o ausencia (basal) de VU (100 μ M, 10 min) y antes (VU) y 30 min después de la estimulación con 10 Hz (VU + 10 Hz). **D**, Cuantificación del tamaño de la RRP en las siguientes condiciones: Basal (n = 10 células/10 rodajas/7 ratones), VU (n = 12 células/10 rodajas/7 ratones, ** p < 0,01, comparado con la condición basal), VU + 10 Hz (n = 8 células/8 rodajas/4 ratones, ## p < 0,01, comparado con VU). **E**, La inhibición mediada por VU 0155041 no está alterada en los ratones *Fmr1KO*. **F**, Cuantificación de la amplitud de los EPSC (la media de 6 EPSCs consecutivos a 0,05 Hz) 5 minutos después de añadir VU 0155041 (100 mM) en ratones WT (n = 11 células/11 rodajas/6 ratones) y en ratones *Fmr1KO* (n = 11 células/11 ratones/6 ratones, p > 0,05, test de t de Student no pareado). Los datos se compararon utilizando el test de t de Student. Los datos muestran la media \pm SEM. Escala: 100 pA y 10 ms.

Resultados

El PAM de mGlu4 VU 0155041 también redujo el tamaño de la RRP en las sinapsis *Fmr1KO* en condiciones basales (de $9181,36 \pm 1074,3$ a $5384,78 \pm 828,7$,) y esto permitió que, en estas condiciones, el protocolo de inducción de la PF-PC LTP sí incrementara significativamente dicho parámetro (de $5384,78 \pm 828,67$ a $11332,90 \pm 916,96$, Fig. 23C, D). Por lo tanto, el PAM de mGluR4 VU 0155041 recuperó tanto el tamaño normal de la RRP como la PF-PC LTP en rodajas *Fmr1KO*.

Para confirmar que los efectos de VU 0155041 se debían a la restauración de las alteradas dinámicas de Ca^{2+} de las sinapsis PF-PC *Fmr1KO*, realizamos experimentos en preparaciones de sinaptosomas de cerebelo, que contienen alto grado de enriquecimiento en terminales sinápticos de neuronas granulares (Andersen et al., 1992) en las que medimos el cambio en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$), mediante la sonda Fura2-AM, en respuesta a despolarizaciones. Los sinaptosomas se despolarizaron con bajas concentraciones de KCl (10 mM), condiciones que facilitan la apertura de canales de Na^+ y K^+ necesarios para la generación de potenciales de acción (Godino et al., 2007). El aumento en la $[Ca^{2+}]_c$ inducido por KCl fue mayor en los sinaptosomas de ratones *Fmr1KO* que en los de sus hermanos de camada WT ($110,95 \pm 4,20$ nM en WT, y $138,1 \pm 5,08$ nM en *Fmr1KO* Fig. 24 A, B), lo cual es compatible con la prolongación de los potenciales de acción descrita en las sinapsis *Fmr1KO* (Deng et al., 2013). El VU 0155041 redujo los cambios inducidos por KCl en $[Ca^{2+}]_c$ tanto en los sinaptosomas WT (de $110,95 \pm 4,20$ nM en condiciones basales, a $88,32 \pm 4,08$ nM con VU 0155041) como en sinaptosomas *Fmr1KO* (de $138,1 \pm 5,08$ nM en condiciones basales a $106,15 \pm 5,92$ nM con VU 0155041), revirtiendo en estos últimos el exceso de entrada de Ca^{2+} en respuesta a despolarizaciones, como indica el hecho de que la $[Ca^{2+}]_c$ en sinaptosomas *Fmr1KO* en presencia de VU 015541 sea similar a la de los sinaptosomas WT en ausencia de éste ($106,15 \pm 5,92$ nM en *Fmr1KO*, y $110,95 \pm 4,20$ nM en WT, Fig. 24A, B). Estos datos, en conjunto, indican que la homeostasis de Ca^{2+} está desregulada en los terminales sinápticos cerebelares de ratones *Fmr1KO* y que puede ser regulada con el PAM de mGluR4 VU 0155041.

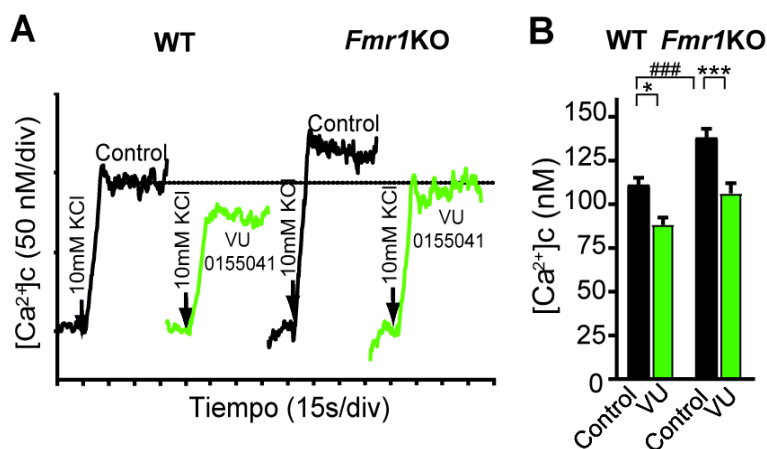


Figura 24. La aplicación de VU 0155041 restaura las dinámicas de Ca²⁺ en sinaptosomas cerebelares de *Fmr1KO*. Cambios en la concentración de Ca²⁺ citoplasmático libre ([Ca²⁺]_c) en presencia y ausencia de VU 0155041 (100 μM) añadido, al menos 5 min, antes de la aplicación de KCl. **B**, Cuantificación de los cambios en [Ca²⁺]_c: KCl/WT (n = 18/5 preparaciones), KCl/*Fmr1KO* (n = 16/5 preparaciones, ###p < 0,001, comparado con KCl/WT), VU/KCl/WT (n = 11/4 preparaciones), y VU/KCl/*Fmr1KO* (n = 16/5 preparaciones, ###p < 0,001, comparado con KCl/WT), VU/KCl/WT (n = 11/4 preparaciones), y VU/KCl/*Fmr1KO* (n = 12/4 preparaciones). Nótese que el cambio en la [Ca²⁺]_c de VU/KCl/*Fmr1KO* es similar al de KCl/WT (p>0,05). Los datos se compararon utilizando una ANOVA seguida de una comparación múltiple mediante test de Tukey. Los datos muestran la media ± SEM.

VU 0155041 es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ha sido usado anteriormente en estudios *in vivo* en ratón (Duvoisin et al., 2011). Para comprobar que este fármaco inyectado intraperitonealmente en efecto llegaba eficazmente a las sinapsis PF-PC del cerebelo, se realizaron inyecciones intraperitoneales con VU 0155041 (o con su vehículo salino) y 2 horas después se prepararon rodajas cerebelares (Fig. 25A). La PF-PC LTP fue rescatada en las rodajas de ratones *Fmr1KO* inyectados con VU 0155041 (de 101,26 ± 2,58 % a 200,46 ± 22,25 %) pero no en rodajas de ratones *Fmr1KO* inyectados con el vehículo salino (de 99,94 ± 2,81 % a 84,89 ± 9,31 %, Fig. 25B, C). De igual manera, el VU 0155041 inyectado intraperitonealmente en ratones *Fmr1KO* adultos (≥ 3 meses) también rescató la PF-PC LTP en rodajas cerebelares (de 105,63 ± 7,38 a 222,00 ± 23,02, Fig. 25D, E). Estos datos demuestran que el tratamiento intraperitoneal con VU 0155041 es capaz de recuperar la PF-PC LTP en ratones *Fmr1KO* a distintas edades y que, por tanto, dicho tratamiento podría ser eficaz para aliviar las alteraciones conductuales de estos animales.

Resultados

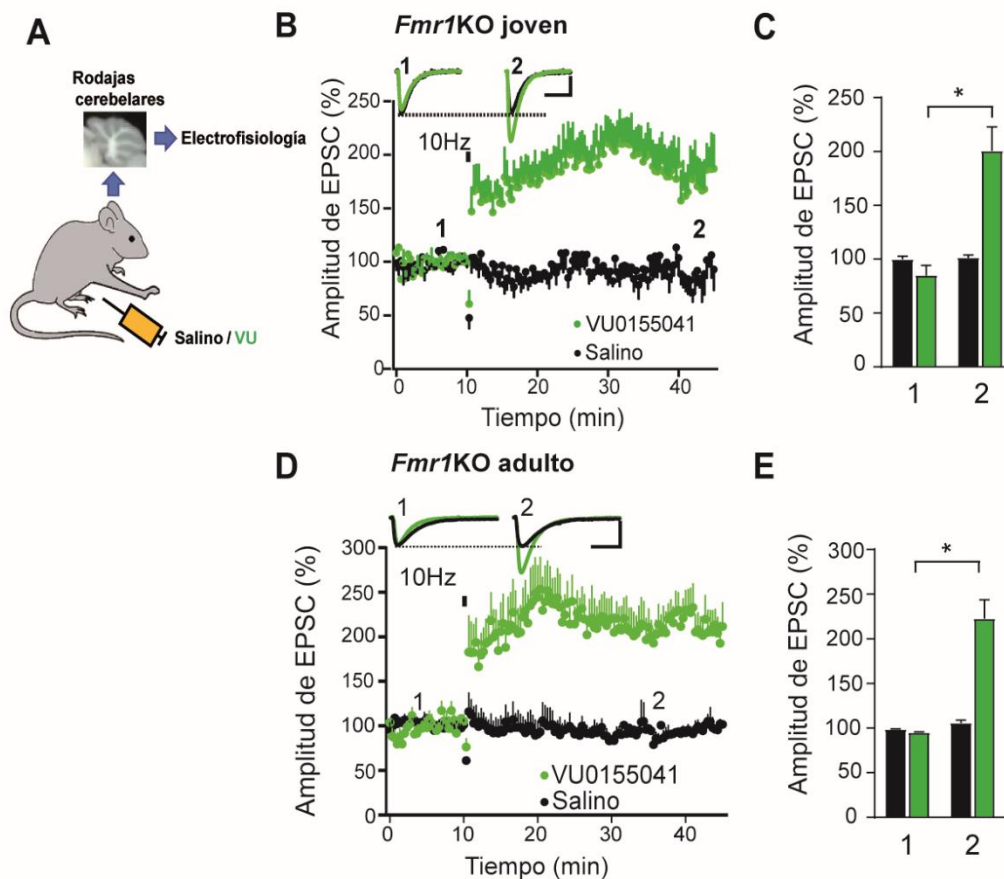


Figura 25. La administración de VU 0155041 *in vivo* restaura la PF-PC LTP. **A**, Esquema mostrando la preparación de las rodajas cerebelares de ratones inyectados con VU 0155041 o una solución salina. Respuesta en la amplitud (media de 6 EPSCs consecutivos a 0,05 Hz) ante una estimulación de 10 Hz en rodajas de ratones *Fmr1KO* jóvenes (**B, C**) y adultos (≥ 3 meses) (**D, E**) inyectados con VU 0155041 o suero salino 30 min después de la estimulación (**2**) comparados con sus valores respectivos antes de ésta (**1**): ratones *Fmr1KO* inyectados con VU (5 mg/Kg) (Jóvenes: n = 14 células/14 rodajas/10 ratones; Adultos: n = 6 células/6 rodajas/6 ratones), *Fmr1KO* inyectados con suero salino (Jóvenes: n = 10 células/10 rodajas/8 ratones, * p < 0,05; Adultos: n = 7 células/7 rodajas/6 ratones, ** p < 0,01). Los datos se compararon utilizando el test de Welch. Escala: 100 pA y 10 ms. Los datos muestran la media \pm SEM.

Caja 6. Cerebelo y TEA

El cerebelo está asociado a la cognición y se ha visto que alteraciones en el desarrollo del cerebelo así como el daño cerebelar ocasionan problemas en las funciones ejecutivas (Ito, 2008) y patologías como autismo, dislexia y depresión (D'Angelo & Casali, 2013). Lesiones en el cerebrocerebelo causan el llamado síndrome afectivo-cognitivo cerebeloso caracterizado por problemas en las funciones ejecutivas (problemas de planificación, en el pensamiento abstracto, en la memoria de trabajo), problemas en la cognición espacial (memoria y reconocimiento visoespacial) así como alteraciones de la personalidad (suavizamiento de las emociones, conducta desinhibida) y problemas lingüísticos (disprosodia, agramatismo) dando lugar a una disminución importante de la actividad intelectual similar al observado en el síndrome prefrontal (D'Angelo, 2010). Estudios de tractografía de alta resolución han permitido ver que cerca del 80% de las conexiones del cerebelo son con áreas asociativas, con importantes conexiones con áreas temporales y prefrontales (Palesi et al., 2017). Por último, las patologías que afectan al cerebelo, que implican la pérdida o la malformación de las PCs, así como las lesiones cerebelares, están implicadas en los trastornos de espectro autista (TEA) (Bauman & Kemper, 2005; Limperopoulos et al., 2007). La eliminación selectiva de determinadas proteínas en las PCs, como es el caso del complejo de esclerosis tuberosa 1 (TSC1) (Tsai et al., 2012), el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (Cupolillo et al., 2016) o la proteína de andamiaje postsináptico SHANK2 (Peter et al., 2016), provoca la aparición de síntomas relacionados con TEA, como son los déficits sociales y comportamientos repetitivos, que parecen estar relacionados con alteraciones en la generación de potenciales de acción de las PCs.

Las habilidades motoras son de gran importancia para el desarrollo de otras habilidades que están afectadas en los individuos que padecen TEA, como el lenguaje, la comunicación (Libertus & Violi, 2016), la imitación, el control atencional (Franchak & Adolph, 2014) y la cognición social (Gallese et al., 2009). Los pacientes con FXS muestran alteraciones en varias regiones del cerebro, sin embargo, el cerebelo es uno de los lugares que muestra una disfunción de su actividad de manera consistente en todos los casos (Kelly et al., 2020).

Los pacientes con FXS muestran una disminución en el número de células de Purkinje normales, en el tamaño del vermis cerebelar y anomalías en el volumen total de materia blanca y materia gris (Chen et al., 2022). Los axones de las células de Purkinje que proyectan a los núcleos cerebelosos profundos y, directa o indirectamente, a múltiples regiones de la corteza son las únicas eferencias de la corteza cerebelosa. Esta información se mandará a las áreas sensoriales de la corteza cerebral, la corteza frontoparietal, los ganglios basales y finalmente al propio cerebelo como retroalimentación y permitirá completar el ciclo de aprendizaje motor (Beckinghausen & Sillitoe, 2019). Por tanto, la regulación temporal y espacial de la sinapsis entre las fibras trepadoras y las neuronas de Purkinje y la sinapsis PF-PC es fundamental para el aprendizaje motor.

Resultados

Lesiones o procesos hemorrágicos en el cerebelo a una edad temprana también están asociados a la incidencia de TEA (Volpe, 2009). En modelos animales la inhibición química de las PCs provoca comportamientos sociales asociados con TEA y comportamientos repetitivos (Stoodley et al., 2017) y la inhibición química de las interneuronas de la capa molecular (que afecta a la actividad de las PCs) provocan alteraciones en el comportamiento y aprendizaje social sin afectar a la locomoción (Badura et al., 2018). En concordancia con estos trabajos, el periodo de expansión de las células granulares en el cerebelo coincide con la aparición de los primeros síntomas del TEA (Wang et al., 2014). A pesar de que numerosos estudios indican conexiones directas e indirectas entre el cerebelo y las regiones cerebrales asociadas con funciones cognitivas superiores, el mecanismo mediante el cual el cerebelo controla los comportamientos sociales está lejos de ser entendido.

4.2.6. VU 0155041 mejora los déficits en el aprendizaje motor y en el comportamiento social en el ratón *Fmr1KO*

Las sinapsis PF-PC están implicadas en el aprendizaje motor (Gutierrez-Castellanos et al., 2017; Ito, 2002; Schonewille et al., 2010), por lo que nos preguntamos si el rescate de la PF-PC LTP podría rescatar también los déficits encontrados en los ratones *Fmr1KO*. Primero evaluamos la coordinación motora de estos ratones mediante los tests de Rotarod y del paso elevado. El primero mide el tiempo que tarda cada animal en caerse de un Rotarod en aceleración. En estas condiciones, no se encontró ninguna diferencia entre los ratones WT y los *Fmr1KO* inyectados con vehículo salino ni tampoco se observó ningún efecto significativo del tratamiento (Fig. 26A). Tampoco se encontraron efectos del genotipo o del tratamiento en la prueba del paso elevado que mide el tiempo que tarda el ratón, colocado en el centro de una barra elevada, en llegar a una plataforma situada en cada uno de los extremos (WT sal: $9,72 \pm 1,75s$, *Fmr1KO*: $9,78 \pm 2,80s$, WT VU: $28,44 \pm 9,12s$, *Fmr1KO* VU: $18,40 \pm 7,52s$, Fig. 26B).

Dado que los ratones *Fmr1KO* no presentaban alteraciones motoras significativas en estas pruebas, analizamos si estos animales mostraban déficits en el aprendizaje motor. El cerebelo es importante para la coordinación de movimientos que requieren velocidad, delicadeza y precisión, como por ejemplo los movimientos de alcanzar y agarrar objetos (Becker & Person, 2019; Sakayori et al., 2019). Se ha descrito que los ratones *Fmr1KO* presentan alteraciones en tests que evalúan la motricidad precisa como la que se requiere para el alcance y agarre de objetos (Padmashri et al., 2013). En esta

prueba, los ratones son entrenados para utilizar sus patas delanteras para agarrar y recuperar pellets de comida a través de una ranura estrecha (Fig. 27A). Quisimos comprobar si el rescate de la PF-PC LTP con VU 0155041 mejoraba la eficacia en la realización de esta tarea en los ratones *Fmr1KO*. Tras dos días de habituación, la eficiencia de los distintos grupos (número de pellets recuperados/número de intentos) se midió a lo largo de 5 días y se comparó con la de los ratones WT inyectados con salino. Se observó un déficit significativo en los ratones *Fmr1KO* inyectados con solución salina en los días 3 (WT: $0,17 \pm 0,03$, *Fmr1KO*: $0,09 \pm 0,02$), 4 (WT: $0,22 \pm 0,03$, *Fmr1KO*: $0,10 \pm 0,02$) y 5 (WT: $0,25 \pm 0,04$, *Fmr1KO*: $0,11 \pm 0,03$, Fig. 27B), que fue parcialmente revertido por la administración de VU 0155041 (*Fmr1KO* VU: día 3: $0,10 \pm 0,02$, día 4: $0,13 \pm 0,03$ y día 5: $0,15 \pm 0,03$, 27B). Tratamiento que no afectó significativamente a la eficiencia de sus hermanos WT (día 3: $0,15 \pm 0,03$, día 4: $0,17 \pm 0,03$ y día 5: $0,20 \pm 0,03$, Fig. 27B).

Resultados

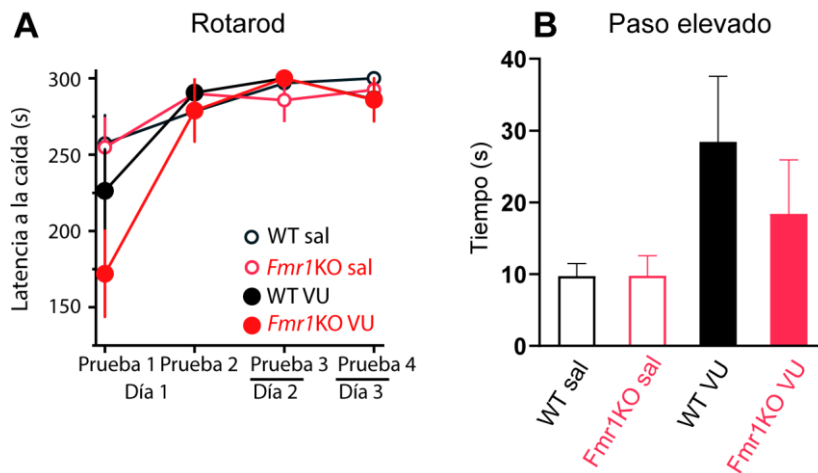


Figura 26. Los ratones *Fmr1KO* no presentan déficits en la coordinación motora en las pruebas de Rotarod y de paso elevado. **A**, Latencia de caída de los ratones en un rotarod acelerando. Las pruebas 1 y 2 se realizaron el día 1, y la 3 y 4 los días 2 y 3, respectivamente. Los ratones WT inyectados con salino (n = 11), *Fmr1KO* inyectados con salino (n = 14), WT inyectados con VU (n = 10) y *Fmr1KO* inyectados con VU (n = 11). Ninguna de las comparaciones con WT salino fueron significativas (test de Kruskal-Wallis seguido de test de Dunn: prueba 1: *p < 0,05, prueba 2: p > 0,05, prueba 3: *p < 0,05, prueba 4: *p < 0,05). La comparación entre ratones *Fmr1KO* inyectados con VU comparados con *Fmr1KO* inyectados con salino no fue significativa en ninguna de las pruebas (test de Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn, p < 0,05). **B**, Se midió el tiempo empleado en caminar desde el centro de una barra elevada (de 40 cm de largo y 5 cm de ancho) hasta uno de sus extremos. WT inyectados con salino (n = 11), *Fmr1KO* inyectados con salino (n = 14), WT inyectados con VU (n = 10) y *Fmr1KO* inyectados con VU (n = 11). Ninguna de las comparaciones con ratones WT inyectados con salino fueron significativas (test de Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn, p > 0,05). Las comparaciones entre *Fmr1KO* inyectado con VU y *Fmr1KO* inyectado con salino no fueron significativas (Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn, p > 0,05). Los datos representan la media ± SEM.

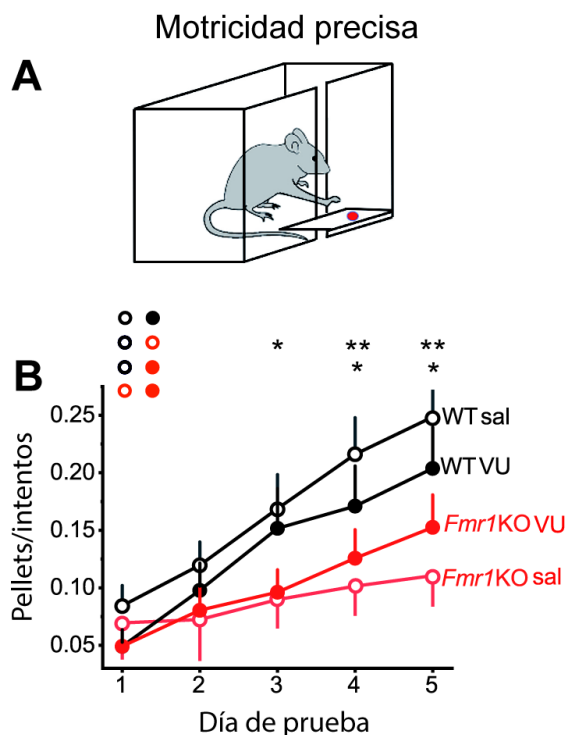


Figura 27. VU 155041 atenúa los déficits en la prueba de motricidad fina en ratones *Fmr1KO*. **A**, Diagrama del test de motricidad fina. Los ratones utilizan sus extremidades anteriores para alcanzar y agarrar pellets de comida a través de una rendija estrecha. **B**, Eficiencia en el test (número de pellets recuperados por intento) en los cuatro grupos experimentales: WT inyectados con salino (WT sal, n = 31), *Fmr1KO* inyectados con salino (*Fmr1KO* sal, n = 33), WT inyectados con VU (n = 31) y *Fmr1KO* inyectados con VU (n = 32) durante 5 días. *p < 0,05, **p < 0,01. Se compararon entre sí los datos de eficiencia de cada día de test de los 4 grupos experimentales mediante una ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguida de un test LSD. Los datos representan la media ± SEM.

Dado que el test de alcance y agarre implica otras áreas cerebrales aparte del cerebelo, para confirmar que los efectos del tratamiento con VU 0155041 se debían a mejoras en la función de las sinapsis PF-PC del cerebelo también evaluamos en estos grupos de ratones el condicionamiento clásico de parpadeo y el reflejo vestibulo-ocular (VOR), dos pruebas que dependen del cerebelo y en las cuales hay un aprendizaje motor asociado a la plasticidad de las sinapsis PF-PC (Gutierrez-Castellanos et al., 2017; Hirano, 2018; Ito, 2002). En el condicionamiento clásico, el ratón aprende a asociar un estímulo condicionado (EC), como un tono determinado, con un estímulo no condicionado (EI) como una descarga eléctrica leve en el nervio supraorbital, que produce un parpadeo (Fig. 28A, B). Debido al refuerzo de la asociación EC-EI durante el entrenamiento, la respuesta condicionada (CR) de parpadeo se ve también reforzada. Estudios previos ya han descrito alteraciones en este aprendizaje en los ratones *Fmr1KO* (Hirano, 2018). Después de 10 sesiones de condicionamiento se encontró un déficit significativo en el número de CRs en los ratones *Fmr1KO* inyectados con salino comparados con sus hermanos de camada WT ($72,79 \pm 4,66$ % los ratones WT sal., y $52,86 \pm 3,20$ % los ratones *Fmr1KO* sal, Fig. 28C) que fue revertido por la inyección de VU 0155041 (*Fmr1KO* VU: $63,91 \pm 2,79$ %). Tratamiento que no afectó significativamente al número de CRs obtenido por sus hermanos WT (WT VU: $81,45 \pm 3,52$ %, Fig. 28C).

El reflejo vestibulo-ocular (VOR) ayuda a estabilizar la mirada cuando la cabeza realiza rotaciones (Fig. 29A). El cerebelo juega un papel importante en el control de fase y las dinámicas de ganancia durante el VOR (Ito, 2002). En la figura 29A pueden verse algunos ejemplos de los movimientos de los ojos en la mesa de rotación a diferentes frecuencias. Tal y como se ha descrito anteriormente (Sergaki et al., 2017; Stahl et al., 2006), los ratones control mostraron un aumento de la ganancia y una disminución del ángulo de fase en el rango que se empleó para la rotación de cabeza (de 0,1 Hz a 0,6 Hz) durante pruebas sucesivas. Los ratones *Fmr1KO* tratados con vehículo salino (*Fmr1KO* sal) mostraron déficits en la ganancia en comparación con sus hermanos WT (WT sal) (0,1 HZ, WT sal: $0,41 \pm 0,019$, *Fmr1KO* sal: $0,30 \pm 0,05$, Fig. 29B) así como en la fase (0,6 Hz: WT sal: $-0,69 \pm 0,94$, *Fmr1KO* sal: $3,75 \pm 1,34$, Fig. 29C). La administración de VU 0155041 en los ratones *Fmr1KO* (*Fmr1KO* VU) compensó tanto las diferencias en la ganancia (0,1 Hz: $0,30 \pm 0,03$, Fig. 29B) como en la fase (0,6 Hz: $1,00 \pm 1,18$, Fig. 29C). Además, los ratones *Fmr1KO* inyectados con salino presentaban un aumento en el número de fases rápidas por ciclo vestibulo-ocular en comparación con los ratones WT (0,6 Hz: WT sal: $2,04 \pm 0,06$, *Fmr1KO* sal: $2,63 \pm 0,10$; 0,3 Hz: WT sal: $1,54 \pm 0,19$, *Fmr1KO*

Resultados

sal: $2,72 \pm 0,39$ Fig. 29D). Un exceso en fases rápidas durante el VOR dificulta una visión adecuada, y este exceso fue también compensado con la administración de VU 0155041 (*Fmr1*KO VU: 0,6 Hz: $1,92 \pm 0,13$ y 0,3 Hz $1,26 \pm 0,14$) La relación entre la ganancia vestibulo-ocular y la frecuencia de las fases rápidas también era diferente entre los ratones WT inyectados con salino (0,6 Hz, $0,44 \pm 0,03$, 0,3 Hz: $0,55 \pm 0,06$) y sus hermanos *Fmr1*KO (0,6 Hz: $0,33 \pm 0,02$ y 0,3 Hz: $0,29 \pm 0,03$, Fig. 29E) y estas diferencias se eliminaron con la administración de VU 0155041 en los ratones *Fmr1*KO (0,6 Hz $0,48 \pm 0,04$, 0,3 Hz $0,61 \pm 0,11$, Fig. 29E).

Todos estos resultados indican que VU 0155041 puede tener un potencial terapéutico en los déficits de aprendizaje motor asociado a cerebelo en los pacientes del FXS.

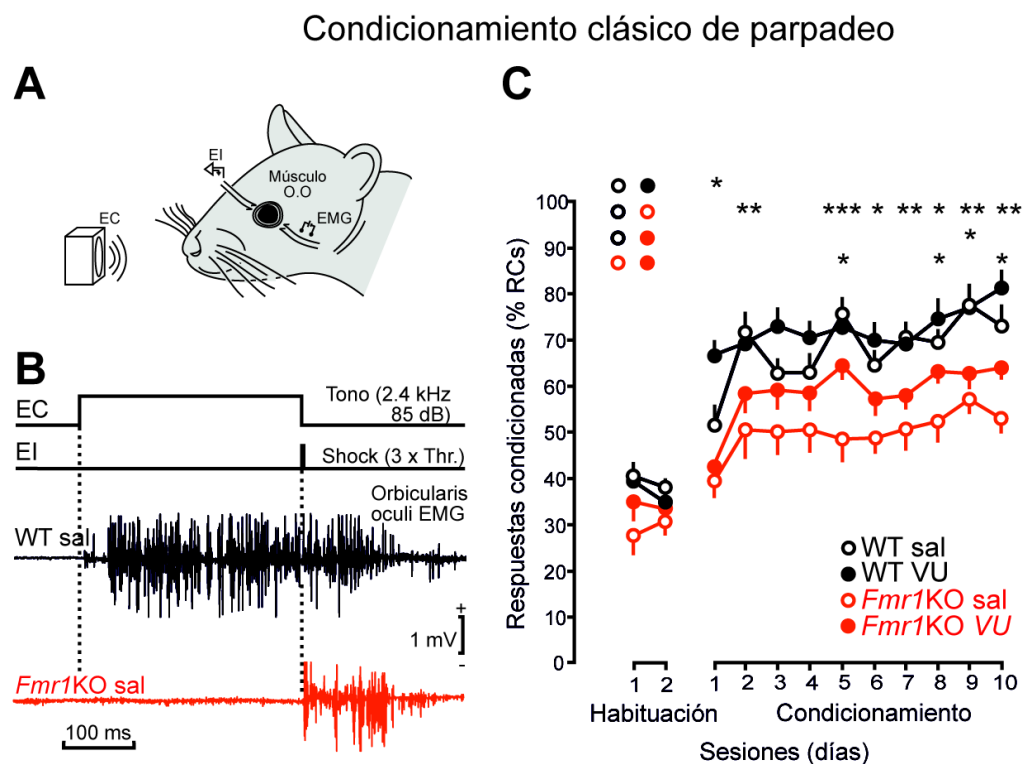


Figura 28. VU 155041 atenúa los déficits en el aprendizaje de condicionamiento clásico de parpadeo en ratones *Fmr1*KO. **A**, El condicionamiento clásico de parpadeo fue evocado mediante un estímulo condicionado (EC) que consistió en un tono de 350 ms (2,4 kHz, 85 dB) reproducido por un altavoz situado a 50 cm enfrente de la cabeza del animal. **B**, El estímulo no condicionado (EI) se administró al final del EC y consistió en un choque eléctrico (un pulso cuadrado catódico de 0,5 ms de duración) en el nervio supraorbital. Las respuestas condicionadas (RCs) se determinaron mediante un EMG de la actividad del músculo orbicular ipsilateral al EI. **F**, Ejemplos de registros de EMG obtenidos de ratones WT y *Fmr1*KO inyectados con salino durante la octava sesión de condicionamiento. Puede apreciarse la presencia de una RC clara en el ratón WT inyectado con salino (WT sal) y su ausencia en un ratón *Fmr1*KO inyectado con salino (*Fmr1*KO sal). **C**, RCs después de 10 sesiones de condicionamiento en WT sal (n = 10), *Fmr1*KO sal (n = 10), WT VU (n = 10) y *Fmr1*KO VU (n = 10). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Se compararon entre sí los datos de cada día de test de los 4 grupos experimentales mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguida de un test de Holm-Sidak's. Los datos representan la media ± SEM.

El cerebelo también está implicado en actividades no-motoras como es la cognición social (Carta et al., 2019; Van Overwalle et al., 2020). Determinadas regiones del cerebelo tienen conectividad con la corteza y con regiones implicadas en comportamientos sociales. Ya que los déficits en la interacción social son una de las características más destacadas de los ratones *Fmr1KO* (Bhattacharya et al., 2012; Kat et al., 2022), quisimos saber si el VU 0155041 también mejoraba estos problemas. El test de sociabilidad evalúa el tiempo que un animal interactúa con una jaula que contiene otro ratón en comparación con el que interactúa con una jaula vacía (Fig. 30A). Los ratones *Fmr1KO* inyectados con salino mostraron un claro déficit en esta prueba respecto a sus hermanos WT (WT sal: $46,00 \pm 3,69$ % y *Fmr1KO* sal: $33,71 \pm 3,51$ %) que fue revertido por el tratamiento con VU 0155041 ($45,64 \pm 2,06$ Fig. 30B). A continuación, evaluamos la novedad social midiendo el tiempo de interacción con un ratón familiar o conocido en comparación con un ratón no familiar (Fig. 30C). Los ratones *Fmr1KO* inyectados con salino mostraron, de nuevo, un déficit en esta prueba en comparación con sus hermanos WT (WT sal: $26,35 \pm 3,56$ % y *Fmr1KO* sal: $9,13 \pm 3,37$ %), que también fue revertido por la inyección de VU 0155041 ($20,31 \pm 2,32$ %, Fig. 30D). Estos resultados indican que VU 0155041 mejora las alteraciones en el comportamiento social del ratón *Fmr1KO* y que, por tanto, presenta potencial traslacional en el tratamiento de las alteraciones sociales de los pacientes de este síndrome.

Resultados

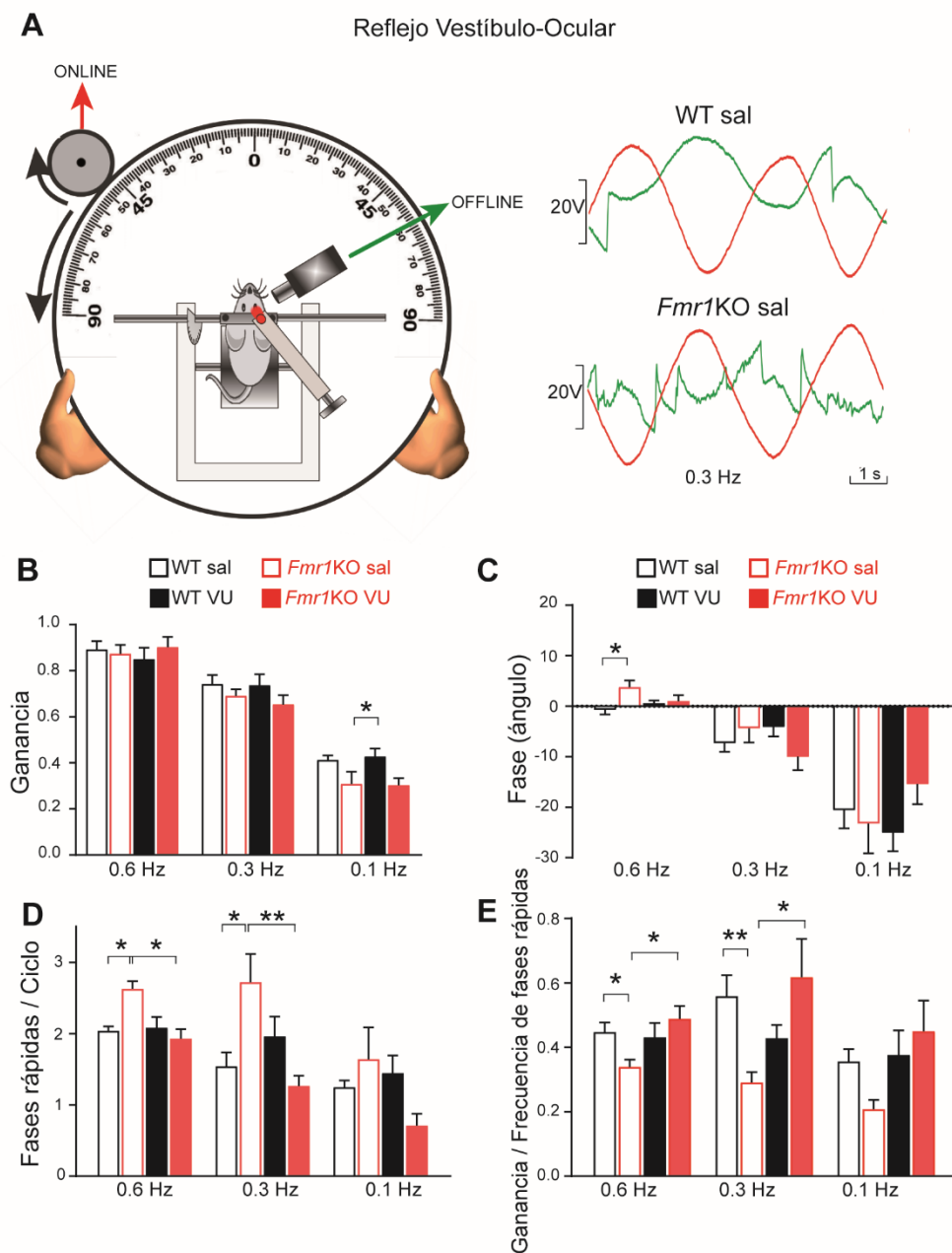


Figura 29. El tratamiento con VU 0155041 atenúa los déficits en el VOR en los ratones *Fmr1KO*. **A**, Diseño experimental. Rotaciones de la mesa (rojo) y posiciones del ojo (verde). Ejemplos de movimientos oculares. **B**, Ganancia del VOR. 0,1 Hz: WT sal (n = 10), *Fmr1KO* (n = 10), *p < 0,05, WT VU (n = 11), p > 0,05 y *Fmr1KO* VU (n = 11), p > 0,05, comparado con WT sal. *Fmr1KO* comparado con *Fmr1KO* sal, p > 0,05 (test de Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn). **C**, Fase del VOR. 0,6 Hz: *Fmr1KO* sal, *p < 0,05, WT VU, p > 0,05, *Fmr1KO* VU, p > 0,05, comparado con WT sal. *Fmr1KO* VU comparado con *Fmr1KO* sal, p > 0,05 (ANOVA de una vía seguida de test de Holm-Sidak). **D**, Fases rápidas por ciclo vestibulo-ocular. 0,6 Hz: *Fmr1KO* sal, *p < 0,05, WT VU, p > 0,05 y *Fmr1KO* VU, p > 0,05, comparado con WT sal. *Fmr1KO* VU comparado con *Fmr1KO* sal, *p < 0,05 (ANOVA de una vía seguida de un test Holm-Sidak). 0,3 Hz: *Fmr1KO* sal, *p < 0,05, WT VU, p > 0,05, *Fmr1KO* VU, p > 0,05, comparado con WT sal. *Fmr1KO* VU comparado con *Fmr1KO* sal, **p < 0,01 (ANOVA de una vía seguida de un test Holm-Sidak). **E**, Relación entre la ganancia del VOR y la frecuencia de las fases rápidas. 0,6 Hz: *Fmr1KO* sal, *p < 0,05, WT VU, p > 0,05, *Fmr1KO* VU, p > 0,05, comparado con WT sal. *Fmr1KO* VU comparado con *Fmr1KO* sal, *p < 0,05 (test de Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn). 0,3 Hz: *Fmr1KO* sal, **p < 0,01, WT VU, p > 0,05, *Fmr1KO* VU, p > 0,05, comparado con WT sal. *Fmr1KO* VU comparado con *Fmr1KO* sal, *p < 0,05 (Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn). Los datos muestran la media ± SEM.

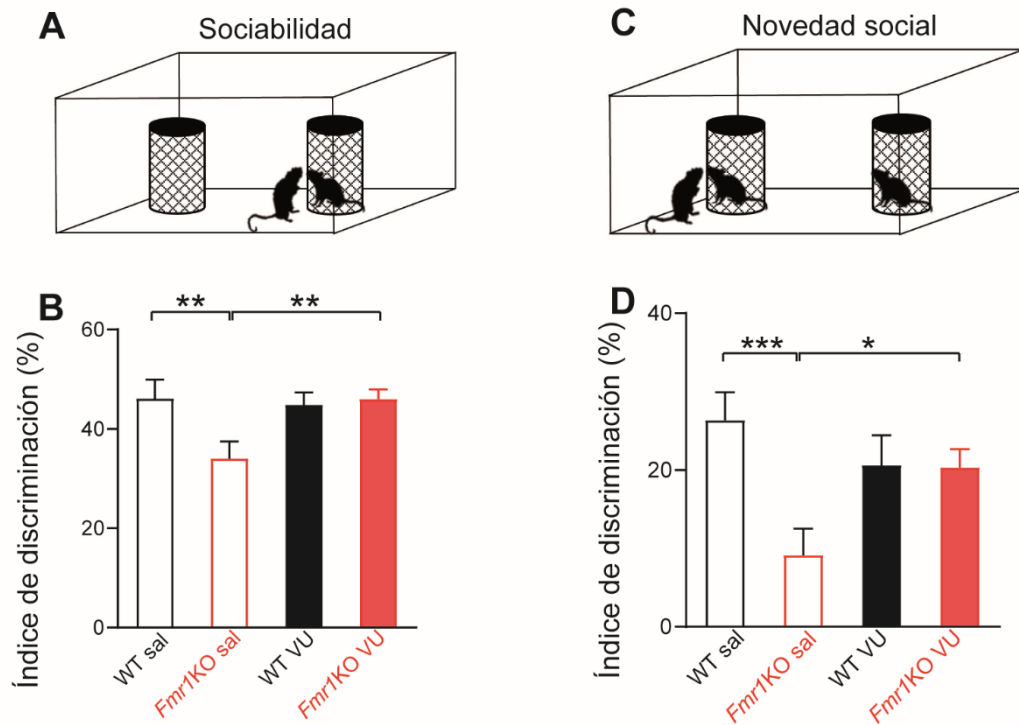


Figura 30. El tratamiento con VU 0155041 atenúa los déficits sociales en los ratones *Fmr1KO*. **A**, Diseño del test de sociabilidad. **B**, El índice de discriminación entre jaulas con ratones y jaulas vacías se mide y se compara con los ratones WT sal (n = 31): Fmr1KO sal (n = 30, **p < 0,01); WT VU (n = 31, p > 0,05); Fmr1KO VU (n = 32, p > 0,05) (Fmr1KO VU comparado con Fmr1KO sal, **p < 0,01). **C**, Diseño del test de novedad social. **D**, El índice de discriminación entre ratones familiares y no familiares se mide y se compara con WT sal (n = 31): Fmr1KO sal (n = 30, ***p < 0,001), WT VU (n = 31, p > 0,05), Fmr1KO VU (n = 32, p > 0,05) (Fmr1KO comparado con Fmr1KO sal, *p < 0,05). Para comparar los datos se utilizó la ANOVA de dos vías seguida por el test LSD. Los datos muestran la media ± SEM.

Resultados

4.3. Modulación bidireccional de la transmisión sináptica inhibitora por el receptor mGlu7 en las neuronas piramidales de CA1

Caja 7. El hipocampo

El hipocampo es una de las regiones que componen la formación hipocámpal, una estructura en forma de C que se encuentra en el suelo del cuerno temporal de los ventrículos laterales. Además de por el hipocampo, la formación hipocámpal estará formada por el giro dentado (DG), el complejo subicular y la corteza entorrinal (EC). Al contrario de lo que ocurre en la mayoría de las estructuras corticales, que presentan una conectividad recíproca, la formación hipocámpal presenta un flujo unidireccional de información a través de sus circuitos sinápticos. La principal vía de información hacia el hipocampo es la EC, la cual recibirá información sensorial previamente procesada por otras regiones de la corteza y la enviará al hipocampo mediante dos vías: la vía directa y la indirecta (Teyler & Rudy, 2007). En la vía indirecta, los axones glutamatérgicos de las neuronas estelares de la capa II de la EC establecerán sinapsis con las neuronas granulares del DG mediante la vía perforante. Los axones de las neuronas granulares, llamados fibras musgosas, establecen sinapsis con las neuronas piramidales de la región Cornu Ammonis (CA) 3 del hipocampo y estas, a su vez, establecen sinapsis con las neuronas piramidales de la región CA1 mediante sus axones excitadores, denominados colaterales de Schaffer (SC). Las neuronas de CA1 enviarán axones a la EC mediante el subículo, formando un circuito cerrado formado por tres sinapsis glutamatérgicas denominado circuito trisináptico (Amaral & Witter, 1989). La vía directa o temporoamónica es la otra vía de entrada de información que surgirá de la EC pero establece sinapsis directamente con la región CA1 y CA3 (Witter et al., 2000). Aparte de las tres sinapsis glutamatérgicas, el circuito hipocámpal trisináptico incluye una serie de circuitos inhibidores que median la inhibición de las principales neuronas excitadoras, así como una serie de procesos de desinhibición (Bartos et al., 2007). Además, se han encontrado sinapsis que van en contra del sentido del circuito trisináptico, como sinapsis entre la región CA3 y las neuronas granulares del DG. A pesar de esto, la importancia de las conexiones canónicas del circuito trisináptico demuestra que estas sinapsis son la principal ruta de flujo de información en el hipocampo (Nakashiba et al., 2008; Neves et al., 2008; Nicoll & Schmitz, 2005).

Las interneuronas GABAérgicas representan el 10-15 % de las neuronas totales del hipocampo (Bezairé & Soltesz, 2013). A pesar de tener una representación minoritaria respecto de las neuronas glutamatérgicas, las interneuronas presentan una gran diversidad de características funcionales que son fundamentales para el correcto funcionamiento de los circuitos hipocámpales. En la región CA1, las aferencias excitadoras (tanto de origen hipocámpal como extrahipocámpales) establecen sinapsis con neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas. En general, las aferencias excitadoras con interneuronas GABAérgicas son más eficaces que las que se dan con neuronas glutamatérgicas, lo cual facilita la inhibición de las células excitadoras (Isaacson & Scanziani, 2011).

La transmisión sináptica está modulada por receptores presinápticos que regulan la entrada de Ca^{2+} o el tamaño de la RRP. Trabajos previos del laboratorio han mostrado que el receptor metabotrópico mGlu7, además de reducir la actividad de los canales de Ca^{2+} (Millán et al., 2002) también activa a la fosfolipasa C (PLC), hidrolizando fosfoinosítidos y generando inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), lo que resulta en una potenciación de la liberación de glutamato que se ha descrito, tanto en preparaciones de sinaptosomas (Ferrero et al., 2016; Martín et al., 2010, 2011) como en experimentos de electrofisiología en sinapsis entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de la región CA1 (SC-CA1) (Martín et al., 2018).

Se sabe que el receptor mGlu7 tiene un papel importante en la protección frente a la epilepsia, esta actividad antiepiléptica se atribuye a la capacidad del receptor mGlu7 para inhibir la liberación de glutamato (Sansig et al., 2001; Zhang et al., 2008). Sin embargo, los datos obtenidos por nuestro grupo cuestionan que la actividad antiepiléptica de mGlu7 radique en su capacidad para inhibir la liberación de glutamato, porque la respuesta dominante, en unas condiciones fisiológicas ante estímulos intensos, es la potenciación de la liberación de glutamato (Martín et al., 2018)

Los receptores mGlu7 se expresan también en botones sinápticos GABAérgicos (Dalezios et al., 2002), como son las sinapsis que establecen neuronas que expresan la proteína parvalbúmina (PV) del *stratum radiatum* con el soma de las células piramidales de CA1, donde reducen la transmisión sináptica inhibitoria (Klar et al., 2015). mGlu7 es el único receptor del grupo III que modula la transmisión sináptica en la sinapsis SC-CA1 en ratones adultos (Ayala et al., 2008). Esto permite utilizar el agonista de mGlu del grupo III L-AP4 a una concentración capaz de activar el receptor mGlu7 a pesar de su baja afinidad (500 μM), sin la interferencia del efecto de otros receptores de alta afinidad como el mGlu4 o el mGlu8 en ratones adultos (≥ 30 días). Sin embargo, se desconoce si en las aferencias inhibitorias de CA1 de ratones adultos también se expresa en solitario mGlu7. Para comprobar esto, empleamos concentraciones bajas de L-AP4 (40 μM , 5 min) y demostramos que no tenía ningún efecto en la amplitud de los IPSCs (del $100,4 \pm 4,05$ % al $92,6 \pm 4,50$ %,) mientras que el L-AP4 a alta concentración (500 μM , 5 min) sí que causó una disminución reversible de los IPSCs (del $100,4 \pm 4,05$ % al $66,18 \pm 5,70$ %, Fig. 31A,

Resultados

B). Esto confirma que el receptor mGlu7 está modulando la transmisión sináptica de las aferencias inhibitoras de piramidales de CA1 mientras que otros mGlu del grupo III de alta afinidad por glutamato no están presentes.

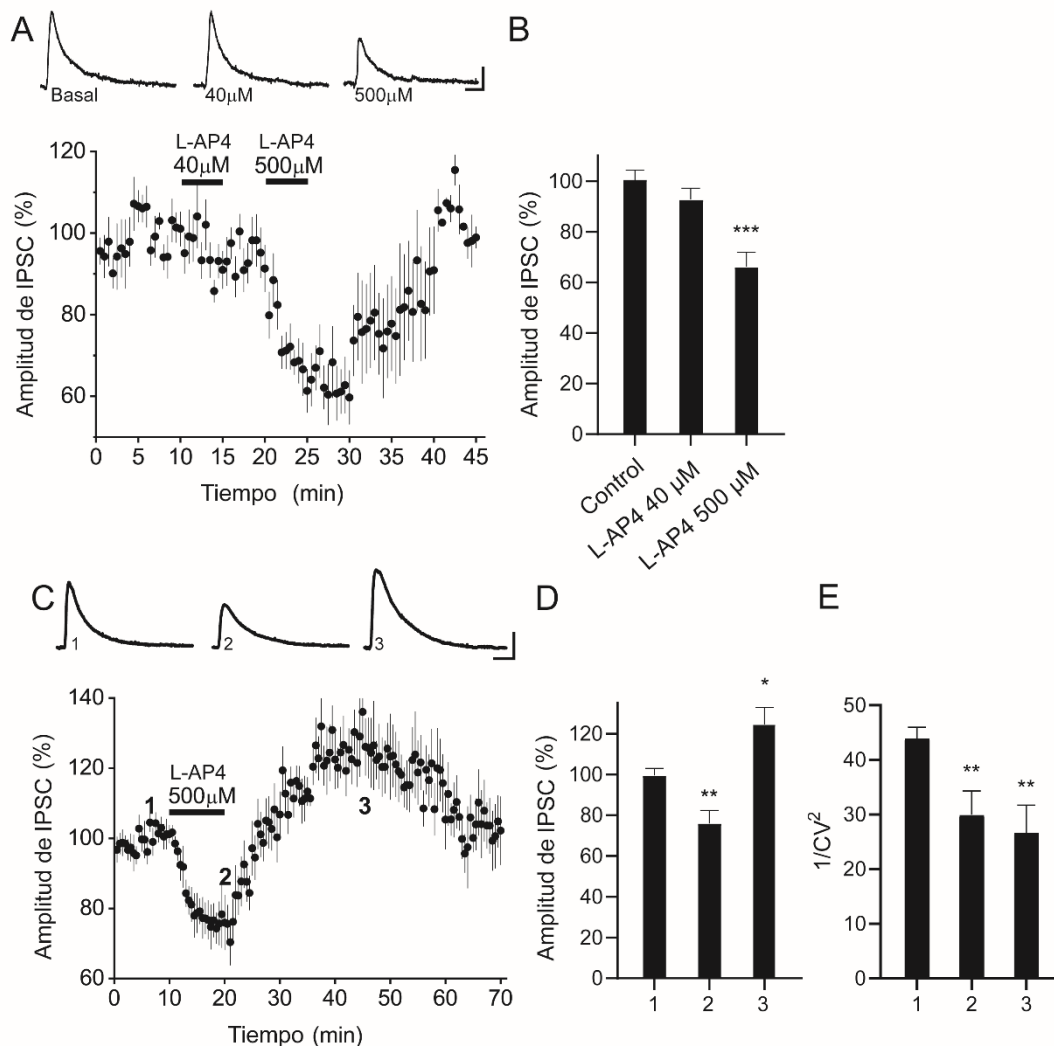


Figura 31. L-AP4 a alta concentración produce una modulación bidireccional de la transmisión sináptica inhibitora.

A, La aplicación de L-AP4 a baja concentración (40 μM , 5 min) no tiene ningún efecto mientras que, una concentración más alta (500 μM , 5 min) produce una reducción reversible de la amplitud de los IPSC. **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los IPSC con L-AP4 a baja concentración ($n = 13$ células/13 rodajas/6 ratones, 40 μM , 5 min, $P > 0,05$) y a alta (500 μM , 5 min, $***p < 0,0001$). **C**, Una aplicación de mayor duración (500 μM , 10 min) produjo primero una reducción y luego un aumento en la amplitud de los IPSC. **D**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los IPSC inducidos por L-AP4 (500 μM , 10 min) durante la inhibición (2) ($n = 16$ células/16 rodajas/8 ratones, $** p < 0,01$) y durante la potenciación (3) ($*** p < 0,001$). **E**, La aplicación de L-AP4 500 μM durante 10 min indujo cambios en el coeficiente de variación durante la inhibición (1) ($**p < 0,005$) y durante la potenciación (2) ($**p < 0,005$) de los IPSC. Los datos en A, C representan el porcentaje de la amplitud de los IPSC normalizados a la situación basal. Los datos que aparecen en las gráficas de barras representan la media \pm SEM de 20 IPSC consecutivos. Los datos se compararon con la condición basal, antes de la aplicación de L-AP4, utilizando el test de t de Student no apareado. Los trazos en A, C son trazos representativos. Escala: 100 pA y 25 ms. Los datos muestran la media \pm SEM.

El receptor mGlu7 es capaz de acoplarse a distintas proteínas G activando distintas cascadas de señalización en las sinapsis excitadoras SC-CA1. En concreto se ha visto que, mientras que una activación breve del receptor con L-AP4 promueve una modulación inhibitoria, una activación más prolongada provoca una potenciación de la transmisión sináptica (Martín et al., 2018). Para comprobar si el receptor mGlu7 presenta este mismo comportamiento en las sinapsis inhibitorias, aplicamos una concentración elevada de L-AP4 (500 μ M, 10 minutos). Esto provocó una inhibición temprana de la amplitud de los IPSCs (del $99,52 \pm 3,41$ % al $76,02 \pm 6,27$ %) que, tras una reversión, finalmente, dio lugar a una potenciación de estas corrientes (del $99,52 \pm 3,41$ % al $124,60 \pm 8,17$ %, Fig. 31C).

Para comprobar la naturaleza presináptica de estos efectos, se analizó el coeficiente de variación ($1/CV^2$). El coeficiente de variación permite medir los niveles de ruido de la transmisión sináptica. La principal fuente de ruido de la transmisión se debe a la naturaleza probabilística de la liberación de neurotransmisor, de manera que los cambios en el coeficiente de variación implican cambios en esta probabilidad de liberación que están asociados a procesos de plasticidad presináptica (Brock et al., 2020). Se encontró un cambio en el $1/CV^2$ durante la inhibición (del $43,96 \pm 2,01$ % al $29,97 \pm 4,35$ %, Fig. 31E) así como durante la potenciación ($43,96 \pm 2,01$ % a $26,68 \pm 5,05$ %, Fig. 31E). Estos resultados confirman que, al igual que se observó en la transmisión sináptica excitadora, el receptor mGlu7 es capaz de ejercer una modulación presináptica bidireccional de la transmisión sináptica inhibitoria.

4.3.1. La modulación bidireccional inducida por L-AP4 no es bloqueada por antagonistas de los receptores AMPA y NMDA

Para descartar que la potenciación de la transmisión inhibitoria, que observamos, se deba a un efecto indirecto, fruto de la inhibición mediada por mGlu7 de las aferencias glutamatérgicas sobre las interneuronas, se incubaron las rodajas con el antagonista de los receptores de AMPA y Kainato, CNQX (20 μ M) y con el antagonista de los receptores de NMDA, AP5 (50 μ M). En estas condiciones la modulación bidireccional de la transmisión sináptica inhibitoria permaneció intacta. Así, el L-AP4 a alta concentración provocó una disminución de la amplitud de los IPSCs (del $100,5 \pm 3,7$ % al $82,1 \pm 5,7$ %,) y posteriormente un incremento de dicha amplitud (del $100,5 \pm 3,7$ % al $120,3 \pm 6,0$ %, Fig. 32A, B). Esto indica que la modulación bidireccional inducida por L-AP4 se debe a la

Resultados

activación directa de receptores mGlu7 localizados en terminales presinápticos GABAérgicos.

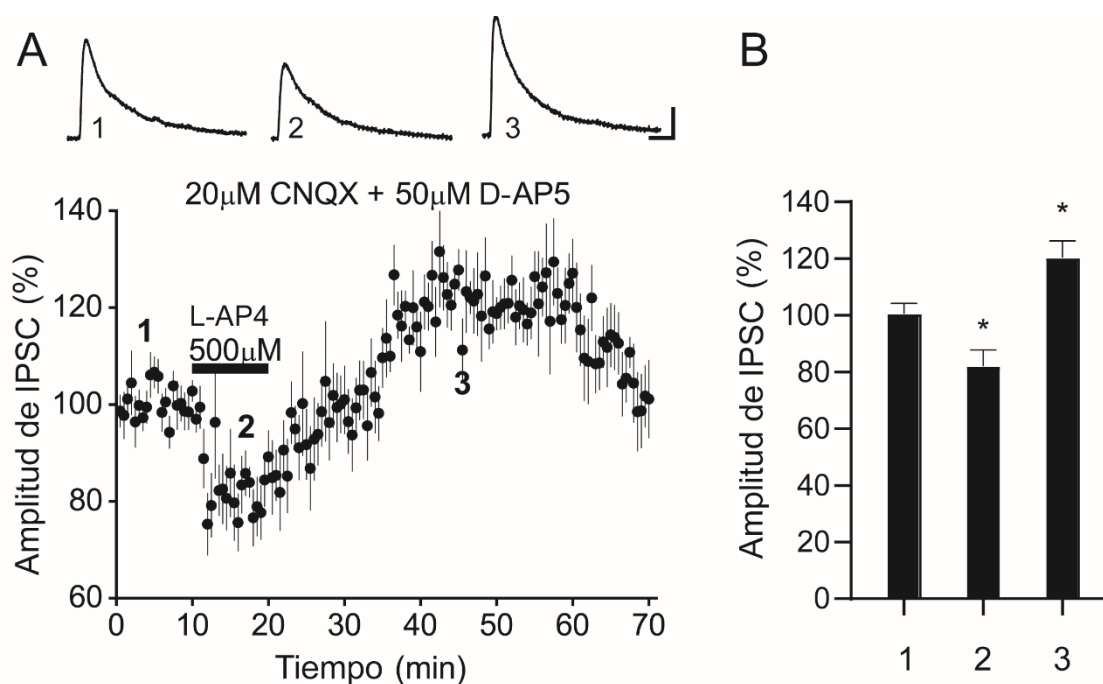


Figura 32. La modulación bidireccional inducida por L-AP4 no se afecta por CNQX ni D-AP5. **A**, La aplicación de L-AP4 (500µM, 10min) primero reduce y luego incrementa la amplitud de los IPSCs en presencia de los antagonistas de los receptores AMPA y NMDA (CNQX 20µM y D-AP5 50µM, respectivamente, añadidos 30 minutos antes de la aplicación de L-AP4). **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los IPSCs inducidos por la aplicación de L-AP4 durante la inhibición (2) (n = 10 células/10 rodajas/6 ratones, *p < 0,05) y la potenciación (3) (*p < 0,05) en presencia de CNQX y D-AP5. Los valores representan la media ± SEM de 20 trazos consecutivos. Los datos se compararon con la condición basal previa a la adición de L-AP4 utilizando el test de t de Student no apareado. En **A** se muestran trazos representativos de los IPSC. Escala: 100 pA y 25 ms. Los datos mostrados en las gráficas representan el porcentaje de los IPSC normalizados con la condición basal.

4.3.2. La respuesta de inhibición mediada por L-AP4 es suprimida por el inhibidor de proteínas $G_{i/o}$ toxina *pertussis* y la respuesta de potenciación por el bloqueante de la unión de DAG calfoestina C

El efecto inhibitor del receptor mGlu7 en la transmisión excitadora depende de la activación de proteínas $G_{i/o}$ y la subsiguiente inhibición de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje. Por otro lado, el efecto potenciador que mGlu7 ejerce sobre la transmisión sináptica excitadora se debe a una vía de señalización que requiere la activación de PLC y la activación de las proteínas de la ZA Munc13 por la unión de DAG (Martín et al., 2010). Con estos precedentes, decidimos estudiar si la modulación bidireccional inducida por mGlu7 de la transmisión sináptica inhibitora también involucraba estas mismas vías de señalización. Primero utilizamos toxina *pertussis* para

inhibir las proteínas $G_{i/o}$ a la vez que aplicábamos L-AP4 a alta concentración (500 μ M, 10 min) y comprobamos que se perdía la inhibición de los IPSCs (del $98,65 \pm 4,79$ % al $102,84 \pm 7,70$ %), mientras que la potenciación se mantuvo (del $98,65 \pm 4,79$ % al $128,80 \pm 9,29$, Fig. 33A, B). A continuación, utilizamos el bloqueante de la unión de DAG a sus proteínas diana, calfoestina C, en combinación con el L-AP4, lo cual nos permitió ver que la inhibición de los IPSCs se desarrollaba con normalidad (del $100,00 \pm 3,70$ % al $75,1 \pm 4,4$ %,) pero no se observaba la respuesta de potenciación (del $100,00 \pm 3,70$ % al $89,5 \pm 9,1$ %, Fig. A B). Estos experimentos demuestran que, al igual que en las sinapsis excitadoras, las proteínas $G_{i/o}$ son necesarias para la respuesta inhibitora del receptor mGlu7, mientras que la respuesta potenciadora depende de la señalización mediada por DAG.

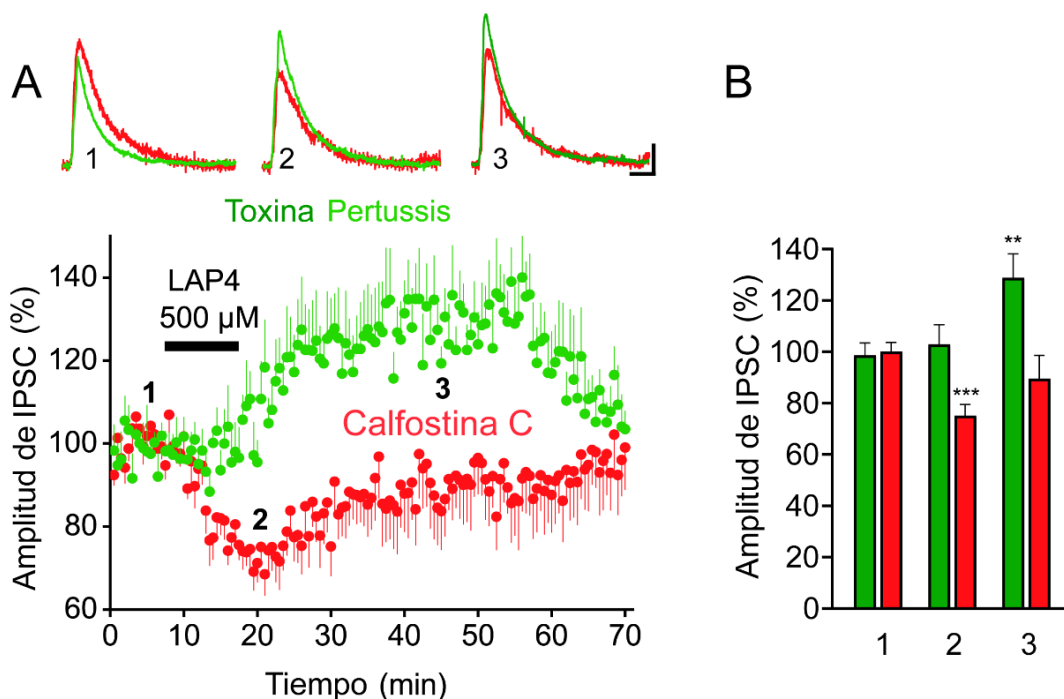


Figura 33. La inhibición de la transmisión sináptica GABAérgica mediada por L-AP4 fue suprimida por la toxina *pertussis*, mientras que la potenciación fue bloqueada calfoestina C. **A**, La aplicación de L-AP4 (500 μ M, 10 min) no inhibe la amplitud de los IPSCs en presencia de toxina *pertussis* (2 μ g/mL durante 2 - 4 h a 30°C antes de la aplicación de L-AP4) y no aumenta la amplitud de los IPSCs en presencia de Calfoestina C (0,1 μ M, 30 minutos antes de la adición de L-AP4). **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los IPSCs inducidos por la aplicación de L-AP4 durante la inhibición (2) y durante la potenciación (3) en presencia de toxina *pertussis* (n = 10 células/10 rodajas/4 ratones, 2: p > 0,05, 3: **p < 0,01) o de calfoestina C (n = 14 células/14 rodajas/4 ratones, 2: ***p < 0,001, 3: P > 0,05). Los datos mostrados en **A** representan la media \pm SEM de 20 IPSCs consecutivos. Los datos mostrados en **B** representan la media \pm SEM y se compararon con las condiciones basales antes de la aplicación de L-AP4 y utilizando el test de t de Student no apareado. Los trazos en **A** muestran trazos representativos. Escala: 100 pA y 25 ms. Los datos muestran la media \pm SEM.

Resultados

4.3.3. El tratamiento con L-AP4 aumenta la frecuencia pero no la amplitud de los IPSCs en ratones WT pero no en ratones mGlu7^{-/-}

Para confirmar el origen presináptico de la modulación causada por mGlu7 analizamos los cambios en la frecuencia de los mIPSCs en presencia del bloqueante de canales de sodio dependientes de voltaje tetrodotoxina (TTx, 1 μ M). La incubación con L-AP4 causó un aumento en la frecuencia de los mIPSCs en ratones WT (de $5,24 \pm 0,28$ Hz a $6,316 \pm 0,398$, Fig. 34A, B, C) que no se dio en sus hermanos de camada mGlu7^{-/-} (de $6,37$ Hz $\pm 0,22$ a $6,06 \pm 0,22$ Hz, Fig. 34F, G, H). Además, L-AP4 produjo un descenso significativo de la duración de los intervalos inter-evento (IIE) de los mIPSCs en ratones WT (Fig. 34D) sin afectar a su amplitud media (de $23,91 \pm 1,05$ pA a $21,43 \pm 1,01$ pA, Fig. 34E) mientras que en los ratones mGlu7^{-/-} no se vio afectada ni la duración de los IIEs (Fig. 34I) ni la amplitud de los mIPSCs (de $22,56 \pm 0,72$ pA a $20,65 \pm 0,55$ pA, Fig. 34J) de los mismos. Estos experimentos demuestran que la potenciación mediada por L-AP4 de la transmisión sináptica inhibitora se debe a mecanismos presinápticos. La inhibición mediada por mGlu7 no se ve reflejada en el análisis de los mIPSCs debido a que los VGCCs no están activos en presencia de TTx.

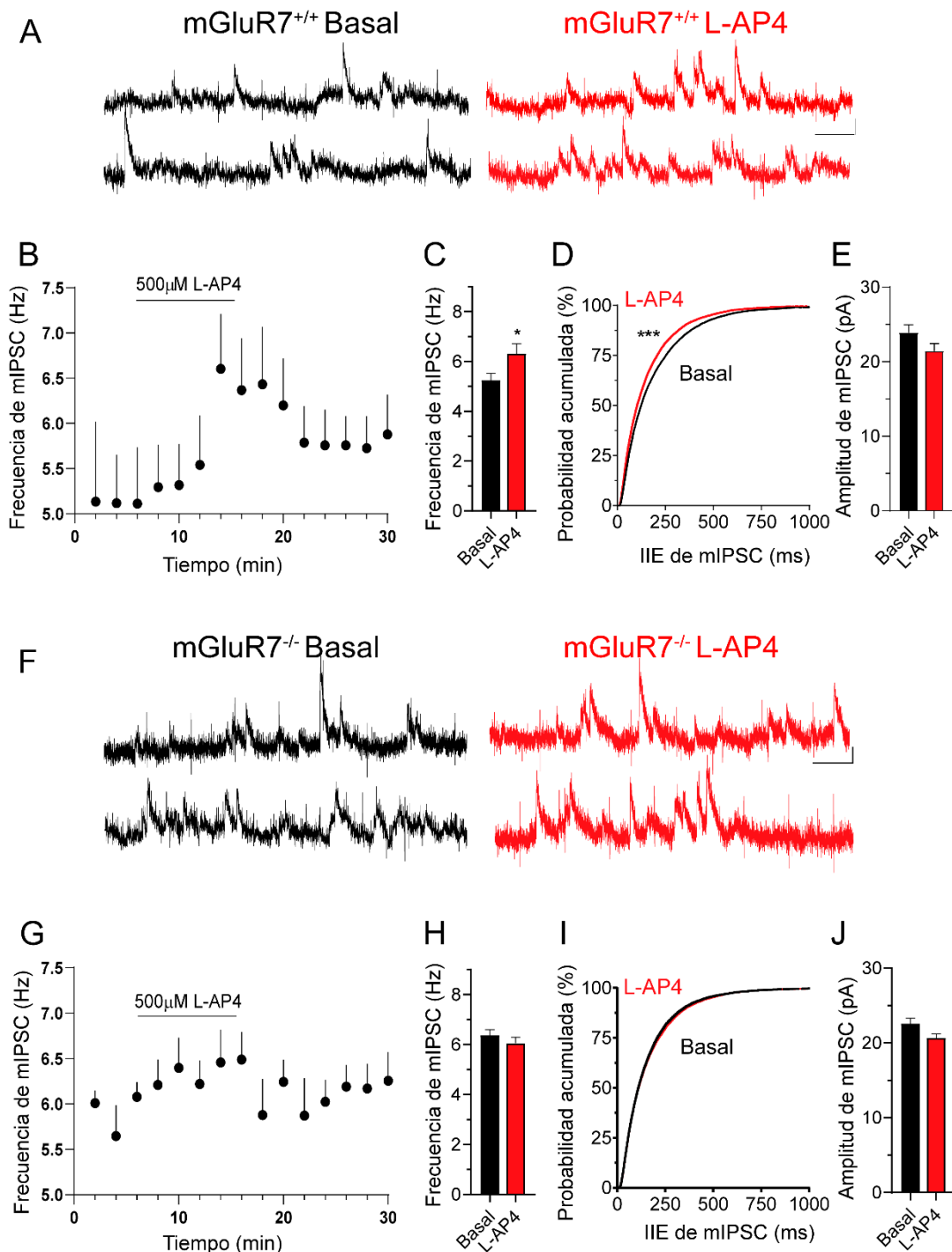


Figura 34. La aplicación de L-AP4 aumenta la frecuencia pero no la amplitud de los mIPSCs en ratones WT pero no en sus hermanos mGluR7^{-/-}. **A**, L-AP4 (500 μM, 10 min) aumentó la frecuencia media de IPSCs en ratones WT (**A**, **B**) pero no en sus hermanos mGluR7^{-/-} (**F**, **G**). Cuantificación de los cambios en la frecuencia de los mIPSC antes y después de la aplicación de L-AP4. La frecuencia media de los mIPSCs 4 minutos antes y durante la aplicación de L-AP4 en ratones WT (**C**, n = 8 células/8 rodajas/5 ratones, *p < 0,05) y en ratones mGluR7^{-/-} (**H**, n = 7 células/7 rodajas/5 ratones, p > 0,05). Efecto de la aplicación de L-AP4 en la probabilidad acumulada de los intervalos interevento (IIE) en ratones WT (**D**, ***p < 0,001) y mGluR7^{-/-} (**I**, p > 0,05). Media de la amplitud de los IPSCs 4 min antes y durante la aplicación de L-AP4 en ratones WT (**E**, n = 8 células/8 rodajas/5 ratones, p > 0,05) y en ratones mGluR7^{-/-} (**J**, n = 7 células/7 rodajas/5 ratones, p > 0,05). Los datos se compararon con la condición basal antes de la aplicación de L-AP4 utilizando el test de t de Student no apareado en **C**, **D**, **H**, **J** o el test de Kolmogorov-Smirnov en **D**, **I**. Los valores representan la media ± SEM. **A**, **F** representan trazos ejemplo registrados antes y después de la exposición a L-AP4 (500 μm, 10 min) en ratones WT (**A**) y en mGluR7^{-/-} (**F**). Escala: 10 pA y 100 ms. Los datos muestran la media ± SEM.

Resultados

4.3.4. El tratamiento con L-AP4 aumenta el número de VSs en contacto con la membrana de la ZA en sinapsis simétricas axo-somáticas en la capa piramidal de CA1, esta respuesta no se da en ratones mGlu7^{-/-}.

La naturaleza presináptica de la modulación por mGlu7 concuerda con estudios anteriores en las sinapsis glutamatérgicas en las cuales se observó que la potenciación de la liberación de NT requería aumento en el número de vesículas ancladas a la membrana de la ZA (Martín et al., 2018). Con el fin de estudiar si la potenciación mediada por mGlu7 de la transmisión inhibitoria también estaba asociada a incrementos del anclaje vesicular, analizamos la distribución de VSs de sinapsis inhibitorias mediante experimentos de microscopía electrónica funcional en rodajas similares a las que usamos en electrofisiología. Para asegurarnos de que las sinapsis analizadas fuesen GABAérgicas, además de escoger sólo sinapsis asimétricas, también seleccionamos aferencias axo-somáticas sobre neuronas piramidales, ya que solamente provienen de neuronas de GABAérgicas, fundamentalmente de neuronas PV de la región CA1 del hipocampo (Pelkey et al., 2017), donde se ha descrito el papel modulador de mGlu7 (Klar et al., 2015).

La incubación de las rodajas con L-AP4 (500 μ M, 10 min) aumentó el promedio de vesículas a menos de 5 nm de la membrana de la ZA en las sinapsis de ratones WT (de $1,71 \pm 0,20$ a $2,57 \pm 0,16$, Fig. 35A, B, E), mientras que en las sinapsis de sus hermanos mGlu7^{-/-} no se vio este efecto (de $1,81 \pm 0,16$, a $1,83 \pm 0,25$ Fig. 35C, D, F). Para confirmar que estos cambios se debían a una redistribución efectiva de las distintas poblaciones de VSs se comprobó que el tratamiento con L-AP4 no cambiaba el número de VSs totales en los terminales de ratones WT ($p > 0,05$, test de t de Student) ni de ratones mGlu7^{-/-} ($p > 0,05$, test de t de Student). Estos resultados indican que la potenciación de la transmisión sináptica inhibitoria mediada por mGlu7 requiere de un aumento en el número de VSs ancladas mediante un complejo SNARE totalmente ensamblado.

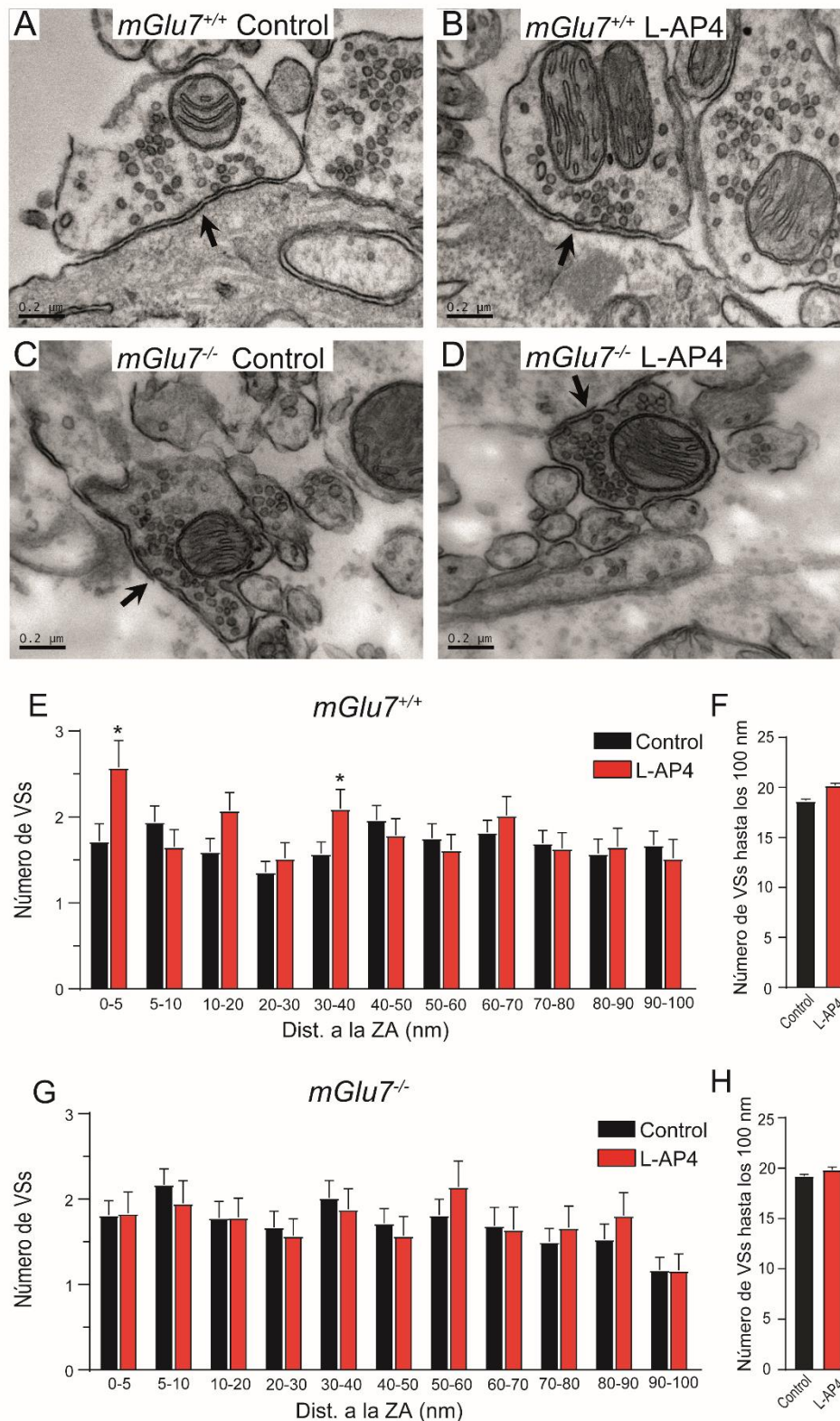


Figura 35. L-AP4 (500 μ M, 10 min) aumenta el número de VSs ancladas la membrana de la ZA en sinapsis simétricas de ratones WT pero no en *mGlu7^{-/-}*. Imágenes de micrografías electrónicas de sinapsis simétricas axosomáticas de la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo de ratón WT (A, B) y *mGlu7^{-/-}* (C, D). Efecto del L-AP4 en la distribución de VS: E, WT (Basal: n = 89 sinapsis/ 5 rodajas y L-AP4: 52 sinapsis/5 rodajas/ 3 ratones, 0 – 5 nm: *p < 0,05, 30 – 40 nm: * p < 0,05) y G, en ratones *mGlu7^{-/-}* (Basal: N = 64 sinapsis/5 rodajas, L-AP4: n = 42 sinapsis/3 rodajas/ 3 ratones, 0 – 5 nm: p > 0,05). Cuantificación del número de vesículas totales en los 100 primeros nm desde la ZA en las sinapsis de ratón WT (F) (p > 0,05) y *mGlu7^{-/-}* (H) (p > 0,05). Para las comparaciones estadísticas se utilizó el test de t de Student no apareado. Escala: 100 nm. Los valores representan la media \pm SEM.

Resultados

4.3.5. La estimulación a alta frecuencia de las Colaterales de Schaffer induce una modulación bidireccional de la transmisión sináptica inhibitora dependiente de mGlu7

Debido a la baja afinidad del receptor mGlu7 por el glutamato, parece razonable pensar que la activación de heteroreceptores mGlu7 en terminales GABAérgicos se restrinja a situaciones en las cuales se libere una gran cantidad de glutamato. Para lograr estas condiciones aplicamos en las colaterales de Schaffer estimuciones de alta frecuencia (HFS) (2 trenes de 50 Hz durante 1 s separados por 20 s). La estimulación provocó un aumento en la amplitud de los IPSCs (de $100,47 \pm 4,20$ % a $164,76 \pm 16,74$ %, Fig. 36A, B) que fue bloqueado con el antagonista del grupo III de receptores metabotrópicos 2-Metil-O-fosfonoserina (MSOP, 200 μ M, >30 min) (de $100,00 \pm 3,41$ % a $102,05 \pm 11,39$ %, Fig. 36A, B). Como ya hemos observado, la potenciación mediada por mGlu7 requiere la señalización mediada por DAG. El bloqueo de la unión de DAG a sus proteínas diana, con Calfofostina C, eliminó el efecto potenciador y, en su lugar, permitió observar un efecto inhibitor con la misma cinética que el potenciador pero de menor magnitud (de $100,00 \pm 4,02$ % a $76,79 \pm 8,13$ %, Fig. 36A, B).

Para comprobar la naturaleza presináptica de estas respuestas realizamos el análisis de la PPR. En el caso de la potenciación, observamos una disminución de la PPR (de $0,95 \pm 0,02$ a $0,52 \pm 0,06$, Fig. 36C, D) mientras que en los experimentos en presencia de calfofostina C observamos un aumento de la PPR (de $0,79 \pm 0,01$ a $1,10 \pm 0,03$, Fig. 36C, D) y ambos cambios se bloquearon en presencia de MSOP (de $0,80 \pm 0,01$ a $0,79 \pm 0,04$, Fig. 36C, D). Estos experimentos demuestran que, al igual que ocurría en las sinapsis SC-CA1 (Martín et al., 2018), durante una activación fisiológica de mGlu7 (por glutamato liberado sinápticamente) tiene lugar una modulación bidireccional de la transmisión sináptica inhibitora en la que predomina la respuesta potenciadora, que es de mayor magnitud y contrarresta la respuesta inhibitora.

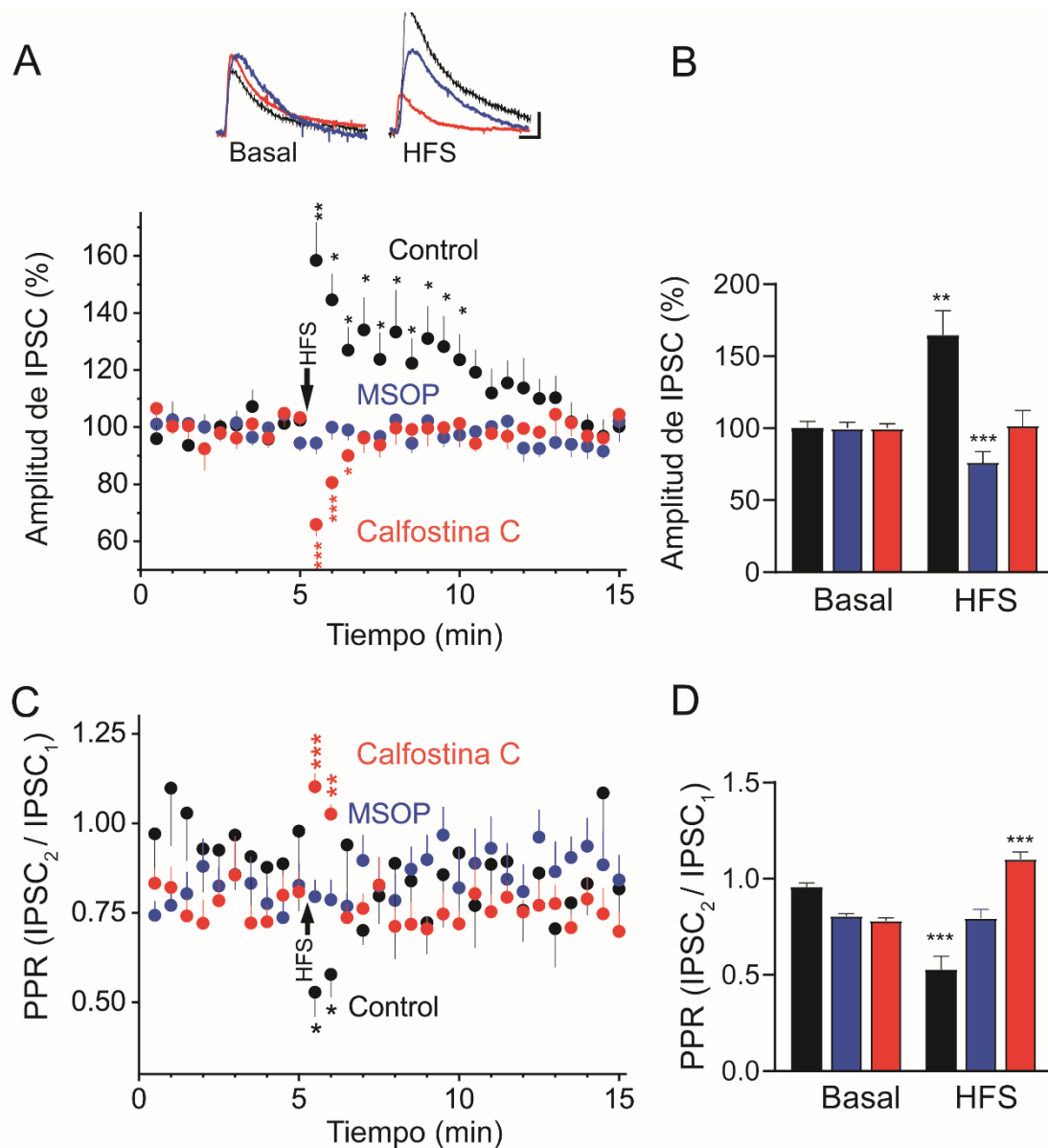


Figura 36. La estimulación de alta frecuencia de las colaterales de Schaffer induce una modulación bidireccional sensible a MSOP y a calyculin A. **A**, Cambios en la amplitud de los IPSCs inducidos por dos trenes (1s a 50 Hz cada 20 s) en rodajas control (no tratadas: n = 10 células/10 rodajas/5 ratones), en rodajas tratadas con el antagonista de los receptores mGlu del grupo III MSOP (200 μ M, 30 min antes de la estimulación, n = 12 células/12 rodajas/8 ratones) o Calyculin A (0,1 μ M, 30 min antes de la estimulación, n = 10 células/ 10 rodajas/6 ratones). **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los IPSC normalizados a valores previos a la estimulación en la condición control (**p < 0,01), en rodajas tratadas con MSOP (p > 0,05) y en rodajas tratadas con Calyculin A (**p < 0,001). **C**, Cambios en la PPR (IPSC₂/IPSC₁, 200 ms ISI). **D**, Cuantificación de los cambios en la PPR normalizados a los valores previos a la estimulación en la condición control (**p < 0,001), en presencia de MSOP (p > 0,05) o de Calyculin A (**p < 0,001). Las comparaciones se hicieron utilizando el test de t de Student no apareado. **A**, trazos representativos. Escala: 100 pA y 25 ms. Los valores representan la media \pm SEM.

Resultados

Para confirmar que la modulación observada estaba causada por el receptor mGlu7 repetimos el protocolo de estimulación de alta frecuencia en rodajas de un ratón *mGlu7^{-/-}* y, efectivamente, observamos en estos animales no se observaba ni potenciación ni inhibición de la transmisión sináptica inhibitora (de $99,45 \pm 5,54$ % a $91,42 \pm 4,30$ %, $n = 10$, $p > 0,05$, test de t de Student, Fig. 37B) mientras que en sus hermanos de camada WT sí se observó una potenciación significativa de la transmisión sináptica GABAérgica (de $100,66 \pm 5,02$ % a $139,77 \pm 5,69$ %, $n = 9$, $p < 0,001$, test de T de Student).

Estos resultados sugieren que la activación fisiológica del receptor en estados de sobreestimulación de las colaterales de Schaffer, prevalece la potenciación de la liberación de GABA, lo que restablecería el balance excitación/inhibición en el hipocampo y, por tanto, explicaría el papel antiepiléptico descrito para este receptor (Sansig et al., 2001; Zhang et al., 2008).

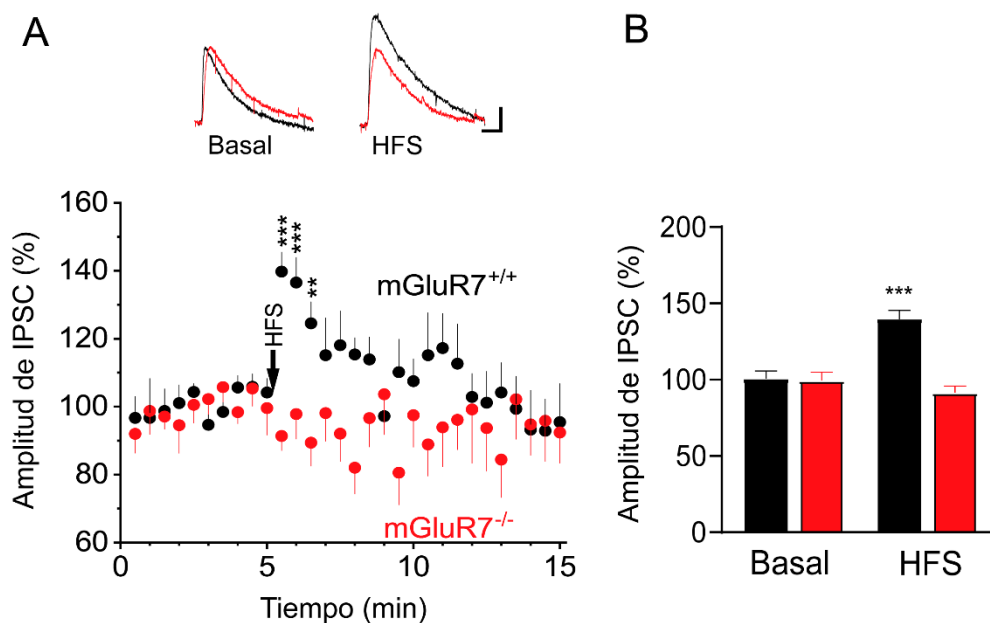


Figura 37. La estimulación de alta frecuencia de las colaterales de Schaffer no induce una modulación de la transmisión sináptica en los ratones *mGlu7^{-/-}*. **A**, Cambios en la amplitud de los IPSCs inducidos por dos trenes (1s a 50 Hz cada 20 s) en rodajas de ratones WT ($n = 9$ células/9 rodajas/5 ratones) o de ratones *mGlu7^{-/-}* ($n = 10$ células/10 rodajas/6 ratones). **B**, Cuantificación de los cambios en la amplitud de los IPSCs normalizados a valores previos a la estimulación en ratones WT (** $p < 0,001$) o *mGlu7^{-/-}* ($p > 0,05$). Los datos fueron comparados utilizando el test de t de Student apareado. Los trazos en A son trazos representativos. Escala: 100 pA y 25 ms. Los valores representan la media \pm SEM.

Discusión

5. Discusión

5.1. Los β_1 -ARs de las PF potencian la liberación de NT mediante un incremento del tamaño de la RRP y de la probabilidad de liberación mediado por Epac2, que es necesario para la PF-PC LTP

5.1.1. La activación de β_1 -ARs es necesaria para la PF-PC LTP

La potenciación mediada por cAMP es una forma de plasticidad sináptica común entre los animales y asociada a procesos de aprendizaje y memoria (Castillo, 2012; Kandel, 2001). La modulación noradrenérgica está implicada en la inducción de esta forma de plasticidad en corteza (Huang et al., 1996) y en hipocampo (Huang & Kandel, 1996) mediante la activación de los receptores β -ARs. Estudios anteriores habían descrito la presencia de fibras noradrenérgicas próximas a las sinapsis entre las PF y las PC (Abbott & Sotelo, 2000), donde ya se había descrito una potenciación por cAMP de la liberación de NT en las PF (Salin et al., 1996). Sin embargo, se desconocía la importancia fisiológica de los receptores β -ARs en esta sinapsis. En este trabajo se ha encontrado la expresión de receptores β_1 -ARs en terminales sinápticos de las PF cercanas a fibras noradrenérgicas (Fig. 3). La potenciación presináptica inducida por noradrenalina o isoproterenol y sensible al antagonista específico de los receptores β_1 -adrenérgicos, metoprolol, (Fig. 1A y 2A) demuestra que estos receptores tienen una importancia fisiológica en la modulación de esta sinapsis. Es más, en este trabajo se describe, por primera vez, que la activación de los receptores β -ARs explica la potenciación observada en la LTP de las PF-PC en su totalidad (Fig. 8 y 10A). Este hallazgo concuerda con trabajos previos del laboratorio en los que se ha descrito que los receptores β -ARs aumentan la concentración de cAMP y potencian la liberación en sinaptosomas de corteza cerebral (Ferrero et al., 2013, 2016; Herrero & Sánchez-Prieto, 1996), con estudios que demuestran que la activación de los receptores β -ARs recapitulan parte de la potenciación de la liberación inducida por cAMP en experimentos *in vitro* (Huang et al., 1996; Huang & Kandel, 1996) y con estudios que demuestran que la noradrenalina aumenta la excitabilidad de las PC por un aumento de la actividad de las PF (Guo et al., 2016).

La potenciación presináptica mediada por cAMP depende de la activación de adenilato ciclasas estimuladas por Ca^{2+} /CaM (Ca-AC), entre las que se encuentran la

Discusión

AC1 y AC8 (Storm et al., 1998; Wang et al., 2003). En el cerebelo se encuentran ambas, sin embargo, se ha visto que la activación de AC1 representa el 66% de la actividad adenilil ciclasa mediada por Ca^{2+} en el cerebelo y su delección, mediante ingeniería genética, provoca el bloqueo de la LTP presináptica de las PF (Storm et al., 1998). AC1 presenta cuatro dominios de unión a Ca^{2+} (Iida & Potter, 1986) y puede activarse por incrementos moderados, pero mantenidos en el tiempo, de la concentración de Ca^{2+} (Wayman et al., 1994). Además, la interacción con la subunidad $G_{\alpha s}$ unida a GTP colabora sinérgicamente junto con el Ca^{2+} en su activación (Sadana & Dessauer, 2009; Wayman et al., 1994) y aumenta la síntesis de cAMP.

En línea con el papel de AC1 en la LTP de PF-PC, la inducción de esta LTP requiere la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular (Salin et al., 1996). En otro trabajo encuentran que la inducción de la LTP puede bloquearse por pequeñas disminuciones en el Ca^{2+} extracelular (Myoga & Regehr, 2011). Aunque esta disminución de Ca^{2+} afecta al incremento global del Ca^{2+} presináptico, parece que la LTP depende, específicamente, de la entrada de Ca^{2+} por VGCCs de tipo R. A pesar de que la contribución de estos canales al Ca^{2+} global del terminal sináptico es de tan solo el 9%, su bloqueo farmacológico bloquea completamente la LTP, mientras que el bloqueo de los canales de tipo P/Q, por los cuales entra un 50 % del Ca^{2+} total, no afecta a la inducción de la LTP. Este papel determinante que los VGCCs de tipo R juegan en la PF-PC LTP podría explicarse también si éstos estuvieran controlando la liberación en los terminales noradrenérgicos. Por tanto, el protocolo de inducción de frecuencia moderada utilizado en este trabajo (10 Hz durante 10s) puede estar, por un lado, provocando aumentos locales en la concentración de Ca^{2+} por la activación de los canales R (ya sea en las PF o en los terminales noradrenérgicos) y, por otro lado, provocando la liberación de noradrenalina de las fibras noradrenérgicas y, consecuentemente, activando a los receptores β_1 -ARs, cuya subunidad $G_{\alpha s}$ estaría actuando conjuntamente con el Ca^{2+} para activar AC1. Es más, con el protocolo de inducción utilizado y con la concentración de Ca^{2+} extracelular establecida, la activación del receptor β_1 -AR es necesaria para la inducción de la PF-PC LTP (Fig. 8), demostrando de nuevo la implicación de estos receptores en este proceso plástico.

5.1.2. La PF-PC LTP depende de la activación de Epac2 en las PF

La potenciación presináptica mediada por cAMP se ha estudiado en múltiples sinapsis mediante el uso del activador de la AC, Forskolina, (Chen & Regehr, 1997; Huang & Hsu, 2006b) y se ha descrito que implica un aumento en la liberación de neurotransmisor debido a un aumento en el tamaño de la RRP y en la probabilidad de fusión de las vesículas. Las tres principales proteínas activadas por cAMP son: la proteína quinasa PKA, el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Epac y los canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos; siendo Epac y PKA dos proteínas implicadas en varias vías de señalización y capaces de desencadenar multitud de respuestas. Aunque inicialmente se propuso que la activación de PKA era necesaria para la LTP presináptica mediada por cAMP de las PF (Linden & Ahn, 1999), estudios posteriores, que utilizaron fármacos activadores específicos de Epac, describieron que esta proteína está implicada en la potenciación presináptica en respuesta a forskolina, en las sinapsis del SNC (Gekel & Neher, 2008), mediante la modulación de la maquinaria exocitótica (Ferrero et al., 2013), obligando a reconsiderar cual es la proteína efectora implicada en esta potenciación. Los datos obtenidos en este trabajo con los inhibidores de PKA, H-89 y KT5720, rechazan la hipótesis de que PKA sea necesaria para la LTP de las PF-PC (Fig. 9) y en la potenciación mediada por la activación de los receptores β -ARs (Fig. 4). Por otro lado, los experimentos con el activador de Epac, 8-pCPT, demuestran que la activación de esta proteína explica la totalidad de la potenciación observada en la LTP (Fig. 10C), así como la totalidad de la potenciación observada al activar los receptores β -ARs (Fig. 4). Es importante señalar que varios estudios anteriores, que intentaron demostrar la implicación de PKA en esta LTP, utilizaron modelos *in vitro*, como cultivos de neuronas granulares (Linden & Ahn, 1999; Lonart et al., 2003) que pueden tener unas propiedades funcionales distintas a las de sinapsis de rodajas de cerebelo. Por otro lado, los experimentos que se realizaron en rodajas utilizaron el inhibidor de PKA, Rp-8-CPT-cAMPs, (Salin et al., 1996), un compuesto que hoy se sabe que también inhibe a las proteínas Epac (Chen et al., 2014; Zieba et al., 2011). Además, la importancia de Epac en la plasticidad presináptica se ha descrito en otros modelos de potenciación presináptica, como la de las fibras musgosas (Fernandes et al., 2015) y las colaterales de Schaffer (Yang et al., 2012), así como en otras potenciaciones postsinápticas (Gutierrez-Castellanos et al., 2017).

Discusión

De las dos variantes de Epac (Epac1 y 2) las isoformas Epac2A1 y Epac2A2 presentan una expresión específica de cerebro (Hoivik et al., 2013), mientras que Epac1 se expresa de manera ubicua. Aunque tanto Epac1 como Epac2 presentan dominios de unión a cAMP muy conservados y realizan funciones similares en múltiples procesos fisiológicos (Cheng et al., 2008), estudios previos han demostrado que Epac2 es necesaria para la LTP dependiente de cAMP en las fibras musgosas de hipocampo (Fernandes et al., 2015). En esta tesis se ha demostrado que el inhibidor específico de Epac2, ESI-05, (Rehmann, 2013) impide el desarrollo de la potenciación mediada por isoproterenol (Fig. 4), y que en los ratones Epac2 KO el protocolo de 10 Hz es incapaz de inducir la LTP de las PF-PC (Fig. 11). Estos datos demuestran que Epac2 es necesaria para la potenciación de la liberación de NT en las PF.

5.1.3. La PF-PC LTP se asocia a un incremento del número de VSs ancladas a la ZA, del tamaño de la RRP y de la probabilidad de liberación, probablemente mediados por proteínas Munc13

Epac es una proteína perteneciente a los factores de intercambio de nucleótidos de guanina o GEF, cuya función principal es la activación de las proteínas pertenecientes a la superfamilia de GTPasas pequeñas relacionadas con Ras, Rap1 y 2, mediante la facilitación del intercambio de una molécula de GDP por una molécula de GTP (Rehmann et al., 2010). Rap actúa en múltiples vías de señalización como la de las quinasas activadas por mitógenos (MAP del inglés *Mitogen-activated Protein Kinases*) y la vía de mTOR, siendo importante en la citoarquitectura, la proliferación y apoptosis celular, la carcinogénesis y la exocitosis (Lee, 2021). De mayor relevancia para la modulación de la liberación de neurotransmisor, la activación de Rap2B por Epac produce un aumento en la síntesis de DAG mediado por PLC ϵ (Evellin et al., 2002), que está implicado en la plasticidad presináptica (Ferrero et al., 2013). En preparaciones de sinaptosomas de corteza cerebral se observa que la activación de receptores β -ARs causa un aumento en la síntesis de DAG, que induce la translocación de la proteína Munc13-1 a la membrana y provoca un aumento en la liberación de glutamato mediado por un incremento en el número de VSs ancladas a la membrana (Ferrero et al., 2013). Este aumento se explica porque Munc13 está implicada en la creación de nuevos sitios de liberación de vesículas. Sakamoto et al., 2018 demostraron que Munc13-1 se ensambla en estructuras supramoleculares en la membrana, se une a las proteínas Rim1 y Rab3

y recluta los complejos syntaxina-1/Munc18-1, formando microdominios proteicos. En estos dominios se favorecerá la apertura de la syntaxina-1 y el reclutamiento de complejos SNARE funcionales, que mediarán la fusión de las VSs. Munc13 presenta múltiples sitios de regulación por distintos segundos mensajeros, entre los que se encuentra un dominio C1 que le permite ser regulada por DAG y ésteres de forbol (Shen et al., 2005). El aumento de DAG, y su unión al dominio C1, puede reclutar a Munc13, dando lugar a un aumento en las vesículas ancladas (Bauer et al., 2007; Martín et al., 2010). En concordancia con estos resultados, en este trabajo hemos confirmado, mediante microscopía electrónica, que la activación de los receptores β -ARs de las PF provoca un aumento en el número de vesículas ancladas a una distancia de 0 – 5 nm de la membrana de la zona activa, que no ocurre en los ratones *Epac2KO* (Fig. 13). Las vesículas situadas a menos de 5 nm de la membrana plasmática, en experimentos de microscopía electrónica, se correlacionan con un estado de *anclado/cebado* denominado *tightly docked* (Neher & Brose, 2018). Para superar las fuerzas de repulsión hidrofóbica que se generan entre la membrana de las vesículas y la membrana de la zona activa, estas vesículas presentan un complejo SNARE en un estado de *supercebado*, que requiere la unión de DAG al dominio C1 de Munc13 o Ca^{2+} a su dominio C2B (Palfreyman & Jorgensen, 2017; Papantoniou et al., 2023). Las vesículas en este estado tendrán una mayor probabilidad de fusionarse con la llegada de un potencial de acción, explicando así la potenciación de la liberación observada. De manera que la activación de los receptores β -ARs provoca un aumento en el número de vesículas ancladas (< 5 nm) a la membrana y con mayor probabilidad de liberación mediante una vía de señalización dependiente de Epac2, posiblemente mediante la generación de DAG y la activación de Munc13.

Sin embargo, la microscopía electrónica tiene ciertas limitaciones ya que ofrece una imagen estática de una sección de la sinapsis y la fijación química empleada puede alterar la distribución de vesículas sinápticas (Maus et al., 2020) , mientras que otras técnicas de fijación, como la congelación a altas presiones, preservan mejor la ultraestructura sináptica (Rostaing et al., 2006). Además, aunque las vesículas ancladas correlacionan con el tamaño de la RRP (Schikorski & Stevens, 2001), no todas las vesículas ancladas se fusionan con un potencial de acción, mientras que hay vesículas que no están ancladas que sí se fusionan (Kaeser & Regehr, 2017). De manera que, para tener una aproximación de mayor relevancia funcional de la modulación de la liberación por Epac2, se realizaron experimentos

Discusión

de electrofisiología donde se aplicó un tren de 40 Hz para estimar el tamaño de la RRP y p_{ves} (probabilidad de fusión de una vesícula determinada en respuesta a un potencial de acción). En estos experimentos comprobamos que el protocolo de inducción de la LTP de las PF-PC provocaba un aumento considerable en la RRP, que no ocurría en las rodajas de ratones *Epac2^{-/-}* (Fig. 14). Sin embargo, también encontramos que esta LTP implicaba una disminución en la p_{ves} . Esto contrasta con la bibliografía previa, donde se ha descrito que, tanto la potenciación mediada por cAMP (Yao & Sakaba, 2010), como la modulación de la liberación mediada por noradrenalina (Yawo, 1999), así como la activación de Munc13 con DAG (Palfreyman & Jorgensen, 2017) implican un aumento en este parámetro. Además, en el presente trabajo se ha observado una disminución de la PPR por la noradrenalina, por el isoproterenol, por 8pCPT y por el protocolo de inducción de la LTP, que no solamente indica un proceso plástico de naturaleza presináptica, sino también un aumento en la p_{ves} (Branco & Staras, 2009). Una de las posibles causas de la disminución de la p_{ves} observada puede deberse a una limitación en la aproximación metodológica empleada para calcularla. La RRP está compuesta por un porcentaje pequeño de las vesículas disponibles en la sinapsis. Durante estimulaciones sostenidas, estas vesículas de la RRP son repuestas a partir de una población vesicular distinta denominada población de reciclaje o población intermedia. La transición de las vesículas de la población de reciclaje a la RRP requiere su aproximación a la membrana y los procesos de anclaje y cebado en los que estarán implicadas proteínas como Munc13 y SNAP25 (Papantoniou et al., 2023). A su vez, experimentos basados en medidas funcionales hipotetizan que las vesículas que ingresan en esta población de reciclaje proceden de una tercera población vesicular denominada de reserva o directamente requieren la endocitosis de las vesículas fusionadas, estableciendo así dos poblaciones por las que las vesículas deben pasar para poder ingresar en la RRP y poder fusionarse, cada una con una velocidad de reposición distinta (Guo et al., 2015). Durante estimulaciones de alta frecuencia, la unión de Ca^{2+} y PIP_2 al dominio C₂B de Munc13 favorece la velocidad en el proceso de cebado vesicular, produciendo un aumento en la tasa de reposición de la RRP desde la población de reciclaje y reduciendo la depresión a corto plazo (Lipstein et al., 2021). Sin embargo, una estimulación sostenida puede causar la depleción de esta población de reciclaje, produciendo un retraso mayor en la reposición de las vesículas de la RRP, lo que concuerda con otros estudios donde se han descrito dos componentes de liberación, uno rápido y uno lento, durante una estimulación de

alta frecuencia mantenida (Miki et al., 2018). De esta manera, la velocidad de reposición podría ser mucho mayor al comienzo del protocolo de 40 Hz utilizado, que la que finalmente se calcula extrapolando la línea generada por el estado estacionario alcanzado en la parte final del protocolo de estimulación (Fig. 14C). Esto podría estar causando una sobreestimación de la RRP y, por lo tanto, una infraestimación de la p_{ves} , calculada como el cociente entre la amplitud media de seis EPSCs y el valor de la RRP en pA. Esta diferencia en la tasa de reposición no se apreciaría (y de hecho no se aprecia) al final del protocolo de 40 Hz, donde la velocidad de reposición está representada en mayor medida por el componente de reposición lento, que no depende de la actividad de Munc13 en el cebado vesicular. Esta variación entre el componente de reposición rápido y el lento podría estar más acentuada en las células en las que ocurre la LTP ya que, como se ha mencionado anteriormente, el aumento en DAG aumenta la cantidad de Munc13-1 en la membrana (Ferrero et al., 2013), lo que podría estar aumentando la velocidad de reposición dependiente de actividad. Por otro lado, el hecho de que el cálculo de p_{ves} dependa de la amplitud de los EPSCs hace que sea susceptible a errores en experimentos en los que el tamaño de la RRP puede variar, como es el caso. Esto se debe a que este cálculo asume que todas las VSs tienen la misma p_{ves} mientras que el valor de la RRP se calculó mediante el protocolo de 40 Hz que provoca la fusión de la totalidad de vesículas disponibles en las sinapsis, lo cual no permite distinguir entre vesículas con una mayor o menor p_{ves} , la fusión de vesículas en respuesta a un estímulo sí estará influenciada por esas diferencias en la p_{ves} , liberando preferentemente aquellas vesículas con una mayor p_{ves} . La base teórica que nos permite hipotetizar que estas nuevas vesículas, incorporadas a la RRP, pueden tener una distinta p_{ves} viene de estudios donde se demuestra que distintas isoformas de Munc13 (Chen et al., 2013), y en concreto, la isoforma Munc13-3, que se coexpresa con Munc13-1 en las PF, participan en el cebado de vesículas con una distinta p_{ves} (Ishiyama et al., 2014; Kusch et al., 2018). La base empírica de esta hipótesis se encuentra en los propios resultados obtenidos en este trabajo. Una evidencia experimental de que las nuevas vesículas incorporadas a la RRP no tienen la misma p_{ves} que las que formaban esta población antes de la inducción de la LTP está en la amplitud de los EPSCs en la Figura 8. Mientras el valor de la RRP, en las rodajas WT, se incrementa hasta, aproximadamente, el doble de su valor previo a la estimulación (de 4347,5 pA a 8586,9 pA, Fig. 14D), el incremento de la amplitud de los EPSCs es de aproximadamente el 50 % (del 99,7 % al 149,2%, Fig. 8B y 14A) y no del 100%,

Discusión

como cabría esperar en el caso de que las nuevas vesículas tuviesen la misma p_{ves} que las que había previamente. En el cebado de estas nuevas vesículas pueden estar implicados complejos de proteínas con una distinta proporción de las isoformas Munc13-1/Munc13-3, lo cual podría explicar la distinta p_{ves} de las nuevas vesículas. Sin embargo, esto no excluye que, en paralelo a este aumento de la RRP con vesículas con distinta p_{ves} , no haya ocurrido también un aumento de la p_{ves} . De hecho, teniendo en cuenta que la RRP en las rodajas WT se incrementa hasta aproximadamente el doble de su valor previo a la estimulación, si no hubiese un cambio en la p_{ves} de ninguna vesícula, el valor de p_{ves} debería reducirse a la mitad del valor previo a la estimulación (de 0,035 a \approx 0,0175). Sin embargo, el valor de p_{ves} después del protocolo de inducción de la LTP es de 0,025 (Fig. 14F), menor que antes de la inducción de la LTP, pero mayor de lo esperado según la fórmula para calcular la RRP en el caso de no haber un aumento en p_{ves} . Esto indica que, a pesar de la incorporación de nuevas vesículas menos susceptibles de ser liberadas, está ocurriendo un aumento en la p_{ves} de un grupo de vesículas (quizás formado en su mayoría por las vesículas que ya formaban parte de la RRP), que está aumentando la susceptibilidad de las PF a disparar en respuesta a una estimulación, y que está en concordancia con el aumento en la p_{ves} mediado por Munc13 en respuesta a un aumento de la concentración de DAG y Ca^{2+} (Palfreyman & Jorgensen, 2017). La existencia de varias poblaciones de vesículas con distintas propiedades de liberación en un mismo terminal no es de extrañar en el caso de las PF, ya que, aunque pueden asegurar una transferencia lineal de información durante estimulaciones de una frecuencia media, también son capaces de mantener unas frecuencias de disparo de hasta 1 kHz (Schmidt, 2019).

Una solución metodológica para poder apreciar este aumento en la probabilidad de liberación de neurotransmisor de las PF sería lograr registrar en una PC la respuesta de una única PF tras la estimulación y observar el aumento en la probabilidad de liberación después de la inducción de la LTP. Estos experimentos de estimulación mínima se realizan frecuentemente en sinapsis como SC-CA1 en hipocampo (Perea & Araque, 2007), pero son de elevada complejidad en las sinapsis entre las PF y las PC donde cada PC recibe aproximadamente 200.000 sinapsis de PFs (Isope & Barbour, 2002). Finalmente, debido a la gran proporción de sinapsis silentes entre las PF-PC, otro factor que podría estar implicado en los cambios

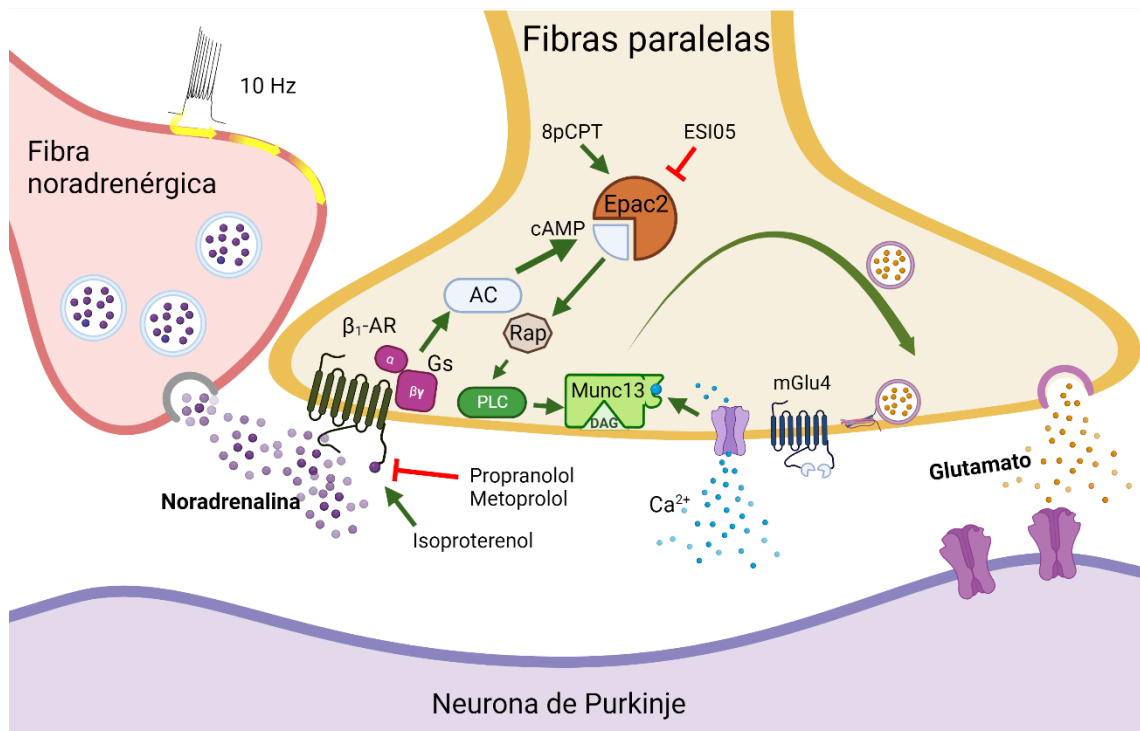
asociados a la PF-PC LTP descritos en esta tesis podría ser el reclutamiento de nuevas sinapsis (Ho et al., 2021).

La frecuencia de los aEPSCs nos permite obtener una estimación de la probabilidad de liberación de las sinapsis sin la interferencia de la actividad de Munc13 durante las estimulaciones de alta frecuencia. El aumento en la frecuencia de los aEPSCs inducido por el isoproterenol (Fig. 5C, D, E) y por la activación de Epac, con 8pCPT (Fig. 6C, D, E), indica que en la potenciación hay un aumento en la probabilidad de liberación de las sinapsis. Además, también se observa con el protocolo de inducción de la PF-PC LTP y depende de la proteína Epac2 (Fig. 12A, B, C). Este aumento en la probabilidad de liberación podría estar causado, o bien por un aumento en el número de vesículas listas para la fusión, o bien por un aumento en la p_{ves} de las vesículas existentes. En conjunto, tanto la variación en la p_{ves} calculada a partir de la RRP, el cambio en la PPR, y el aumento en la frecuencia de aEPSCs observados en este trabajo, son evidencias lo suficientemente rigurosas para afirmar que la PF-PC LTP implica un aumento tanto en la p_{ves} (Branco & Staras, 2009) como en el tamaño de la RRP.

Este aumento en la p_{ves} puede deberse a la modulación de Munc13 producida por el aumento en la concentración de DAG, la cual favorece la transición a un estado de *supercebado* de las vesículas mencionado anteriormente. Además, la isoforma específica de cerebelo de Munc13 que se coexpresa con Munc13-1, Munc13-3, también está implicada en un aumento en la p_{ves} , mediante la colocación de las vesículas cebadas más cerca de los VGCCs y, por tanto, acoplado mejor la entrada de Ca^{2+} a la exocitosis (Kusch et al., 2018; Netrakanti et al., 2015b)

En conjunto, estos datos confirman que los receptores β -ARs activan una vía de señalización fisiológicamente relevante en la LTP de las PF-PC, que involucra una potenciación mediada por cAMP y la modulación de la maquinaria de liberación por Epac2, resultando tanto en un aumento del tamaño de la RRP como de la p_{ves} .

Discusión



Esquema 7. Modulación propuesta para el receptor β -adrenérgico en las sinapsis PF-PC. Al activarse, los receptores β -ARs, ya sea por el agonista isoproterenol o por noradrenalina liberada por la estimulación de terminales noradrenérgicos durante el protocolo de inducción de la PF-PC LTP, promueven la actividad de la adenilato ciclasa (AC), promoviendo la síntesis de cAMP y activando a la proteína Epac2. Epac2 activará a las proteínas Rap que aumentarán la síntesis de diacilglicerol (DAG) mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC). La activación de Munc13 por la unión de DAG favorecerá el proceso de cebado, aumentando la RRP y la probabilidad de liberación de los terminales de las fibras paralelas.

Una de las muchas preguntas que plantea esta tesis es dilucidar el papel de la proteína RIM en la modulación mediada por los receptores β -adrenérgicos, ya que es otra proteína central en la organización y función de la zona activa y trabajos previos han descrito su importancia en la PF-PC LTP (Castillo, 2012; Lonart et al., 2003). RIM1 α tiene un papel imprescindible en la actividad de Munc13-1, revirtiendo los homodímeros autoinhibitorios de esta (Deng et al., 2011). Además se ha observado que participa junto con Munc13 en procesos que implican un aumento en la RRP, como en la potenciación de la transmisión sináptica mediada por mGlu7 en SC-CA1 (Martín et al., 2018), por lo que es muy probable que participe en esta LTP y esté también regulada por Epac. La modulación mediada por Epac, descrita en esta tesis, ha permitido que trabajos posteriores hayan podido centrarse en el estudio de estas proteínas efectoras reguladas por Epac. Prueba de esto es un trabajo recientemente publicado que respalda los datos de esta tesis, indicando que la proteína Epac es imprescindible para la PF-PC LTP y que regula el cebado vesicular y la p_{ves} , añadiendo a esta vía de señalización el papel del módulo formado por Epac-PKC ϵ en la fosforilación de RIM1 α (Wang et al., 2023).

5.2. Un PAM de mGlu4 rescata la PF-LTP, así como los déficits de aprendizaje motor y comportamiento social en un modelo de ratón del Síndrome del X Frágil

5.2.1. La pérdida de la PF-PC LTP de los ratones *Fmr1KO* es consecuencia de un incremento constitutivo de la liberación

Los ratones *Fmr1KO* presentan un fenotipo presináptico, con alteraciones en la estructura y funcionalidad de los terminales sinápticos (Klemmer et al., 2011), que muestran un mayor número de vesículas sinápticas ancladas a la ZA (Deng et al., 2011). FMRP regula la síntesis de múltiples proteínas presinápticas (Monday et al., 2022), modula las vías de señalización mediadas por DAG (Tabet et al., 2016) y por cAMP (Kelley et al., 2007) y regula el flujo de Ca^{2+} al interior celular mediante interacciones con canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ferron et al., 2020) y con canales de K^+ (Deng et al., 2013). Además, trabajos previos de nuestro grupo han descrito que la potenciación de los β -ARs mediada por cAMP está alterada en sinaptosomas corticales de ratones *Fmr1KO* (García-Font et al., 2019). Por estas razones, la LTP presináptica de las PF-PC, que implica un aumento de vesículas ancladas y que está regulada por Ca^{2+} , cAMP y DAG era una buena candidata para buscar alteraciones en la plasticidad de los ratones *Fmr1KO*. En efecto, las sinapsis de ratones *Fmr1KO* mostraron una mayor liberación de neurotransmisor que las de los ratones WT (Fig. 17) así como una PPR menor (Fig. 19A), indicando que posiblemente se debiese a un mecanismo presináptico.

Los experimentos de microscopía electrónica revelaron que las sinapsis PF de los ratones *Fmr1KO* mostraban un mayor número de vesículas ancladas de manera constitutiva (Fig. 15A). A pesar de las alteraciones estructurales descritas en este modelo animal, este aumento en el número de vesículas, en comparación con los ratones WT, no estaba acompañado de diferencias en la longitud de la zona activa (Fig. 15I). Como se ha indicado anteriormente, el número de vesículas ancladas está relacionado con la RRP, que también se encuentra aumentada de manera basal en las sinapsis *Fmr1KO* (Fig. 20E-H). Además, las sinapsis *Fmr1KO* mostraban una disminución de la PPR, así como un incremento de la eficacia sináptica (Fig. 19A, B) y una mayor frecuencia de eventos asincrónicos en presencia de Sr^{2+} (Fig. 16C, D, E); cambios asociados a una mayor probabilidad de liberación. En conjunto, estos

Discusión

resultados indican que las sinapsis PF-PC de ratones *Fmr1KO* presentan un incremento del tamaño de la RRP y una mayor probabilidad de liberación de manera basal, que son los parámetros que se ven afectados en la LTP presináptica de PF-PC. La incapacidad del isoproterenol de modular al alza estos parámetros (Fig. 15E-I, Fig. 16D-E, Fig. 17 y Fig. 20G-H) en las sinapsis *Fmr1KO* sugiere que el incremento de los mismos produce una pérdida de rango dinámico, que provoca un efecto techo que impide la inducción de la LTP (Fig. 20).

5.2.2. El incremento de las VSs ancladas a la ZA y de la RRP de las sinapsis PF-PC *Fmr1KO* se debe a un exceso de Ca^{2+} sináptico y, probablemente, a una sobreactivación de proteínas Munc13

Para diseñar una estrategia que permita revertir este fenotipo, nos propusimos comprender las causas moleculares de estas alteraciones. Debido a la gran cantidad de proteínas reguladas por FMRP, nos preguntamos si los receptores β_1 ARs podrían estar afectados en estos ratones, sin embargo, no encontramos diferencias ni en su expresión (Fig. 18D-E), ni en su distribución en terminales presinápticos cerebelares (Fig. 18A-C). A continuación, analizamos posibles alteraciones en su capacidad para activar la síntesis de cAMP. Se ha descrito que FMRP regula la expresión de las adenilil ciclasas 3, 5 y 6 (Miyashiro et al., 2003) e inhibe a la fosfodiesterasa 2A (PDEA2), una enzima asociada al metabolismo de cAMP y cGMP. Además, la ausencia de FMRP se asocia con una disminución de los niveles de cAMP intracelulares (Maurin et al., 2019). De hecho, nuestros trabajos previos muestran que la inhibición de PDE2A recupera la potenciación mediada por isoproterenol en sinaptosomas de corteza cerebral de ratones *Fmr1KO* (García-Font et al., 2019). Sin embargo, comprobamos que la acumulación de cAMP, en respuesta al tratamiento con isoproterenol, no estaba alterada en los sinaptosomas de cerebelo de ratones *Fmr1KO* (Fig. 18F), por lo que no parecía que las alteraciones encontradas en estos ratones se debiesen a diferencias en los primeros pasos de la vía de señalización de la LTP.

Otras de las vías de señalización afectadas por la ausencia de FMRP son las mediadas por el Ca^{2+} . FMRP regula la expresión y la función de los VGCCs, regulando la excitabilidad de la membrana, la liberación de neurotransmisor y modulando la expresión de determinados genes (Simms & Zamponi, 2014). Por tanto, la ausencia de FMRP causa alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} que provocan un fenotipo

patológico, como se ha observado en otras enfermedades como ataxia y epilepsia (Damaj et al., 2015). Las alteraciones observadas se explican por las interacciones que establece FMRP con mRNAs y proteínas implicadas en la entrada de Ca^{2+} y la excitabilidad celular. FMRP regula directamente el mRNA de la subunidad α de los canales de tipo P/Q (Maurin et al., 2018) e interactúa con los canales de tipo P/Q y N, que son los canales mayoritarios en los terminales presinápticos y, junto con los canales de tipo R, son los principales VGCCs implicados en la liberación del neurotransmisor (Dolphin & Lee, 2020). Las interacciones de FMRP con los canales de tipo N están implicadas en la degradación proteosomal de estos canales y las neuronas carentes de FMRP presentan un mayor porcentaje de VGCCs de tipo N, en detrimento de los de tipo P/Q en los terminales presinápticos (Ferron et al., 2014). Por otro lado, la ausencia de FMRP provoca un aumento en la actividad de los canales de tipo L (Meredith et al., 2007). Además de sus interacciones con VGCCs, FMRP interacciona con la subunidad β_4 de los canales BK que permiten la salida de K^+ , regulando la duración de los potenciales de acción, y su ausencia provoca un ensanchamiento de los potenciales de acción y un aumento en la actividad de los VGCCs y en la entrada de Ca^{2+} (Deng et al., 2013). Estos cambios en la composición y actividad de los canales VGCCs de las sinapsis, así como de otras proteínas que regulan la excitabilidad, provocan un aumento en la concentración de Ca^{2+} , tanto en respuesta a potenciales de acción como en reposo y, consecuentemente, un aumento en la liberación de neurotransmisor (Castagnola et al., 2018). Los experimentos en sinaptosomas demostraron que la entrada de Ca^{2+} ante un estímulo despolarizante (KCl 10 mM) era mayor en los terminales de ratones *Fmr1KO* (Fig. 24), corroborando lo encontrado en la bibliografía.

Como ya se ha explicado anteriormente, la proteína Munc13 es necesaria para los procesos de anclaje y cebado vesicular y la unión de DAG a su dominio C1, así como de Ca^{2+} a su dominio C2B, actúan sinérgicamente para modular su actividad, aumentando el anclaje y la probabilidad de fusión vesicular (Palfreyman & Jorgensen, 2017; Papantoniou et al., 2023). Por tanto, era posible que el aumento en la concentración de Ca^{2+} estuviese activando a la proteína Munc13 de manera constitutiva, provocando los mismos efectos causados por la inducción de la LTP mediada por receptores β -ARs. La primera aproximación metodológica, para comprobar esta hipótesis, fue disminuir la concentración extracelular de Ca^{2+} a 1 mM. En estas condiciones, observamos que la aplicación de isoproterenol sí lograba

5.2.3. La reducción del Ca²⁺ sináptico por activación de mGlu4 revierte el incremento de VSs ancladas y RRP rescatando la PF-PC LTP en los ratones *Fmr1KO*

Para modular la entrada de Ca²⁺ de una manera más fisiológica, recurrimos a la activación farmacológica del receptor mGlu4. Los receptores mGlu del grupo III reducen la entrada de Ca²⁺ mediante la inhibición de los VGCCs (Perroy et al., 2002), entre estos, el receptor mGlu4 se encuentra en los terminales presinápticos de las PF y su activación farmacológica reduce la liberación de neurotransmisor (Abitbol et al., 2008). El fármaco VU0155041 es capaz de activar al receptor mGlu4 de manera específica y se ha empleado, anteriormente, en estudios *in vivo* (Niswender et al., 2008). Este fármaco se une a un sitio alostérico y favorece la activación cooperando con glutamato u otros agonistas ortostéricos, como L-AP4, además de presentar cierta capacidad agonista constitutiva (Rovira et al., 2015). Los experimentos con VU0155041 *ex vivo* demuestran que la activación de mGlu4 revierte el incremento de la liberación y del tamaño de la RRP, rescatando así la PF-PC LTP en ratones *Fmr1KO* (Fig. 23) y recapitulando lo observado con la bajada de Ca²⁺. Por otro lado, los experimentos *in vivo* muestran que el fármaco es capaz de activar los receptores de las PF después de aplicarlo mediante una inyección intraperitoneal, y que este efecto es suficiente para rescatar la LTP (Fig. 25). El efecto canónico del receptor mGlu4 es la inhibición de los VGCCs mediante la activación de una proteína G_{i/o}, sin embargo, estudios de proteómica han descrito que mGlu4 interacciona con proteínas implicadas en la liberación de neurotransmisor como sinaptotagmina-2, sinapsina-1/2 y la proteína de la maquinaria exocitótica Munc-18 (Ramos et al., 2012), por lo que no se puede descartar que existan otros efectos que puedan cooperar en el rescate del fenotipo WT observado en las sinapsis de los ratones *Fmr1KO*. mGlu4 es el único receptor del grupo III expresado en las PF, pero una de las limitaciones del tratamiento es que su administración sistémica puede estar afectando a otras áreas del cerebro. Aunque la expresión de mGlu4 es mayoritaria en el cerebelo, también existe expresión en el estriado, y en el giro

otras áreas no estudiadas e implicadas en esta tarea, la activación del receptor mGlu4 da lugar a una mejora en el aprendizaje.

El cerebelo está implicado en diversos aprendizajes, como los implicados en el ajuste de movimientos complejos (Gilbert & Thach, 1977), en la calibración de la mirada (Norris et al., 2011), en la calibración del reflejo vestibulo-ocular (Boyden et al., 2004) y en el seguimiento de objetos con los ojos de manera fluida (Medina & Lisberger, 2008). Además, la función cerebelar también participa en el aprendizaje asociativo, siendo el condicionamiento clásico de parpadeo el más estudiado, aunque también es importante para condicionamientos pavlovianos como los que afectan a las extremidades (Mojtahedian et al., 2007). A diferencia de la motricidad fina, la prueba de condicionamiento clásico de parpadeo está controlada, en gran parte, por el circuito reflejo del tronco encefálico y por el cerebelo, y la plasticidad que ocurre en las aferencias que llegan a las neuronas de Purkinje es suficiente para la generación de la respuesta condicionada que ocurre con este aprendizaje (Bracha et al., 2009). De este modo, la información de los estímulos condicionado e incondicionado convergerán en las neuronas de Purkinje por distintas vías. Mientras que la información del estímulo incondicionado (soplido o descarga eléctrica) está codificada por el disparo de las fibras trepadoras que provienen del núcleo de la oliva inferior, la información del estímulo condicionado (tono auditivo) está codificada por las PF, a partir de la información procedente de las células musgosas. En el caso de los estímulos auditivos, como es este caso, las proyecciones que activan a las células musgosas se originan principalmente en el núcleo coclear (Steinmetz et al., 1987). Los ratones *Fmr1KO* mostraron un peor aprendizaje en el condicionamiento clásico de parpadeo (Fig. 28), en concordancia con estudios previos (Koekkoek et al., 2005). El tratamiento con VU155041 consiguió mejorar significativamente este aprendizaje, aunque no se llegó a alcanzar el porcentaje de respuestas condicionadas encontradas en los ratones WT. Hay estudios que demuestran que una pérdida masiva de las neuronas de Purkinje en conejo, aunque provoca un enlentecimiento considerable en la adquisición del condicionamiento de parpadeo, no lo eliminan (Nolan & Freeman, 2006), por lo que puede haber otros circuitos implicados. La plasticidad que ocurre en la corteza cerebelar da lugar a un cambio en el patrón de disparo de las PC, liberando al núcleo interpósito de la inhibición mediada por las PC y permitiendo la activación de las motoneuronas que producen la respuesta condicionada (Freeman & Steinmetz, 2011). Por lo que es

Discusión

posible que la ausencia de FMRP esté causando alteraciones en otras regiones implicadas en este aprendizaje, como los núcleos cerebelares profundos, que impidan el rescate completo de este fenotipo.

Aunque el papel de la LTP presináptica de las PF-PC en este aprendizaje no está claro, existen estudios previos que apoyan su implicación, mientras que otros indican que otros procesos plásticos pueden tener mayor importancia. Se ha descrito, en estudios *in vivo*, que el tratamiento con el antagonista de los receptores β -ARs, propranolol, es capaz de perjudicar el desarrollo de este aprendizaje (Cartford et al., 2002), en concordancia con el efecto inhibitor de la LTP que hemos observado en este trabajo (Fig. 8). Estudios *in vitro* indican que el aprendizaje en el condicionamiento clásico de parpadeo está asociado a una disminución de las aferencias excitadoras de las PF que llegan a las PC (Connor et al., 2009). Sin embargo, los registros de PC de rodajas que habían adquirido condicionamiento clásico de parpadeo mostraban una mayor excitabilidad en respuesta a la estimulación de las PF (Hoxha et al., 2016). Otros estudios indican que el aprendizaje de condicionamiento ocurría de manera normal en ratones modificados genéticamente para impedir la internalización de receptores de AMPA de la cual depende la LTD (Schonewille et al., 2011). Mientras que otras modificaciones que afectan a la LTD sí que afectaron a la adquisición de este aprendizaje (Lee et al., 2009). Hoy en día se considera que la adquisición de este aprendizaje depende de la conjunción de diversas formas de plasticidad, que provocan cambios complejos y duraderos en la excitabilidad de las neuronas de Purkinje (Grasselli et al., 2016). Una hipótesis plausible es que el aumento de la liberación basal encontrado en las sinapsis *Fmr1*KO resulte en una mayor activación de los receptores mGlu₁ en las PC, dando lugar a un aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular de las PC y explicando el aumento en la susceptibilidad de las sinapsis PF-PC a desarrollar una LTD observado en estudios anteriores (Koekkoek et al., 2005). La disminución del umbral para el desarrollo de LTD en ausencia FMRP puede estar dificultando la codificación de los estímulos condicionados, resultando en un peor aprendizaje.

El reflejo vestíbulo-ocular, o VOR, permite estabilizar la imagen formada en la retina mediante movimientos de rotación de los ojos para compensar los movimientos de la cabeza. Este reflejo no depende de información visual, sino que está regulado por la información que proviene del sistema vestibular, que codificará

la aceleración de la rotación de la cabeza efectuada. Esta información se procesa en el complejo vestibular que regula la actividad de las neuronas oculomotoras. El VOR presenta un componente angular, mediado por los canales semicirculares para compensar la rotación de la cabeza, y un componente lineal, mediado por los otolitos para compensar movimientos traslacionales. El componente angular es el más implicado en la estabilización de la mirada. Las aferencias del sistema vestibular envían información a dos regiones, el complejo nuclear vestibular del tronco del encéfalo y el cerebelo. El complejo nuclear vestibular activa los nervios oculomotores para realizar el reflejo, sin embargo, el cerebelo actúa como un adaptador del reflejo. La relación que se establece entre el giro de la cabeza y el movimiento del ojo puede alterarse de manera gradual, por ejemplo, debido a una degeneración con la edad de las células ciliadas vestibulares, o de una manera rápida, por ejemplo, debido a unas lentes. El cerebelo monitorizará los efectos del movimiento ocular, comparándolos con el resultado esperado, y ajustará la actividad de los núcleos vestibulares, si es necesario (Fetter, 2007).

EL VOR se compone de dos tipos de movimientos oculares, un componente de rotación del ojo en dirección opuesta al movimiento de la cabeza, denominado fase lenta, y un componente rápido en la dirección del movimiento de la cabeza, de tipo anti-compensatorio, que ajusta la mirada. Los movimientos oculares de los ratones WT y *Fmr1KO* durante la inducción del VOR mostrados en la Figura 29A reflejan importantes diferencias. La ganancia muestra el cociente entre la velocidad del ojo y la velocidad del estímulo, este parámetro suele disminuir al disminuir la frecuencia del estímulo, sin embargo, pueden observarse diferencias significativas entre los ratones WT y los ratones *Fmr1KO* que son corregidos por el tratamiento con VU0155041 (Fig. 29B). La fase es la diferencia en grados entre la velocidad del ojo y la del estímulo, en la que también se aprecian diferencias significativas que son, de nuevo, corregidas por VU0155041 (Fig. 29C). Además, se aprecia también un aumento en el número de fases rápidas por ciclo en los ratones *Fmr1KO*, (Fig. 29D), indicativo de problemas a la hora de ajustar el reflejo.

5.2.5. El rescate de la PF-PC LTP por VU0155041 mejora las habilidades sociales de los ratones *Fmr1KO*

Originalmente se pensaba que las funciones del cerebelo se limitaban a participar en la locomoción y el control de movimientos finos. Sin embargo, ya

Discusión

existía bibliografía que indicaba que el cerebelo también contribuye en las conductas sociales y cognitivas (Frick, 1982; Snider, 1950). Estudios posteriores, basados en pacientes con un desarrollo anómalo o lesiones del cerebelo, describieron alteraciones en el comportamiento social y en la comunicación verbal, mostrando una relación ente las patologías cerebelares y el TEA (Bobylova et al., 2007; Limperopoulos et al., 2007). Como ya se ha mencionado (Caja 6), lesiones en el cerebrocerebelo causan el llamado síndrome afectivo-cognitivo cerebeloso caracterizado por una disminución importante de la actividad intelectual similar al observado en el síndrome prefrontal (D'Angelo, 2010).

Hoy en día se propone que, durante la infancia, el cerebelo ayuda a crear modelos mentales de los comportamientos sociales que ofrecen predicciones de los resultados de determinados comportamientos y los contrasta con los resultados reales, mejorando estos modelos de manera adaptativa (Sokolov et al., 2017). A lo largo del desarrollo social, estos modelos contribuyen al desarrollo de determinadas regiones de la corteza denominadas “cerebro social”. Esta teoría está respaldada con estudios de tractografía de alta resolución que han permitido ver que, además de con la corteza motora, existen importantes conexiones del cerebelo con áreas asociativas de la corteza temporal y prefrontal (Palesi et al., 2017). Si estos modelos sociales no se generan por lesiones tempranas en el cerebelo, los individuos afectados tendrán dificultades para predecir las acciones en un contexto social dificultando los comportamientos sociales (Frosch et al., 2022).

En este trabajo se ha encontrado que los ratones *Fmr1KO* muestran déficits en el comportamiento social, con una menor preferencia por establecer interacciones sociales y con una disminución en la prueba de novedad social, que puede estar indicando una peor memoria social o una menor tendencia a establecer interacciones con individuos novedosos (Fig. 30). Estudios anteriores ya habían descrito alteraciones en comportamientos sociales en ratones con este genotipo (Spencer et al., 2005). Estos resultados pueden explicarse en base a los estudios en humanos y las teorías que se han desarrollado sobre la implicación del cerebelo en el comportamiento y aprendizaje social. Alteraciones en las sinapsis entre las PF-PC, posiblemente desde edades tempranas, pueden haber perjudicado el desarrollo de determinadas regiones de la corteza implicadas en los comportamientos sociales. Además, existen asociaciones entre el fenotipo autista y determinadas variantes del

gen de *Epac2*, *RAPGEF4* (Bacchelli et al., 2003). Los ratones *Epac2^{-/-}* muestran problemas en la prueba de las tres cámaras y en estudios de vocalización que indican problemas en la interacción social (Srivastava et al., 2012). Otro estudio muestra que estos ratones presentan comportamientos estereotípicos y problemas en la toma de decisiones, comportamientos que también pueden observarse en individuos con TEA (Roh et al., 2020).

Sin embargo, las mejoras observadas tras el tratamiento con VU0155041 no pueden explicarse con estas teorías, ya que el tratamiento ocurre después del desarrollo y el efecto es notable tan solo horas después de la administración del fármaco. No obstante, la explicación plausible para estos resultados puede encontrarse en la bibliografía, que indica que el comportamiento social puede alterarse experimentalmente en animales mediante alteraciones en los circuitos del cerebelo en animales adultos. Las PC presentan receptores de dopamina que, al inactivarse, provocan cambios en el comportamiento social y producen una pérdida del interés por la novedad social (Cutando et al., 2022). Este estudio está en línea con otros que indican que alteraciones en la actividad de las PC pueden alterar los comportamientos sociales (Tsai et al., 2012). De especial relevancia para esta teoría, es el trabajo de Stoodley et al., 2017 en el que se describe que la inhibición reversible, mediante el uso de DREADDS (del inglés *Designer Receptors Activated by Designer Drugs*), de la actividad de las PC en la región Crus1 de la corteza cerebelar, una región perteneciente al cerebrocerebelo y con conexiones con la corteza, provocó una disminución en el interés en la prueba de novedad social, así como un menor interés por las marcas olfatorias sociales. En este estudio también observaron que la disrupción mediante estimulación transcraneal de las PC de la región Crus1 en humanos afectaba a regiones de la corteza como el lóbulo inferior parietal, una región implicada en el procesamiento social y afectada en el TEA (Williams et al., 2006). En base a estos estudios, los resultados obtenidos en las pruebas de comportamiento social y la mejoría observada con el tratamiento con VU0155041 apoyan la teoría de que el cerebelo está implicado en el comportamiento social, no solo como una estructura implicada en su desarrollo, sino como un sustrato fisiológico necesario para su correcto funcionamiento. Además, la mejoría observada con el tratamiento indica que es posible paliar algunos de los síntomas presentes en individuos adultos mediante tratamientos que

Discusión

restauren las alteraciones encontradas en la sinapsis PF-PC, abriendo la posibilidad del desarrollo de nuevas terapias farmacológicas.

Como ya se ha mencionado, aunque la expresión de mGlu4 en adulto es elevada en el cerebelo (Corti et al., 2002), no se puede descartar que la mejoría del comportamiento social observada en esta tesis se deba, en parte, a una acción directa sobre receptores mGlu4 de sinapsis de otras áreas cerebrales involucradas en la cognición social como corteza prefrontal o el hipocampo. En concreto se ha descrito que la región CA2 es de especial importancia en la memoria social (Lehr et al., 2021) y que el receptor mGlu4, junto con el mGlu7, están implicados en la plasticidad sináptica de esta región (Dasgupta et al., 2020).

Una característica de nuestra aproximación metodológica, en los experimentos *in vitro*, es que las rodajas de cerebelo no han sido obtenidas de regiones concretas del cerebelo que se correspondan con distintos comportamientos. Por ejemplo, las aferencias del sistema vestibular implicadas en el VOR conectan principalmente con el flóculo, perteneciente al vestibulocerebelo (Clopath et al., 2014), mientras que la región que presenta conexiones con la corteza es el cerebrocerebelo, implicada en el comportamiento social (Stoodley et al., 2017). Las distintas regiones sagitales del cerebelo presentan diferencias puntuales en su composición celular (Mugnaini et al., 2011) y en la actividad de las PC (Guo et al., 2016; Kim et al., 2012). Además, la modulación ejercida por los β -ARs presenta efectos distintos en la sinapsis PF-PC dependiendo de la región estudiada (Inoshita & Hirano, 2021; Lippiello et al., 2015). En este estudio, la importancia de los receptores β -ARs en la PF-PC LTP, la ausencia de esta potenciación en los ratones *Fmr1KO* y el rescate por la activación del receptor mGlu4 se han encontrado indistintamente en rodajas de las distintas regiones, sin embargo, es posible que estas diferencias específicas de región puedan explicar, en parte, la variabilidad encontrada en algunos experimentos. El efecto del rescate de la PF-PC LTP puede estudiarse en regiones específicas del cerebelo en próximos estudios para establecer una mejor relación entre lo observado en los experimentos *in vitro* y los estudios de comportamiento.

5.3. El receptor mGlu7 modula de manera bidireccional la transmisión sináptica inhibitoria en las sinapsis SC-CA1

5.3.1. Papel antiepiléptico de mGlu7

A diferencia del resto de receptores de este grupo, mGlu7 presenta una afinidad extremadamente baja por el glutamato. Debido a esta baja afinidad, se ha sugerido que mGlu7 actúa como un “freno de emergencia” en el caso de elevados niveles de glutamato (Niswender & Conn, 2010). Pero aún no se conoce, en profundidad, ni la relevancia fisiológica de este receptor ni su mecanismo de acción, debido a las limitadas herramientas farmacológicas disponibles para activarlo de manera específica. Los fármacos utilizados para activar a este receptor presentan una afinidad baja por el mismo en comparación con los otros mGluR del grupo III o presentan importantes efectos secundarios (Ahnaou et al., 2016; Mitsukawa et al., 2005; Selvam et al., 2018). No obstante, el estudio de este receptor es de especial importancia debido a su implicación en múltiples patologías y alteraciones del comportamiento. La investigación preclínica en humanos ha demostrado que las variantes bialélicas del gen GRM7 y las mutaciones que afectan a su actividad, aunque raras, causan alteraciones muy severas en el desarrollo que provocan microcefalia, atrofia cerebral y epilepsia (Bedogni et al., 2016; Marafi et al., 2020). Por otro lado, estudios con modelos animales, en los cuales se modifica genéticamente la expresión de mGlu7, han demostrado que este receptor está implicado en la adquisición de la memoria espacial y de trabajo (Callaerts-Vegh et al., 2006; Goddyn et al., 2015) y en desórdenes emocionales (Palazzo et al., 2015). Sin embargo, de entre todas las patologías implicadas, mGlu7 muestra una especial implicación en la condición epiléptica.

La epilepsia es una predisposición de las redes neuronales a generar convulsiones espontáneas (Fisher et al., 2014). Actualmente, los fármacos antiepilépticos son útiles solo en un 70% de los pacientes (Asadi-Pooya et al., 2017) y la mayoría tienen efectos secundarios y no consiguen tratar la totalidad de los síntomas asociados a la patología (Chen et al., 2017). La causa de esto es la falta de conocimiento acerca de los verdaderos mecanismos que subyacen a las alteraciones que provocan la epilepsia (Terrone et al., 2016). La asociación más determinante entre mGlu7 y la epilepsia es la encontrada en el trabajo de Sansig et al., 2001, en el cual describen una predisposición a la epilepsia en los ratones mGlu7^{-/-}, que no

Discusión

ocurre con la eliminación específica de cada uno de los demás receptores mGlu. Este trabajo pone de relevancia dos características importantes de la epilepsia asociada a mGlu7 que la relacionan con las neuronas GABAérgicas. La primera, es que la susceptibilidad a las convulsiones en este modelo animal se deba a una reducción neta en la inhibición mediada por los receptores GABA. Estudios posteriores basados en este modelo, han ahondado en el mecanismo mediante el cual mGlu7 puede estar regulando la actividad neuronal que pueda explicar esto. Estos estudios se han centrado en el mecanismo más descrito en la literatura de este receptor, la inhibición de los VGCCs. Alterando las interacciones entre la cola C-terminal de los receptores mGlu7a y la proteína PICK, necesarias para la inhibición de los VGCCs, se ha logrado aumentar la excitabilidad neuronal y provocar fenotipos proepilépticos (Bertaso et al., 2008; Zhang et al., 2008), sin alterar la expresión en membrana de mGlu7. Sin embargo, estos estudios no recapitulan el fenotipo epiléptico encontrado en los ratones mGlu7^{-/-}. Una explicación para esto, es que estos estudios se centran únicamente en uno de los mecanismos de acción mediados por mGlu7, la inhibición de los canales N y P/Q (Martín et al., 2007). Otras modulaciones descritas son la disminución de los niveles de cAMP por la inhibición de la adenilil ciclasa (Niswender & Conn, 2010), el aumento en la entrada de K⁺ por la activación de los canales GIRK (Sorensen et al., 2002) y la activación de PLC (Martín et al., 2010; Perroy et al., 2000).

5.3.2. La modulación dual de la transmisión sináptica GABAérgica por mGlu7 presenta mecanismos de señalización similares a la modulación de la transmisión sináptica excitadora

La importancia de la señalización por PLC mediada por mGlu7 se pone de relevancia en un trabajo previo de nuestro grupo, en el que la activación del receptor tanto farmacológicamente como mediante un estímulo de alta frecuencia en la sinapsis de SC-CA1, provoca un aumento en la concentración de DAG y la translocación de Munc13-2 a la membrana, dando lugar a una potenciación de la liberación de glutamato (Martín et al., 2018). Sin embargo, el papel antiepiléptico del receptor mGlu7 no puede explicarse por un aumento en la liberación de glutamato en las sinapsis con neuronas piramidales. También se ha descrito que el receptor mGlu7 está presente en los terminales de las interneuronas PV, las cuales establecen sinapsis con las neuronas piramidales de CA1, donde se ha visto que su activación es capaz de inhibir la liberación de GABA (Klar et al., 2015). En este

estudio hemos comprobado que la activación farmacológica del receptor mGlu7 es capaz de modular de manera bidireccional la liberación de GABA, primero inhibiendo y después potenciando esta liberación (Fig. 31C, D). Tal y como se ha descrito anteriormente, la inhibición de los VGCCs observada depende de la interacción entre mGlu7 y proteínas $G_{i/o}$, mientras que la potenciación de la liberación está mediada por un aumento de DAG (Fig. 33) y provoca un aumento en la probabilidad de liberación (Fig. 34). En este estudio se demuestra, por primera vez, que los receptores mGlu7 situados en las interneuronas GABAérgicas del hipocampo son capaces tanto de inhibir como de potenciar la liberación de GABA.

Otra de las características del fenotipo epiléptico observado en los ratones *mGlu7^{-/-}* es el desarrollo gradual de esta condición durante los primeros meses de desarrollo postnatal. Esta aparición gradual del fenotipo puede deberse a la disminución gradual de la expresión del receptor mGlu8 en la sinapsis entre las fibras colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales de CA1, a lo largo de los primeros meses postnatales, mientras que la expresión del receptor mGlu7 aumenta, siendo el único mGluR del Grupo III presente en esta sinapsis en individuos adultos (Ayala et al., 2008). Este cambio, de un receptor de alta afinidad por un receptor de baja afinidad en la regulación de la excitabilidad celular, coincide con el desarrollo del sistema GABAérgico, que no alcanza la funcionalidad observada en adultos hasta transcurridas varias semanas de desarrollo postnatal (Cossart & Khazipov, 2022). La importancia funcional de estos receptores en el control de la excitabilidad de CA1 se pone de manifiesto en el trabajo de Dammann et al., 2018, en el que se describe que los niveles de mGlu8 aumentan en esta sinapsis, hasta los niveles observados en estadios inmaduros, en modelos de epilepsia crónica en individuos adultos, actuando como un mecanismo compensatorio para contrarrestar la hiperexcitabilidad en situaciones en las que el receptor mGlu7 no sea suficiente. La regulación durante el desarrollo de los receptores mGlu del grupo III coordinada con la regulación del sistema GABAérgico puede responder a la necesidad de un receptor que responda antes a un exceso de excitabilidad en individuos jóvenes con una menor consolidación de la red GABAérgica, como es el mGlu8, mientras que en individuos adultos el receptor mGlu7 actuaría, como se ha descrito anteriormente, como un freno de emergencia en condiciones de una elevada excitabilidad (Niswender & Conn, 2010), pero permitiendo una mayor liberación de glutamato.

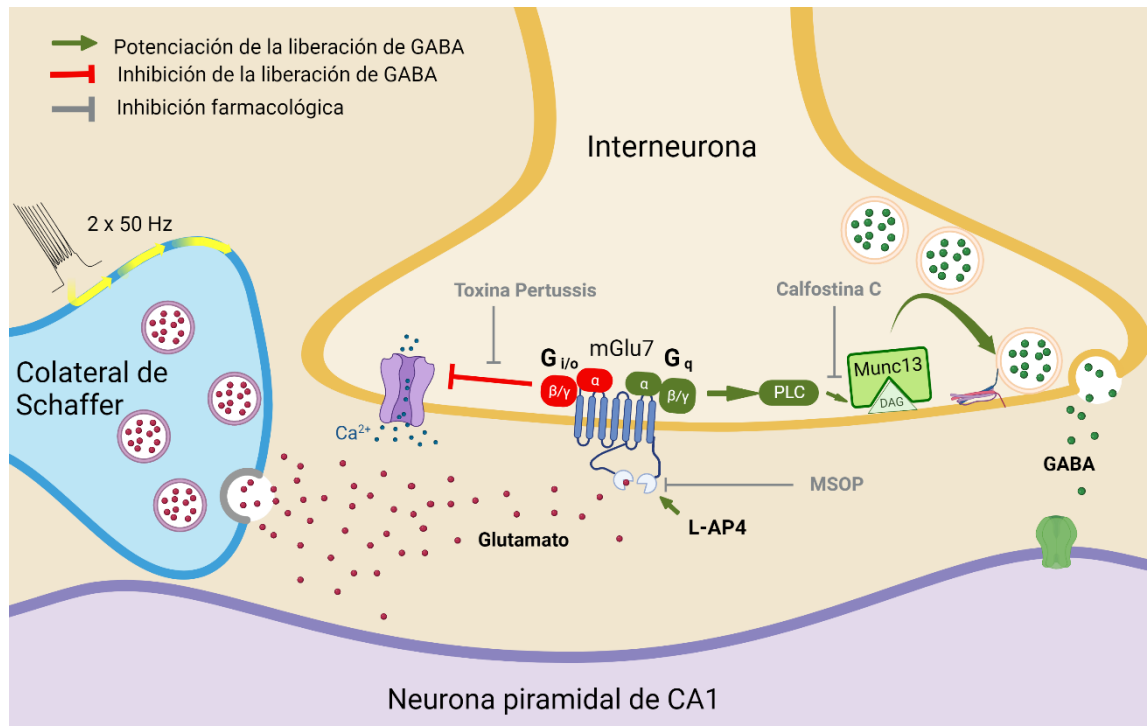
Discusión

5.3.3. La activación fisiológica del receptor mGlu7 por estimulaciones de alta frecuencia de las colaterales de Schaffer potencia la liberación de GABA en las aferencias de las neuronas piramidales CA1

En la región CA1, las aferencias excitadoras (tanto de origen hipocampal como extrahipocampales) establecen sinapsis con neuronas glutamatérgicas y con neuronas GABAérgicas. En general, las aferencias excitadoras con interneuronas GABAérgicas son más eficaces en inducir la liberación del NT que las que se dan con neuronas glutamatérgicas, lo cual facilita la inhibición hacia adelante de las células piramidales (Isaacson & Scanziani, 2011). En este trabajo se ha descubierto que, en condiciones de una elevada liberación de glutamato en la sinapsis entre las SC y las neuronas piramidales de CA1, el receptor mGlu7 es capaz de potenciar la liberación de GABA (Fig. 36 y 37), contribuyendo a la inhibición de las neuronas piramidales. El mecanismo mediante el cual potencia esta liberación parece ser el mismo que el descrito para la activación farmacológica del receptor, ya que depende de la unión de DAG y ocurre a la par que una inhibición mediada por proteínas $G_{i/o}$ (Fig. 36). Aunque la inhibición y la potenciación ocurren a la vez, el efecto potenciador es de mayor magnitud y duración, haciendo que el efecto de la potenciación prevalezca. La duración de la respuesta inhibitoria seguramente esté definida por el tiempo en que la concentración de glutamato en la brecha sináptica sea lo suficientemente alta como para activar al receptor de baja afinidad. Por otro lado, la potenciación tiene una mayor duración debido a que la cascada de señalización implicada es de mayor complejidad. En esta señalización, el receptor mGlu7 activa una proteína G, insensible a toxina *pertussis*, que activa una PLC y se genera DAG, el cual promueve la translocación de la proteína Munc13-2 a la membrana plasmática, donde recluta SV a la ZA junto con la proteína RIM1 α (Martín et al., 2010, 2018).

La diferencia de velocidad entre la potenciación inducida farmacológicamente y la observada con el protocolo de estimulación de alta frecuencia podría ser deberse a que algunas modulaciones mediadas por el receptor mGlu7 requieren su unión a Ca^{2+} /calmodulina, lo cual está favorecido por la entrada de Ca^{2+} como consecuencia de la estimulación de alta frecuencia (Fig. 36). Además, la proteína Munc13 presenta también un dominio de unión a Ca^{2+} /calmodulina y un dominio de unión a Ca^{2+} que favorecen su función en el proceso de cebado vesicular (Michelassi et al., 2017; Scheschonka et al., 2008). De esta manera, el receptor mGlu7 podría tener un papel fisiológicamente relevante en la inhibición hacia adelante de las neuronas

piramidales de CA1 y, en especial, durante estimulaciones endógenas de alta frecuencia, explicando su papel antiepiléptico.



Esquema 10. Modulación propuesta para el receptor mGlu7 en las aferencias inhibitorias sobre neuronas piramidales de CA1 del hipocampo. La activación del receptor mGlu7 provoca la inhibición de los VGCCs mediante una proteína $G_{i/o}$, lo cual reduce la liberación de neurotransmisor, así como la activación de una proteína G insensible a toxina *pertussis* que probablemente sea G_q . Esta proteína activa a la fosfolipasa C (PLC), aumentando la síntesis de diacilglicerol (DAG) que activará a la proteína Munc13. Esta proteína de la zona activa aumentará la RRP y la probabilidad de liberación, potenciando la liberación en estos terminales. Durante la activación fisiológica de mGlu7 mediante la estimulación de las colaterales de Schaffer, el efecto neto de la activación del receptor mGlu7 es la potenciación de la liberación de GABA.

5.3.4. La potenciación de la transmisión GABAérgica sobre células piramidales de CA1 probablemente se deba a mGlu7 localizados en sinapsis PV-CA1

La potenciación mediada por mGlu7 en la transmisión glutamatérgica implica un aumento en la probabilidad de liberación y en el número de vesículas ancladas y cebadas (Martín et al., 2018). Aunque electrofisiológicamente pudimos observar el aumento en la probabilidad de liberación, para comprobar si la activación de mGlu7 con el agonista farmacológico L-AP4 producía un aumento en el número de vesículas cebadas, analizamos los terminales que forman sinapsis axosomáticas simétricas de la capa piramidal de CA1, ya que, en su mayoría, proceden de sinapsis PV (Pelkey et al., 2017). En estas interneuronas se ha descrito la presencia de mGlu7 y su

Discusión

relevancia funcional (Klar et al., 2015), pero no de otros receptores mGlu del grupo III. El aumento en el número de vesículas ancladas (Fig. 35) en la ZA de las sinapsis axosomáticas en respuesta a L-AP4 indica que el receptor mGlu7 es capaz de modular la maquinaria excitotóxica, aumentando la liberación de neurotransmisor.

Las interneuronas PV presentan una gran densidad de canales de Na^+ dependientes de voltaje en las regiones distales del axón que les permiten generar potenciales de acción de corta duración y con una velocidad de propagación extraordinariamente rápida (Hu & Jonas, 2014). Además, las propiedades biofísicas de estos canales de Na^+ , así como de los canales de K^+ dependientes de voltaje que poseen, permiten que la duración de estos potenciales sea breve y la repolarización sea rápida, facilitando unas frecuencias de disparo muy altas (Martina & Jonas, 1997). Estas neuronas, además, presentan una probabilidad de liberación alta debido a la presencia de sinaptogamina 2, la cual posee una rápida cinética de unión al Ca^{2+} y facilita un acoplamiento rápido y eficaz entre la entrada de Ca^{2+} y la liberación de las vesículas sinápticas (Kerr et al., 2008; Xu et al., 2007). Estas características moleculares hacen que estas neuronas muestren frecuencias de disparo que pueden llegar hasta los 100 Hz, lo cual explica su importancia a la hora de coordinar la actividad neuronal de alta frecuencia mediante una inhibición hacia adelante (Pelkey et al., 2017). Las interneuronas PV son de especial importancia en los procesos epilépticos, impidiendo la propagación de los ataques epilépticos, tanto en modelos experimentales (Cammarota et al., 2013), como en pacientes (Schevon et al., 2012). Además, se ha comprobado que la activación de estas interneuronas in vivo, mediante optogenética, es capaz de detener ataques epilépticos (Krook-Magnuson et al., 2013). Por tanto, conocer la relevancia funcional del receptor mGlu7 en las interneuronas PV es de especial importancia para entender el control de la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1, así como para el desarrollo de fármacos más eficaces frente a la epilepsia. En este sentido, resulta prometedor el trabajo de Girard et al., 2019 donde un agonista de mGlu7 resulta eficaz tanto frente a la epileptogénesis (mediante un protocolo de inyección sistémica de pentilentetrazol) como frente a las convulsiones producidas por la inyección intrahipocampal de kainato.

Conclusiones

6. Conclusiones

1.- Los receptores β_1 -adrenérgicos potencian la transmisión sináptica entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje mediante una vía de señalización dependiente de Epac2 que implica un incremento de la RRP y la probabilidad de liberación.

2.- La señalización por los receptores β_1 -adrenérgicos/Epac2 es necesaria para la LTP entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje.

3.- Las sinapsis entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje de ratones *Fmr1KO* presentan un aumento de las vesículas ancladas, de la RRP y de la probabilidad de liberación, fruto del aumento en la entrada de Ca^{2+} presináptico, que provocan un efecto techo que impide la LTP.

4.- La activación del receptor mGlu4 por VU0155041 *in vitro* e *in vivo* revierte las alteraciones de la RRP y de la probabilidad de liberación de las fibras paralelas rescatando la LTP en los ratones *Fmr1KO*.

5.- El tratamiento con VU0155041 rescata los déficits en el aprendizaje motor y social observados en los ratones *Fmr1KO* poniendo de manifiesto el potencial traslacional de este fármaco.

6.- La activación farmacológica del receptor mGlu7 modula bidireccionalmente la transmisión sináptica de las aferencias inhibitoras de las neuronas piramidales de CA1. La fase de inhibición de la transmisión sináptica está mediada por proteínas $G_{i/o}$ y la fase potenciadora por un mecanismo que requiere la actividad de proteínas G resistentes a toxina *pertussis* y proteínas de unión a DAG y que implica un aumento del anclaje vesicular y de la probabilidad de liberación.

7.- Durante la activación fisiológica de mGlu7 mediante la estimulación de las colaterales de Schaffer, prevalece la fase potenciadora de la transmisión sináptica inhibitora, poniendo de manifiesto la relevancia de esta vía de señalización en el balance excitación/inhibición en el hipocampo y, por tanto, explicando el rol anti-epiléptico descrito previamente para este receptor.

Bibliografía

7. Bibliografía

Abbott, L. C., & Sotelo, C. (2000). Ultrastructural analysis of catecholaminergic innervation in weaver and normal mouse cerebellar cortices. *The Journal of Comparative Neurology*, *426*(2), 316-329.

Abitbol, K., Acher, F., & Daniel, H. (2008). Depression of excitatory transmission at PF-PC synapse by group III metabotropic glutamate receptors is provided exclusively by mGluR4 in the rodent cerebellar cortex. *Journal of Neurochemistry*, *105*(6), 2069-2079. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05290.x>

Abraham, W. C., & Williams, J. M. (2008). LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*(3), 260-268. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.10.001>

Abreu, N., Acosta-Ruiz, A., Xiang, G., & Levitz, J. (2021). Mechanisms of differential desensitization of metabotropic glutamate receptors. *Cell Reports*, *35*(4), 109050. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109050>

Ahnaou, A., Raeyemaekers, L., Huysmans, H., & Drinkenburg, W. H. I. M. (2016). Off-target potential of AMN082 on sleep EEG and related physiological variables: Evidence from mGluR7 (-/-) mice. *Behavioural Brain Research*, *311*, 287-297. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.035>

Airas, J. M., Betz, H., & El Far, O. (2001). PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C-terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding. *FEBS Letters*, *494*(1-2), 60-63. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02311-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02311-0)

Aizenman, C. D., Akerman, C. J., Jensen, K. R., & Cline, H. T. (2003). Visually driven regulation of intrinsic neuronal excitability improves stimulus detection in vivo. *Neuron*, *39*(5), 831-842. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00527-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00527-0)

Almena, M., & Mérida, I. (2011). Shaping up the membrane: Diacylglycerol coordinates spatial orientation of signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, *36*(11), 593-603. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.06.005>

Alonso, B., Bartolomé-Martín, D., Ferrero, J. J., Ramírez-Franco, J., Torres, M., & Sánchez-Prieto, J. (2017). CB1 receptors down-regulate a cAMP/Epac2/PLC pathway to silence the nerve terminals of cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*, *142*(3), 350-364. <https://doi.org/10.1111/jnc.14059>

Andersen, B. B., Korbo, L., & Pakkenberg, B. (1992). A quantitative study of the human cerebellum with unbiased stereological techniques. *The Journal of Comparative Neurology*, *326*(4), 549-560. <https://doi.org/10.1002/cne.903260405>

Antar, L. N., & Bassell, G. J. (2003). Sunrise at the Synapse: The FMRP mRNP Shaping the Synaptic Interface. *Neuron*, *37*(4), 555-558. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00090-4)

Asadi-Pooya, A. A., Stewart, G. R., Abrams, D. J., & Sharan, A. (2017). Prevalence and Incidence of Drug-Resistant Mesial Temporal Lobe Epilepsy in the United States. *World Neurosurgery*, *99*, 662-666. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2016.12.074>

Bibliografía

- Augustin, I., Betz, A., Herrmann, C., Jo, T., & Brose, N. (1999). Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain. *The Biochemical Journal*, 337 (Pt 3)(Pt 3), 363-371.
- Augustin, I., Korte, S., Rickmann, M., Kretzschmar, H. A., Südhof, T. C., Herms, J. W., & Brose, N. (2001). The Cerebellum-Specific Munc13 Isoform Munc13-3 Regulates Cerebellar Synaptic Transmission and Motor Learning in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 21(1), 10-17. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-01-00010.2001>
- Augustine, G. J., & Eckert, R. (1984). Divalent cations differentially support transmitter release at the squid giant synapse. *The Journal of Physiology*, 346, 257-271. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015020>
- Ayala, J. E., Niswender, C. M., Luo, Q., Banko, J. L., & Conn, P. J. (2008). Group III mGluR regulation of synaptic transmission at the SC-CA1 synapse is developmentally regulated. *Neuropharmacology*, 54(5), 804-814. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.12.009>
- Bacaj, T., Wu, D., Yang, X., Morishita, W., Zhou, P., Xu, W., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2013). Synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 trigger synchronous and asynchronous phases of neurotransmitter release. *Neuron*, 80(4), 947-959. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.026>
- Bacchelli, E., Blasi, F., Biondolillo, M., Lamb, J. A., Bonora, E., Barnby, G., Parr, J., Beyer, K. S., Klauck, S. M., Poustka, A., Bailey, A. J., Monaco, A. P., Maestrini, E., & International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). (2003). Screening of nine candidate genes for autism on chromosome 2q reveals rare nonsynonymous variants in the cAMP-GEFII gene. *Molecular Psychiatry*, 8(11), 916-924. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001340>
- Bagni, C., Tassone, F., Neri, G., & Hagerman, R. (2012). Fragile X syndrome: Causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(12), 4314-4322. <https://doi.org/10.1172/JCI63141>
- Banerjee, U., & Cheng, X. (2015). Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian rapgef3 gene: Structure, function and therapeutics. *Gene*, 570(2), 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.063>
- Barr, F., & Lambright, D. G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(4), 461-470. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.04.007>
- Bartsch, J. C., von Cramon, M., Gruber, D., Heinemann, U., & Behr, J. (2021). Stress-Induced Enhanced Long-Term Potentiation and Reduced Threshold for N-Methyl-D-Aspartate Receptor- and β -Adrenergic Receptor-Mediated Synaptic Plasticity in Rodent Ventral Subiculum. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2021.658465>
- Basu, J., Betz, A., Brose, N., & Rosenmund, C. (2007). Munc13-1 C1 Domain Activation Lowers the Energy Barrier for Synaptic Vesicle Fusion. *Journal of Neuroscience*, 27(5), 1200-1210. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4908-06.2007>
- Bauer, C. S., Woolley, R. J., Teschemacher, A. G., & Seward, E. P. (2007). Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-protein-coupled receptors requires the priming protein Munc13-1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(1), 212-219. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4201-06.2007>

- Becker, M. I., & Person, A. L. (2019). Cerebellar Control of Reach Kinematics for Endpoint Precision. *Neuron*, *103*(2), 335-348.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.007>
- Bedogni, F., Cobolli Gigli, C., Pozzi, D., Rossi, R. L., Scaramuzza, L., Rossetti, G., Pagani, M., Kilstrup-Nielsen, C., Matteoli, M., & Landsberger, N. (2016). Defects During Mecp2 Null Embryonic Cortex Development Precede the Onset of Overt Neurological Symptoms. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *26*(6), 2517-2529. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv078>
- Beierlein, M., Fioravante, D., & Regehr, W. G. (2007). Differential expression of posttetanic potentiation and retrograde signaling mediate target-dependent short-term synaptic plasticity. *Neuron*, *54*(6), 949-959. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.002>
- Bender, R. A., Galindo, R., Mameli, M., Gonzalez-Vega, R., Valenzuela, C. F., & Baram, T. Z. (2005). Synchronized network activity in developing rat hippocampus involves regional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel function. *The European journal of neuroscience*, *22*(10), 2669-2674. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04407.x>
- Bernardet, M., & Crusio, W. E. (2006). Fmr1 KO mice as a possible model of autistic features. *TheScientificWorldJournal*, *6*, 1164-1176. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.220>
- Bertaso, F., Zhang, C., Scheschonka, A., de Bock, F., Fontanaud, P., Marin, P., Huganir, R. L., Betz, H., Bockaert, J., Fagni, L., & Lerner-Natoli, M. (2008). PICK1 uncoupling from mGluR7a causes absence-like seizures. *Nature neuroscience*, *11*(8), 940-948. <https://doi.org/10.1038/nn.2142>
- Betz, A., Thakur, P., Junge, H. J., Ashery, U., Rhee, J.-S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J., & Brose, N. (2001). Functional Interaction of the Active Zone Proteins Munc13-1 and RIM1 in Synaptic Vesicle Priming. *Neuron*, *30*(1), 183-196. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00272-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00272-0)
- Bhattacharya, A., Kaphzan, H., Alvarez-Dieppa, A. C., Murphy, J. P., Pierre, P., & Klann, E. (2012). Genetic removal of p70 S6 kinase 1 corrects molecular, synaptic, and behavioral phenotypes in fragile X syndrome mice. *Neuron*, *76*(2), 325-337. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.022>
- Blasi, J., Chapman, E. R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Südhof, T. C., Niemann, H., & Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*, *365*(6442), 160-163. <https://doi.org/10.1038/365160a0>
- Blasi, J., Chapman, E. R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., & Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *The EMBO Journal*, *12*(12), 4821-4828.
- Bobylova, M. Yu., Petrukhin, A. S., Dunaevskaya, G. N., Piliya, S. V., & Il'ina, E. S. (2007). Clinical-psychological characteristics of children with dysgenesis of the cerebellar vermis. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, *37*(8), 755-759. <https://doi.org/10.1007/s11055-007-0078-4>
- Boczan, J., Leenders, A. G. M., & Sheng, Z.-H. (2004). Phosphorylation of syntaphilin by cAMP-dependent protein kinase modulates its interaction with syntaxin-1 and annuls its inhibitory effect on vesicle exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 18911-18919. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400496200>
- Boudin, H., & Craig, A. M. (2001). Molecular Determinants for PICK1 Synaptic Aggregation and mGluR7a Receptor Coclustering: ROLE OF THE PDZ, COILED-COIL, AND ACIDIC DOMAINS*.

Bibliografía

- Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30270-30276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102991200>
- Bourne, H. R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 134-142. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(97\)80054-3](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(97)80054-3)
- Boyden, E. S., Katoh, A., & Raymond, J. L. (2004). Cerebellum-dependent learning: The role of multiple plasticity mechanisms. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 581-609. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144238>
- Bracha, V., Zbarska, S., Parker, K., Carrel, A., Zenitsky, G., & Bloedel, J. R. (2009). The cerebellum and eyeblink conditioning: Learning vs. network performance hypotheses. *Neuroscience*, 162(3), 787. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.042>
- Bradley, S. R., Rees, H. D., Yi, H., Levey, A. I., & Conn, P. J. (1998). Distribution and developmental regulation of metabotropic glutamate receptor 7a in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 71(2), 636-645. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71020636.x>
- Branco, T., & Staras, K. (2009). The probability of neurotransmitter release: Variability and feedback control at single synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrn2634>
- Breustedt, J., Gundlfinger, A., Varoqueaux, F., Reim, K., Brose, N., & Schmitz, D. (2010). Munc13-2 Differentially Affects Hippocampal Synaptic Transmission and Plasticity. *Cerebral Cortex*, 20(5), 1109-1120. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp170>
- Brock, J. A., Thomazeau, A., Watanabe, A., Li, S. S. Y., & Sjöström, P. J. (2020). A Practical Guide to Using CV Analysis for Determining the Locus of Synaptic Plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2020.00011>
- Brockmann, M. M., Maglione, M., Willmes, C. G., Stumpf, A., Bouazza, B. A., Velasquez, L. M., Grauel, M. K., Beed, P., Lehmann, M., Gimber, N., Schmoranzer, J., Sigrist, S. J., Rosenmund, C., & Schmitz, D. (2019). RIM-BP2 primes synaptic vesicles via recruitment of Munc13-1 at hippocampal mossy fiber synapses. *eLife*, 8, e43243. <https://doi.org/10.7554/eLife.43243>
- Brockmann, M. M., Zarebidaki, F., Camacho, M., Grauel, M. K., Trimbuch, T., Südhof, T. C., & Rosenmund, C. (2020). A Trio of Active Zone Proteins Comprised of RIM-BPs, RIMs, and Munc13s Governs Neurotransmitter Release. *Cell Reports*, 32(5), 107960. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107960>
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y., & Südhof, T. C. (1995). Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 25273-25280. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.25273>
- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Keene, J. D., Darnell, R. B., & Warren, S. T. (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*, 107(4), 477-487. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00568-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00568-2)
- Bruford, E., & On Behalf Of The Hugo Gene Nomenclature Committee Hgnc, null. (2022). Comment on Herring et al. The Use of «Retardation» in FRAXA, FMRP, FMR1 and Other Designations. *Cells* 2022, 11, 1044. *Cells*, 11(12), 1937. <https://doi.org/10.3390/cells11121937>

- Brunger, A. T., Choi, U. B., Lai, Y., Leitz, J., & Zhou, Q. (2018). Molecular mechanisms of fast neurotransmitter release. *Annual review of biophysics*, *47*, 469-497. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-034117>
- Cahalan, M., & Neher, E. (1992). [1] Patch clamp techniques: An overview. En *Methods in Enzymology* (Vol. 207, pp. 3-14). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)07003-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)07003-7)
- Cai, Z., Saugstad, J. A., Sorensen, S. D., Ciombor, K. J., Zhang, C., Schaffhauser, H., Hubalek, F., Pohl, J., Duvoisin, R. M., & Conn, P. J. (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates group III metabotropic glutamate receptors and inhibits their function as presynaptic receptors. *Journal of neurochemistry*, *78*(4), 756-766.
- Callaerts-Vegh, Z., Beckers, T., Ball, S. M., Baeyens, F., Callaerts, P. F., Cryan, J. F., Molnar, E., & D'Hooge, R. (2006). Concomitant deficits in working memory and fear extinction are functionally dissociated from reduced anxiety in metabotropic glutamate receptor 7-deficient mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(24), 6573-6582. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1497-06.2006>
- Calloway, N., Gouzer, G., Xue, M., & Ryan, T. A. (2015). The active-zone protein Munc13 controls the use-dependence of presynaptic voltage-gated calcium channels. *eLife*, *4*, e07728. <https://doi.org/10.7554/eLife.07728>
- Camacho, M., Basu, J., Trimbuch, T., Chang, S., Pulido-Lozano, C., Chang, S.-S., Duluvova, I., Abo-Rady, M., Rizo, J., & Rosenmund, C. (2017). Heterodimerization of Munc13 C2A domain with RIM regulates synaptic vesicle docking and priming. *Nature Communications*, *8*, 15293. <https://doi.org/10.1038/ncomms15293>
- Cammarota, M., Losi, G., Chiavegato, A., Zonta, M., & Carmignoto, G. (2013). Fast spiking interneuron control of seizure propagation in a cortical slice model of focal epilepsy. *The Journal of Physiology*, *591*(Pt 4), 807-822. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.238154>
- Capogna, M. (2004). Distinct properties of presynaptic group II and III metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of perforant pathway-CA1 EPSCs. *The European Journal of Neuroscience*, *19*(10), 2847-2858. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03378.x>
- Carey, M. R., & Regehr, W. G. (2009). Noradrenergic control of associative synaptic plasticity by selective modulation of instructive signals. *Neuron*, *62*(1), 112-122. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.022>
- Carta, I., Chen, C. H., Schott, A. L., Dorizan, S., & Khodakhah, K. (2019). Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science (New York, N.Y.)*, *363*(6424), eaav0581. <https://doi.org/10.1126/science.aav0581>
- Cartford, M. C., Allgeier, C. A., & Bickford, P. C. (2002). The effects of beta-noradrenergic receptor blockade on acquisition of eyeblink conditioning in 3-month-old F344 rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *78*(2), 246-257. <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4063>
- Castagnola, S., Delhaye, S., Folci, A., Paquet, A., Brau, F., Duprat, F., Jarjat, M., Grossi, M., Béal, M., Martin, S., Mantegazza, M., Bardoni, B., & Maurin, T. (2018). New Insights Into the Role of Cav2 Protein Family in Calcium Flux Deregulation in Fmr1-KO Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 342. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00342>

Bibliografía

- Castillo, P. E. (2012). Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2), a005728. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005728>
- Castillo, P. E., Schoch, S., Schmitz, F., Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2002). RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature*, 415(6869), 327-330. <https://doi.org/10.1038/415327a>
- Chaudhari, N., Landin, A. M., & Roper, S. D. (2000). A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nature Neuroscience*, 3(2), 113-119. <https://doi.org/10.1038/72053>
- Chavez-Noriega, L. E., & Stevens, C. F. (1994). Increased transmitter release at excitatory synapses produced by direct activation of adenylate cyclase in rat hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(1), 310-317. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00310.1994>
- Chen, B., Choi, H., Hirsch, L. J., Katz, A., Legge, A., Buchsbaum, R., & Detyniecki, K. (2017). Psychiatric and behavioral side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 76, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.08.039>
- Chen, C., & Regehr, W. G. (1997). The Mechanism of cAMP-Mediated Enhancement at a Cerebellar Synapse. *The Journal of Neuroscience*, 17(22), 8687-8694. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-22-08687.1997>
- Chen, H., Wild, C., Zhou, X., Ye, N., Cheng, X., & Zhou, J. (2014). Recent Advances in the Discovery of Small Molecules Targeting Exchange Proteins Directly Activated by cAMP (EPAC). *Journal of medicinal chemistry*, 57(9), 3651-3665. <https://doi.org/10.1021/jm401425e>
- Chen, Z., Cooper, B., Kalla, S., Varoqueaux, F., & Young, S. M. (2013). The Munc13 Proteins Differentially Regulate Readily Releasable Pool Dynamics and Calcium-Dependent Recovery at a Central Synapse. *The Journal of Neuroscience*, 33(19), 8336-8351. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5128-12.2013>
- Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T., & Mei, F. (2008). Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(7), 651-662.
- Cheslack-Postava, K., Fallin, M. D., Avramopoulos, D., Connors, S. L., Zimmerman, A. W., Eberhart, C. G., & Newschaffer, C. J. (2007). Beta2-Adrenergic receptor gene variants and risk for autism in the AGRE cohort. *Molecular Psychiatry*, 12(3), 283-291. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001940>
- Chevalleyre, V., Heifets, B. D., Kaeser, P. S., Südhof, T. C., & Castillo, P. E. (2007). Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron*, 54(5), 801-812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.020>
- Chheda, M. G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J., & Sheng, Z. H. (2001). Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nature Cell Biology*, 3(4), 331-338. <https://doi.org/10.1038/35070000>
- Chin, D., & Means, A. R. (2000). Calmodulin: A prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology*, 10(8), 322-328. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01800-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01800-6)

- Chung, H. J., Steinberg, J. P., Haganir, R. L., & Linden, D. J. (2003). Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(5626), 1751-1755. <https://doi.org/10.1126/science.1082915>
- Clopath, C., Badura, A., De Zeeuw, C. I., & Brunel, N. (2014). A Cerebellar Learning Model of Vestibulo-Ocular Reflex Adaptation in Wild-Type and Mutant Mice. *The Journal of Neuroscience*, *34*(21), 7203-7215. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2791-13.2014>
- Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *37*, 205-237. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205>
- Connor, S., Bloomfield, J., LeBoutillier, J. C., Thompson, R. F., Petit, T. L., & Weeks, A. C. W. (2009). Eyeblink conditioning leads to fewer synapses in the rabbit cerebellar cortex. *Behavioral Neuroscience*, *123*(4), 856-862. <https://doi.org/10.1037/a0016370>
- Consonni, S. V., Gloerich, M., Spanjaard, E., & Bos, J. L. (2012). cAMP regulates DEP domain-mediated binding of the guanine nucleotide exchange factor Epac1 to phosphatidic acid at the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(10), 3814-3819. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117599109>
- Consorihium, T. D.-B. F. X., Bakker, C. E., Verheij, C., Willemsen, R., Helm, R. van der, Oerlemans, F., Vermey, M., Bygrave, A., Hoogeveen, A., Oostra, B. A., Reyniers, E., Boule, K. D., D'Hooge, R., Cras, P., Velzen, D. van, Nagels, G., Martin, J.-J., Deyn, P. P. D., Darby, J. K., & Willems, P. J. (1994). Fmr1 knockout mice: A model to study fragile X mental retardation. *Cell*, *78*(1), 23-33. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90569-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90569-X)
- Corti, C., Aldegheri, L., Somogyi, P., & Ferraguti, F. (2002). Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS. *Neuroscience*, *110*(3), 403-420. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00591-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00591-7)
- Corti, C., Restituto, S., Rimland, J. M., Brabet, I., Corsi, M., Pin, J. P., & Ferraguti, F. (1998). Cloning and characterization of alternative mRNA forms for the rat metabotropic glutamate receptors mGluR7 and mGluR8. *The European Journal of Neuroscience*, *10*(12), 3629-3641. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00371.x>
- Cossart, R., & Khazipov, R. (2022). How development sculpts hippocampal circuits and function. *Physiological Reviews*, *102*(1), 343-378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2020>
- Costa, R. P., Mizusaki, B. E. P., Sjöström, P. J., & van Rossum, M. C. W. (2017). Functional consequences of pre- and postsynaptic expression of synaptic plasticity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*(1715), 20160153. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0153>
- Cutando, L., Puighermanal, E., Castell, L., Tarot, P., Belle, M., Bertaso, F., Arango-Lievano, M., Ango, F., Rubinstein, M., Quintana, A., Chédotal, A., Mameli, M., & Valjent, E. (2022). Cerebellar dopamine D2 receptors regulate social behaviors. *Nature Neuroscience*, *25*(7), 900-911. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01092-8>
- Dalezios, Y., Luján, R., Shigemoto, R., Roberts, J. D. B., & Somogyi, P. (2002). Enrichment of mGluR7a in the Presynaptic Active Zones of GABAergic and Non-GABAergic Terminals on Interneurons in the Rat Somatosensory Cortex. *Cerebral Cortex*, *12*(9), 961-974. <https://doi.org/10.1093/cercor/12.9.961>

Bibliografía

- Damaj, L., Lupien-Meilleur, A., Lortie, A., Riou, É., Ospina, L. H., Gagnon, L., Vanasse, C., & Rossignol, E. (2015). CACNA1A haploinsufficiency causes cognitive impairment, autism and epileptic encephalopathy with mild cerebellar symptoms. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, *23*(11), 1505-1512. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.21>
- Dammann, F., Kirschstein, T., Guli, X., Müller, S., Porath, K., Rohde, M., Tokay, T., & Köhling, R. (2018). Bidirectional shift of group III metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic depression in the epileptic hippocampus. *Epilepsy Research*, *139*, 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.12.002>
- D'Angelo, E. (2010). Neuronal circuit function and dysfunction in the cerebellum: From neurons to integrated control. *Functional Neurology*, *25*(3), 125-127.
- Daniel, H., & Crepel, F. (2001). Control of Ca(2+) influx by cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in rat cerebellar cortex requires K(+) channels. *The Journal of Physiology*, *537*(Pt 3), 793-800. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00793.x>
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y. S., Mele, A., Fraser, C. E., Stone, E. F., Chen, C., Fak, J. J., Chi, S. W., Licatalosi, D. D., Richter, J. D., & Darnell, R. B. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, *146*(2), 247-261. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.013>
- Dasgupta, A., Lim, Y. J., Kumar, K., Baby, N., Pang, K. L. K., Benoy, A., Behnisch, T., & Sajikumar, S. (2020). Group III metabotropic glutamate receptors gate long-term potentiation and synaptic tagging/capture in rat hippocampal area CA2. *eLife*, *9*, e55344. <https://doi.org/10.7554/eLife.55344>
- Davydova, D., Marini, C., King, C., Klueva, J., Bischof, F., Romorini, S., Montenegro-Venegas, C., Heine, M., Schneider, R., Schröder, M. S., Altmann, W. D., Henneberger, C., Rusakov, D. A., Gundelfinger, E. D., & Fejtova, A. (2014). Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca(2+) channels via RIM-binding protein. *Neuron*, *82*(1), 181-194. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.012>
- De Blasi, A., Conn, P. J., Pin, J.-P., & Nicoletti, F. (2001). Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, *22*(3), 114-120. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01635-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01635-7)
- de Jeu, M., & De Zeeuw, C. I. (2012). Video-oculography in mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *65*, e3971. <https://doi.org/10.3791/3971>
- de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., & Bos, J. L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, *396*(6710), 474-477. <https://doi.org/10.1038/24884>
- de Wit, J., & Ghosh, A. (2016). Specification of synaptic connectivity by cell surface interactions. *Nature Reviews. Neuroscience*, *17*(1), 22-35. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.3>
- Deacon, R. M. J. (2013). Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *75*, 2609. <https://doi.org/10.3791/2609>
- Deng, L., Kaeser, P. S., Xu, W., & Südhof, T. C. (2011). RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. *Neuron*, *69*(2), 317-331. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.005>

- Deng, P.-Y., Rotman, Z., Blundon, J. A., Cho, Y., Cui, J., Cavalli, V., Zakharenko, S. S., & Klyachko, V. A. (2013). FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels. *Neuron*, 77(4), 696-711. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.018>
- Deng, P.-Y., Sojka, D., & Klyachko, V. A. (2011). Abnormal presynaptic short-term plasticity and information processing in a mouse model of fragile X syndrome. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(30), 10971-10982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2021-11.2011>
- Dennis, E. L., & Thompson, P. M. (2013). Mapping connectivity in the developing brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31(7), 525-542. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.05.007>
- Dev, K. K., Nakajima, Y., Kitano, J., Braithwaite, S. P., Henley, J. M., & Nakanishi, S. (2000). PICK1 Interacts with and Regulates PKC Phosphorylation of mGLUR7. *The Journal of Neuroscience*, 20(19), 7252-7257. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-19-07252.2000>
- DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annual Review of Physiology*, 69, 483-510. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749>
- D'Hooge, R., Nagels, G., Franck, F., Bakker, C. E., Reyniers, E., Storm, K., Kooy, R. F., Oostra, B. A., Willems, P. J., & De Deyn, P. P. (1997). Mildly impaired water maze performance in male Fmr1 knockout mice. *Neuroscience*, 76(2), 367-376. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00224-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00224-2)
- Díaz-Mataix, L., Piper, W. T., Schiff, H. C., Roberts, C. H., Campese, V. D., Sears, R. M., & LeDoux, J. E. (2017). Characterization of the amplificatory effect of norepinephrine in the acquisition of Pavlovian threat associations. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 24(9), 432-439. <https://doi.org/10.1101/lm.044412.116>
- Dickson, L., Teall, M., Chevalier, E., Cheung, T., Liwicki, G. M., Mack, S., Stephenson, A., White, K., Fosbeary, R., Harrison, D. C., Brice, N. L., Doyle, K., Ciccocioppo, R., Wu, C., Almond, S., Patel, T. R., Mitchell, P., Barnes, M., Ayscough, A. P., ... Bürli, R. W. (2023). Discovery of CVN636: A Highly Potent, Selective, and CNS Penetrant mGluR7 Allosteric Agonist. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 14(4), 442-449. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.2c00529>
- Dobkin, C., Rabe, A., Dumas, R., El Idrissi, A., Haubenstock, H., & Brown, W. T. (2000). Fmr1 knockout mouse has a distinctive strain-specific learning impairment. *Neuroscience*, 100(2), 423-429. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00292-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00292-x)
- Dodge, F. A., Miledi, R., & Rahamimoff, R. (1969). Strontium and quantal release of transmitter at the neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 200(1), 267-283. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1969.sp008692>
- Dolphin, A. C. (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: Physiology and pathophysiology and pharmacology. *The Journal of Physiology*, 594(19), 5369-5390. <https://doi.org/10.1113/JP272262>
- Dolphin, A. C., & Lee, A. (2020). Presynaptic calcium channels: Specialized control of synaptic neurotransmitter release. *Nature Reviews. Neuroscience*, 21(4), 213-229. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0278-2>

Bibliografía

- Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Südhof, T. C., & Rizo, J. (2005). A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: From priming to plasticity? *The EMBO Journal*, 24(16), 2839-2850. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600753>
- Dunkley, P. R., Jarvie, P. E., Heath, J. W., Kidd, G. J., & Rostas, J. A. (1986). A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Research*, 372(1), 115-129. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91464-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91464-2)
- Dunn, H. A., Patil, D. N., Cao, Y., Orlandi, C., & Martemyanov, K. A. (2018). Synaptic adhesion protein ELFN1 is a selective allosteric modulator of group III metabotropic glutamate receptors in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), 5022-5027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722498115>
- Dunn, H. A., Zucca, S., Dao, M., Orlandi, C., & Martemyanov, K. A. (2019). ELFN2 is a postsynaptic cell adhesion molecule with essential roles in controlling group III mGluRs in the brain and neuropsychiatric behavior. *Molecular Psychiatry*, 24(12), 1902-1919. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0512-3>
- Duvoisin, R. M., Villasana, L., Davis, M., Winder, D. G., & Raber, J. (2011). Opposing Roles of mGluR8 in Measures of Anxiety involving Non-Social and Social Challenges. *Behavioural brain research*, 221(1), 50-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.049>
- El Far, O., Bofill-Cardona, E., Airas, J. M., O'Connor, V., Boehm, S., Freissmuth, M., Nanoff, C., & Betz, H. (2001). Mapping of calmodulin and Gbetagamma binding domains within the C-terminal region of the metabotropic glutamate receptor 7A. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30662-30669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102573200>
- Evans, G. J. O., Wilkinson, M. C., Graham, M. E., Turner, K. M., Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2001). Phosphorylation of Cysteine String Protein by Protein Kinase A: IMPLICATIONS FOR THE MODULATION OF EXOCYTOSIS*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 47877-47885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108186200>
- Evellin, S., Nolte, J., Tysack, K., vom Dorp, F., Thiel, M., Weernink, P. A. O., Jakobs, K. H., Webb, E. J., Lomasney, J. W., & Schmidt, M. (2002). Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16805-16813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112024200>
- Fendt, M., Imobersteg, S., Peterlik, D., Chaperon, F., Mattes, C., Wittmann, C., Olpe, H.-R., Mosbacher, J., Vranesic, I., van der Putten, H., McAllister, K. H., Flor, P. J., & Gee, C. E. (2013). Differential roles of mGlu(7) and mGlu(8) in amygdala-dependent behavior and physiology. *Neuropharmacology*, 72, 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.052>
- Fendt, M., Schmid, S., Thakker, D. R., Jacobson, L. H., Yamamoto, R., Mitsukawa, K., Maier, R., Natt, F., Hüsken, D., Kelly, P. H., McAllister, K. H., Hoyer, D., van der Putten, H., Cryan, J. F., & Flor, P. J. (2008). mGluR7 facilitates extinction of aversive memories and controls amygdala plasticity. *Molecular Psychiatry*, 13(10), 970-979. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002073>
- Fenster, S. D., Chung, W. J., Zhai, R., Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A. M., Kaempfer, U., Kindler, S., Gundelfinger, E. D., & Garner, C. C. (2000). Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron*, 25(1), 203-214. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80883-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80883-1)

Ferguson, S. S., Downey, W. E., Colapietro, A. M., Barak, L. S., Ménard, L., & Caron, M. G. (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science (New York, N.Y.)*, *271*(5247), 363-366. <https://doi.org/10.1126/science.271.5247.363>

Fernandes, H. B., Riordan, S., Nomura, T., Remmers, C. L., Kraniotis, S., Marshall, J. J., Kukreja, L., Vassar, R., & Contractor, A. (2015). Epac2 Mediates cAMP-Dependent Potentiation of Neurotransmission in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *35*(16), 6544-6553. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0314-14.2015>

Ferraguti, F., Klausberger, T., Cobden, P., Baude, A., Roberts, J. D. B., Szucs, P., Kinoshita, A., Shigemoto, R., Somogyi, P., & Dalezios, Y. (2005). Metabotropic Glutamate Receptor 8-Expressing Nerve Terminals Target Subsets of GABAergic Neurons in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *25*(45), 10520-10536. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2547-05.2005>

Ferrero, J. J., Alvarez, A. M., Ramírez-Franco, J., Godino, M. C., Bartolomé-Martín, D., Aguado, C., Torres, M., Luján, R., Ciruela, F., Sánchez-Prieto, J., Ferrero, J. J., Alvarez, A. M., Ramírez-Franco, J., Godino, M. C., Bartolomé-Martín, D., Aguado, C., Torres, M., Luján, R., Ciruela, F., & Sánchez-Prieto, J. (2013). β -adrenergic receptors activate exchange protein directly activated by cAMP (Epac), translocate munc13-1, and enhance the Rab3A-RIM1 α interaction to potentiate glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(43), Article 43. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.463877>

Ferrero, J. J., Ramírez-Franco, J., Martín, R., Bartolomé-Martín, D., Torres, M., & Sánchez-Prieto, J. (2016). Cross-talk between metabotropic glutamate receptor 7 and beta adrenergic receptor signaling at cerebrocortical nerve terminals. *Neuropharmacology*, *101*, 412-425. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.025>

Ferron, L., Nieto-Rostro, M., Cassidy, J. S., & Dolphin, A. C. (2014). Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density. *Nature Communications*, *5*, 3628. <https://doi.org/10.1038/ncomms4628>

Ferron, L., Novazzi, C. G., Pilch, K. S., Moreno, C., Ramgoolam, K., & Dolphin, A. C. (2020). FMRP regulates presynaptic localization of neuronal voltage gated calcium channels. *Neurobiology of Disease*, *138*, 104779. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104779>

Ferry, B., Magistretti, P. J., & Pralong, E. (1997). Noradrenaline modulates glutamate-mediated neurotransmission in the rat basolateral amygdala in vitro. *The European Journal of Neuroscience*, *9*(7), 1356-1364. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01490.x>

Fetter, M. (2007). Vestibulo-ocular reflex. *Developments in Ophthalmology*, *40*, 35-51. <https://doi.org/10.1159/000100348>

Fioravante, D., & Regehr, W. G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, *21*(2), 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.02.003>

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE official report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, *55*(4), 475-482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>

Fiumara, F., Milanese, C., Corradi, A., Giovedì, S., Leitinger, G., Menegon, A., Montarolo, P. G., Benfenati, F., & Ghirardi, M. (2007). Phosphorylation of synapsin domain A is required for post-

Bibliografía

- tetanic potentiation. *Journal of cell science*, 120(Pt 18), 3228-3237. <https://doi.org/10.1242/jcs.012005>
- Foote, S. L., Bloom, F. E., & Aston-Jones, G. (1983). Nucleus locus ceruleus: New evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiological Reviews*, 63(3), 844-914. <https://doi.org/10.1152/physrev.1983.63.3.844>
- Freeman, J. H., & Steinmetz, A. B. (2011). Neural circuitry and plasticity mechanisms underlying delay eyeblink conditioning. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(10), 666-677. <https://doi.org/10.1101/lm.2023011>
- Frick, R. B. (1982). The ego and the vestibulocerebellar system: Some theoretical perspectives. *The Psychoanalytic Quarterly*, 51(1), 93-122.
- Friedrich, R., Gottfried, I., & Ashery, U. (2013). Munc13-1 Translocates to the Plasma Membrane in a Doc2B- and Calcium-Dependent Manner. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 119. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00119>
- Frosch, I. R., Mittal, V. A., & D'Mello, A. M. (2022). Cerebellar Contributions to Social Cognition in ASD: A Predictive Processing Framework. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnint.2022.810425>
- Fukuda, M. (2003). Distinct Rab binding specificity of Rim1, Rim2, rabphilin, and Noc2. Identification of a critical determinant of Rab3A/Rab27A recognition by Rim2. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 15373-15380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212341200>
- Gai, X., Xie, H. M., Perin, J. C., Takahashi, N., Murphy, K., Wenocur, A. S., D'arcy, M., O'Hara, R. J., Goldmuntz, E., Grice, D. E., Shaikh, T. H., Hakonarson, H., Buxbaum, J. D., Elia, J., & White, P. S. (2012). Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Molecular Psychiatry*, 17(4), 402-411. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.10>
- Galandrin, S., & Bouvier, M. (2006). Distinct Signaling Profiles of β 1 and β 2 Adrenergic Receptor Ligands toward Adenylyl Cyclase and Mitogen-Activated Protein Kinase Reveals the Pluridimensionality of Efficacy. *Molecular Pharmacology*, 70(5), 1575-1584. <https://doi.org/10.1124/mol.106.026716>
- García-Font, N., Martín, R., Torres, M., Oset-Gasque, M. J., & Sánchez-Prieto, J. (2019). The loss of β adrenergic receptor mediated release potentiation in a mouse model of fragile X syndrome. *Neurobiology of Disease*, 130, 104482. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104482>
- Geiger, J. R., Lübke, J., Roth, A., Frotscher, M., & Jonas, P. (1997). Submillisecond AMPA receptor-mediated signaling at a principal neuron-interneuron synapse. *Neuron*, 18(6), 1009-1023. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80339-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80339-6)
- Gekel, I., & Neher, E. (2008). Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(32), 7991-8002. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0268-08.2008>
- Gelinas, J. N., & Nguyen, P. V. (2005). Beta-adrenergic receptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(13), 3294-3303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4175-04.2005>

- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., & Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I: A major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4), 717-727. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90556-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90556-8)
- Gereau, R. W., & Conn, P. J. (1994). Presynaptic enhancement of excitatory synaptic transmission by beta-adrenergic receptor activation. *Journal of Neurophysiology*, 72(3), 1438-1442. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.3.1438>
- Ghali, M. G. Z., Arborelius, U. P., & Yaşargil, M. G. (2020). β -Adrenergic receptor structure and function: Molecular insights guiding the development of novel therapeutic strategies to treat malignancy. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 40(5), 395-409. <https://doi.org/10.1080/10799893.2020.1759091>
- Gilbert, P. F., & Thach, W. T. (1977). Purkinje cell activity during motor learning. *Brain Research*, 128(2), 309-328. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90997-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90997-0)
- Gioia, D. A., Alexander, N. J., & McCool, B. A. (2016). Differential Expression of Munc13-2 Produces Unique Synaptic Phenotypes in the Basolateral Amygdala of C57BL/6J and DBA/2J Mice. *The Journal of Neuroscience*, 36(43), 10964-10977. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1785-16.2016>
- Girard, B., Tuduri, P., Moreno, M. P., Sakkaki, S., Barboux, C., Bouschet, T., Varrault, A., Vitre, J., McCort-Tranchepain, I., Dairou, J., Acher, F., Fagni, L., Marchi, N., Perroy, J., & Bertaso, F. (2019). The mGlu7 receptor provides protective effects against epileptogenesis and epileptic seizures. *Neurobiology of Disease*, 129, 13-28. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.04.016>
- Giraudo, C. G., Garcia-Diaz, A., Eng, W. S., Yamamoto, A., Melia, T. J., & Rothman, J. E. (2008). Distinct Domains of Complexins Bind SNARE Complexes and Clamp Fusion in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 21211-21219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803478200>
- Gloerich, M., & Bos, J. L. (2010). Epac: Defining a new mechanism for cAMP action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 355-375. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105714>
- Goda, Y., & Stevens, C. F. (1994). Two components of transmitter release at a central synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12942-12946.
- Goddyn, H., Callaerts-Vegh, Z., & D'Hooge, R. (2015). Functional Dissociation of Group III Metabotropic Glutamate Receptors Revealed by Direct Comparison between the Behavioral Profiles of Knockout Mouse Lines. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(11), pyv053. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv053>
- Godino, M. del C., Torres, M., & Sánchez-Prieto, J. (2007). CB1 receptors diminish both Ca²⁺ influx and glutamate release through two different mechanisms active in distinct populations of cerebrocortical nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*, 101(6), 1471-1482. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04422.x>
- Gou, X.-Z., Ramsey, A. M., & Tang, A.-H. (2022). Re-examination of the determinants of synaptic strength from the perspective of superresolution imaging. *Current Opinion in Neurobiology*, 74, 102540. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102540>

Bibliografía

- Goudet, C., Vilar, B., Courtiol, T., Deltheil, T., Bessiron, T., Brabet, I., Oueslati, N., Rigault, D., Bertrand, H.-O., McLean, H., Daniel, H., Amalric, M., Acher, F., & Pin, J.-P. (2012). A novel selective metabotropic glutamate receptor 4 agonist reveals new possibilities for developing subtype selective ligands with therapeutic potential. *The FASEB Journal*, *26*(4), 1682-1693. <https://doi.org/10.1096/fj.11-195941>
- Gould, T. J. (1998). Beta-adrenergic involvement in acquisition vs. Extinction of a classically conditioned eye blink response in rabbits. *Brain Research*, *780*(1), 174-177.
- Gracheva, E. O., Hadwiger, G., Nonet, M. L., & Richmond, J. E. (2008). DIRECT INTERACTIONS BETWEEN C. ELEGANS RAB-3 AND RIM PROVIDE A MECHANISM TO TARGET VESICLES TO THE PRESYNAPTIC DENSITY. *Neuroscience letters*, *444*(2), 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.08.026>
- Graham, R. M. (1990). Adrenergic receptors: Structure and function. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, *57*(5), 481-491. <https://doi.org/10.3949/ccjm.57.5.481>
- Grasselli, G., He, Q., Wan, V., Adelman, J. P., Ohtsuki, G., & Hansel, C. (2016). Activity-Dependent Plasticity of Spike Pauses in Cerebellar Purkinje Cells. *Cell Reports*, *14*(11), 2546-2553. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.054>
- Gray, C. L., Krebs-Kraft, D. L., Solomon, M. B., Norvelle, A., Parent, M. B., & Huhman, K. L. (2015). Immediate post-defeat infusions of the noradrenergic receptor antagonist propranolol impair the consolidation of conditioned defeat in male Syrian hamsters. *Physiology & Behavior*, *152*(Pt A), 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.09.010>
- Gray, E. G. (1963). Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *Journal of Anatomy*, *97*(Pt 1), 101-106.
- Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5544), 1024-1030. <https://doi.org/10.1126/science.294.5544.1024>
- Gruart, A., Muñoz, M. D., & Delgado-García, J. M. (2006). Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(4), 1077-1087. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2834-05.2006>
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry*, *260*(6), 3440-3450.
- Gundelfinger, E. D., & Fejtova, A. (2012). Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(3), 423-430. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.005>
- Guo, A., Feng, J.-Y., Li, J., Ding, N., Li, Y.-J., Qiu, D.-L., Piao, R.-L., & Chu, C.-P. (2016). Effects of norepinephrine on spontaneous firing activity of cerebellar Purkinje cells in vivo in mice. *Neuroscience Letters*, *629*, 262-266. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.058>
- Guo, J., Ge, J., Hao, M., Sun, Z., Wu, X., Zhu, J., Wang, W., Yao, P., Lin, W., & Xue, L. (2015). A Three-Pool Model Dissecting Readily Releasable Pool Replenishment at the Calyx of Held. *Scientific Reports*, *5*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep09517>

- Gutierrez-Castellanos, N., Da Silva-Matos, C. M., Zhou, K., Canto, C. B., Renner, M. C., Koene, L. M. C., Ozyildirim, O., Sprengel, R., Kessels, H. W., & De Zeeuw, C. I. (2017). Motor Learning Requires Purkinje Cell Synaptic Potentiation through Activation of AMPA-Receptor Subunit GluA3. *Neuron*, *93*(2), 409-424. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.046>
- Habrian, C. H., Levitz, J., Vyklicky, V., Fu, Z., Hoagland, A., McCort-Tranchepain, I., Acher, F., & Isacoff, E. Y. (2019). Conformational pathway provides unique sensitivity to a synaptic mGluR. *Nature Communications*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13407-8>
- Hagena, H., Hansen, N., & Manahan-Vaughan, D. (2016). β -Adrenergic Control of Hippocampal Function: Subserving the Choreography of Synaptic Information Storage and Memory. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *26*(4), 1349-1364. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv330>
- Hagerman, P. J., & Hagerman, R. J. (2015). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1338*(1), 58-70. <https://doi.org/10.1111/nyas.12693>
- Hagerman, R. J., Berry-Kravis, E., Hazlett, H. C., Bailey, D. B., Moine, H., Kooy, R. F., Tassone, F., Gantois, I., Sonenberg, N., Mandel, J. L., & Hagerman, P. J. (2017). Fragile X syndrome. *Nature Reviews. Disease Primers*, *3*, 17065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.65>
- Hagerman, R. J., & Hagerman, P. J. (2008). Testing for Fragile X Gene Mutations Throughout the Life Span. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, *300*(20), 2419-2421. <https://doi.org/10.1001/jama.2008.684>
- Hama, H., Hara, C., Yamaguchi, K., & Miyawaki, A. (2004). PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*, *41*(3), 405-415. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00007-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00007-8)
- Hamada, S., & Ohtsuka, T. (2018). CAST: Its molecular structure and phosphorylation-dependent regulation of presynaptic plasticity. *Neuroscience Research*, *127*, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.12.005>
- Han, Y., Kaeser, P. S., Südhof, T. C., & Schneggenburger, R. (2011). RIM determines Ca²⁺ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron*, *69*(2), 304-316. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.014>
- Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., & Heuser, J. E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, *90*(3), 523-535. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80512-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80512-7)
- Heine, M., & Holcman, D. (2020). Asymmetry Between Pre- and Postsynaptic Transient Nanodomains Shapes Neuronal Communication. *Trends in Neurosciences*, *43*(3), 182-196. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.01.005>
- Hell, J. W., Yokoyama, C. T., Breeze, L. J., Chavkin, C., & Catterall, W. A. (1995). Phosphorylation of presynaptic and postsynaptic calcium channels by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. *The EMBO Journal*, *14*(13), 3036-3044.
- Herbst, S., Lipstein, N., Jahn, O., & Sinz, A. (2014). Structural insights into calmodulin/Munc13 interaction. *Biological Chemistry*, *395*(7-8), 763-768. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0134>
- Herrero, I., Miras-Portugal, M. T., & Sánchez-Prieto, J. (1998). Functional switch from facilitation to inhibition in the control of glutamate release by metabotropic glutamate receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(4), 1951-1958. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.1951>

Bibliografía

- Herrero, I., & Sánchez-Prieto, J. (1996). cAMP-dependent Facilitation of Glutamate Release by β -Adrenergic Receptors in Cerebrocortical Nerve Terminals *. *Journal of Biological Chemistry*, 271(48), 30554-30560. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30554>
- Hibino, H., Pironkova, R., Onwumere, O., Vologodskaja, M., Hudspeth, A. J., & Lesage, F. (2002). RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca(2+) channels. *Neuron*, 34(3), 411-423. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00667-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00667-0)
- Hijazi, S., Smit, A. B., & van Kesteren, R. E. (2023). Fast-spiking parvalbumin-positive interneurons in brain physiology and Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02168-y>
- Hikichi, H., Murai, T., Okuda, S., Maehara, S., Satow, A., Ise, S., Nishino, M., Suzuki, G., Takehana, H., Hata, M., & Ohta, H. (2010). Effects of a novel metabotropic glutamate receptor 7 negative allosteric modulator, 6-(4-methoxyphenyl)-5-methyl-3-pyridin-4-ylisoxazonolo[4,5-c]pyridin-4(5H)-one (MMPIP), on the central nervous system in rodents. *European Journal of Pharmacology*, 639(1-3), 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.047>
- Hinton, R., Budimirovic, D. B., Marschik, P. B., Talisa, V. B., Einspieler, C., Gipson, T., & Johnston, M. V. (2013). Parental reports on early language and motor milestones in fragile X syndrome with and without autism spectrum disorders. *Developmental Neurorehabilitation*, 16(1), 58-66. <https://doi.org/10.3109/17518423.2012.704414>
- Hirano, T. (2018). Regulation and Interaction of Multiple Types of Synaptic Plasticity in a Purkinje Neuron and Their Contribution to Motor Learning. *Cerebellum (London, England)*, 17(6), 756-765. <https://doi.org/10.1007/s12311-018-0963-0>
- Hirono, M., Matsunaga, W., Chimura, T., & Obata, K. (2008). Developmental enhancement of alpha2-adrenoceptor-mediated suppression of inhibitory synaptic transmission onto mouse cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience*, 156(1), 143-154. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.018>
- Ho, S., Lajaunie, R., Lerat, M., Le, M., Crépel, V., Loulier, K., Livet, J., Kessler, J.-P., & Marcaggi, P. (2021). A stable proportion of Purkinje cell inputs from parallel fibers are silent during cerebellar maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(45), e2024890118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2024890118>
- Hoffmann, C., Leitz, M. R., Oberdorf-Maass, S., Lohse, M. J., & Klotz, K.-N. (2004). Comparative pharmacology of human β -adrenergic receptor subtypes—Characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369(2), 151-159. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0860-y>
- Hoivik, E. A., Witsoe, S. L., Bergheim, I. R., Xu, Y., Jakobsson, I., Tengholm, A., Doskeland, S. O., & Bakke, M. (2013). DNA methylation of alternative promoters directs tissue specific expression of Epac2 isoforms. *PLoS One*, 8(7), e67925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067925>
- Holderith, N., Aldahabi, M., & Nusser, Z. (2021). Selective Enrichment of Munc13-2 in Presynaptic Active Zones of Hippocampal Pyramidal Cells That Innervate mGluR1 α Expressing Interneurons. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 13, 773209. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.773209>

- Holz, G. G., Kang, G., Harbeck, M., Roe, M. W., & Chepurny, O. G. (2006). Cell physiology of cAMP sensor Epac. *The Journal of Physiology*, 577(1), 5-15. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.119644>
- Hong, S. M., Liu, Z., Fan, Y., Neumann, M., Won, S. J., Lac, D., Lum, X., Weinstein, P. R., & Liu, J. (2007). Reduced hippocampal neurogenesis and skill reaching performance in adult Emx1 mutant mice. *Experimental Neurology*, 206(1), 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.03.028>
- Hoogland, T. M., & Saggau, P. (2004). Facilitation of L-type Ca²⁺ channels in dendritic spines by activation of beta2 adrenergic receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(39), 8416-8427. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1677-04.2004>
- Hosaka, M., Hammer, R. E., & Südhof, T. C. (1999). A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron*, 24(2), 377-387. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80851-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80851-x)
- Hosoi, N., Holt, M., & Sakaba, T. (2009). Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse. *Neuron*, 63(2), 216-229. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.010>
- Hosoi, N., Sakaba, T., & Neher, E. (2007). Quantitative analysis of calcium-dependent vesicle recruitment and its functional role at the calyx of Held synapse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(52), 14286-14298. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4122-07.2007>
- Hoxha, E., Tempia, F., Lippiello, P., & Miniaci, M. C. (2016). Modulation, Plasticity and Pathophysiology of the Parallel Fiber-Purkinje Cell Synapse. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8, 35. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00035>
- Hu, H., & Jonas, P. (2014). A supercritical density of Na(+) channels ensures fast signaling in GABAergic interneuron axons. *Nature Neuroscience*, 17(5), 686-693. <https://doi.org/10.1038/nn.3678>
- Hu, S.-H., Latham, C. F., Gee, C. L., James, D. E., & Martin, J. L. (2007). Structure of the Munc18c/Syntaxin4 N-peptide complex defines universal features of the N-peptide binding mode of Sec1/Munc18 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 8773-8778. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701124104>
- Huang, C. C., Hsu, K. S., & Gean, P. W. (1996). Isoproterenol potentiates synaptic transmission primarily by enhancing presynaptic calcium influx via P- and/or Q-type calcium channels in the rat amygdala. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 1026-1033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01026.1996>
- Huang, C.-C., & Hsu, K.-S. (2006a). Presynaptic mechanism underlying cAMP-induced synaptic potentiation in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *Molecular Pharmacology*, 69(3), 846-856. <https://doi.org/10.1124/mol.105.018093>
- Huang, Y. Y., & Kandel, E. R. (1996). Modulation of both the early and the late phase of mossy fiber LTP by the activation of beta-adrenergic receptors. *Neuron*, 16(3), 611-617. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80080-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80080-x)

Bibliografía

- Huang, Y. Y., Li, X. C., & Kandel, E. R. (1994). cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell*, 79(1), 69-79. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90401-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90401-4)
- Iida, S., & Potter, J. D. (1986). Calcium binding to calmodulin. Cooperativity of the calcium-binding sites. *Journal of Biochemistry*, 99(6), 1765-1772. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135654>
- Inoshita, T., & Hirano, T. (2021). Norepinephrine Facilitates Induction of Long-term Depression through β -Adrenergic Receptor at Parallel Fiber-to-Purkinje Cell Synapses in the Flocculus. *Neuroscience*, 462, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.05.037>
- Isaacson, J. S., & Scanziani, M. (2011). How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*, 72(2), 231-243. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.027>
- Iscru, E., Goddyn, H., Ahmed, T., Callaerts-Vegh, Z., D'Hooge, R., & Balschun, D. (2013). Improved spatial learning is associated with increased hippocampal but not prefrontal long-term potentiation in mGluR4 knockout mice. *Genes, Brain, and Behavior*, 12(6), 615-625. <https://doi.org/10.1111/gbb.12052>
- Ishiyama, S., Schmidt, H., Cooper, B. H., Brose, N., & Eilers, J. (2014). Munc13-3 superprimes synaptic vesicles at granule cell-to-basket cell synapses in the mouse cerebellum. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(44), 14687-14696. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2060-14.2014>
- Isope, P., & Barbour, B. (2002). Properties of Unitary Granule Cell→Purkinje Cell Synapses in Adult Rat Cerebellar Slices. *The Journal of Neuroscience*, 22(22), 9668-9678. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-22-09668.2002>
- Ito, M. (2002). Historical review of the significance of the cerebellum and the role of Purkinje cells in motor learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 978, 273-288. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb07574.x>
- Ivanova, D., Dirks, A., Montenegro-Venegas, C., Schöne, C., Altmann, W. D., Marini, C., Frischknecht, R., Schanze, D., Zenker, M., Gundelfinger, E. D., & Fejtova, A. (2015). Synaptic activity controls localization and function of CtBP1 via binding to Bassoon and Piccolo. *The EMBO Journal*, 34(8), 1056-1077. <https://doi.org/10.15252/embj.201488796>
- Jackman, S. L., & Regehr, W. G. (2017). The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron*, 94(3), 447-464. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.047>
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006). SNAREs—Engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrm2002>
- Jalan-Sakrikar, N., Field, J. R., Klar, R., Mattmann, M. E., Gregory, K. J., Zamorano, R., Engers, D. W., Bollinger, S. R., Weaver, C. D., Days, E. L., Lewis, L. M., Utley, T. J., Hurtado, M., Rigault, D., Acher, F., Walker, A. G., Melancon, B. J., Wood, M. R., Lindsley, C. W., ... Niswender, C. M. (2014). Identification of Positive Allosteric Modulators VU0155094 (ML397) and VU0422288 (ML396) Reveals New Insights into the Biology of Metabotropic Glutamate Receptor 7. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(12), 1221-1237. <https://doi.org/10.1021/cn500153z>
- Jami, S. A., Wilkinson, B. J., Guglietta, R., Hartel, N., Babiec, W. E., Graham, N. A., Coba, M. P., & O'Dell, T. J. (2023). Functional and phosphoproteomic analysis of β -adrenergic receptor signaling

- at excitatory synapses in the CA1 region of the ventral hippocampus. *Scientific Reports*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34401-7>
- Ji, J.-Z., Wang, X.-M., & Li, B.-M. (2003). Deficit in long-term contextual fear memory induced by blockade of beta-adrenoceptors in hippocampal CA1 region. *The European Journal of Neuroscience*, 17(9), 1947-1952. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02620.x>
- Ji, J.-Z., Zhang, X.-H., & Li, B.-M. (2003). Deficient spatial memory induced by blockade of beta-adrenoceptors in the hippocampal CA1 region. *Behavioral Neuroscience*, 117(6), 1378-1384. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.6.1378>
- Ji, X.-H., Cao, X.-H., Zhang, C.-L., Feng, Z.-J., Zhang, X.-H., Ma, L., & Li, B.-M. (2008). Pre- and postsynaptic beta-adrenergic activation enhances excitatory synaptic transmission in layer V/VI pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex of rats. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 18(7), 1506-1520. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm177>
- Junge, H. J., Rhee, J.-S., Jahn, O., Varoqueaux, F., Spiess, J., Waxham, M. N., Rosenmund, C., & Brose, N. (2004). Calmodulin and Munc13 form a Ca²⁺ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell*, 118(3), 389-401. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.029>
- Kaesler, P. S., Deng, L., Fan, M., & Südhof, T. C. (2012). RIM genes differentially contribute to organizing presynaptic release sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11830-11835. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209318109>
- Kaesler, P. S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J., & Südhof, T. C. (2011). RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell*, 144(2), 282-295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.029>
- Kaesler, P. S., Kwon, H.-B., Blundell, J., Chevaleyre, V., Morishita, W., Malenka, R. C., Powell, C. M., Castillo, P. E., & Südhof, T. C. (2008). RIM1 α phosphorylation at serine-413 by protein kinase A is not required for presynaptic long-term plasticity or learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14680-14685. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806679105>
- Kaesler, P. S., & Regehr, W. G. (2017). The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Current Opinion in Neurobiology*, 43, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.12.012>
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544), 1030-1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kaneko, M., & Takahashi, T. (2004). Presynaptic Mechanism Underlying cAMP-Dependent Synaptic Potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 24(22), 5202-5208. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0999-04.2004>
- Kat, R., Arroyo-Araujo, M., de Vries, R. B. M., Koopmans, M. A., de Boer, S. F., & Kas, M. J. H. (2022). Translational validity and methodological underreporting in animal research: A systematic review and meta-analysis of the Fragile X syndrome (Fmr1 KO) rodent model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 139, 104722. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104722>
- Katz, B., & Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of Physiology*, 195(2), 481-492. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008469>

Bibliografía

- Kauppinen, R. A., & Nicholls, D. G. (1986). Failure to Maintain Glycolysis in Anoxic Nerve Terminals. *Journal of Neurochemistry*, 47(6), 1864-1869. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb13100.x>
- Kavalali, E. T. (2015). The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(1), 5-16. <https://doi.org/10.1038/nrn3875>
- Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E., & Graybiel, A. M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5397), 2275-2279. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2275>
- Kelley, D. J., Davidson, R. J., Elliott, J. L., Lahvis, G. P., Yin, J. C. P., & Bhattacharyya, A. (2007). The cyclic AMP cascade is altered in the fragile X nervous system. *PloS One*, 2(9), e931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000931>
- Kerr, A. M., Reisinger, E., & Jonas, P. (2008). Differential dependence of phasic transmitter release on synaptotagmin 1 at GABAergic and glutamatergic hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15581-15586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800621105>
- Khalil, V., Faress, I., Mermet-Joret, N., Kerwin, P., Yonehara, K., & Nabavi, S. (2023). Subcortico-amygdala pathway processes innate and learned threats. *eLife*, 12, e85459. <https://doi.org/10.7554/eLife.85459>
- Khandjian, E. W., Robert, C., & Davidovic, L. (2022). FMRP, a multifunctional RNA-binding protein in quest of a new identity. *Frontiers in Genetics*, 13, 976480. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.976480>
- Kim, C.-H., Oh, S.-H., Lee, J. H., Chang, S. O., Kim, J., & Kim, S. J. (2012). Lobule-specific membrane excitability of cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 2), 273-288. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.221846>
- Kim, E. J., Pellman, B., & Kim, J. J. (2015). Stress effects on the hippocampus: A critical review. *Learning & Memory*, 22(9), 411-416. <https://doi.org/10.1101/lm.037291.114>
- Kim, K., Yang, J., & Kim, E. (2010). Diacylglycerol kinases in the regulation of dendritic spines. *Journal of Neurochemistry*, 112(3), 577-587. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06499.x>
- Kinoshita, A., Shigemoto, R., Ohishi, H., van der Putten, H., & Mizuno, N. (1998). Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: A light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 393(3), 332-352.
- Kintscher, M., Wozny, C., Johenning, F. W., Schmitz, D., & Breustedt, J. (2013). Role of RIM1 α in short- and long-term synaptic plasticity at cerebellar parallel fibres. *Nature Communications*, 4, 2392. <https://doi.org/10.1038/ncomms3392>
- Kitagawa, Y., Hirano, T., & Kawaguchi, S. (2009). Prediction and validation of a mechanism to control the threshold for inhibitory synaptic plasticity. *Molecular Systems Biology*, 5, 280. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.39>
- Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., Beedle, A. M., Mori, E., Hara, Y., De Waard, M., Kanagawa, M., Itakura, M., Takahashi, M., Campbell, K. P., & Mori, Y. (2007).

- RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nature Neuroscience*, 10(6), 691-701. <https://doi.org/10.1038/nn1904>
- Klar, R., Walker, A. G., Ghose, D., Grueter, B. A., Engers, D. W., Hopkins, C. R., Lindsley, C. W., Xiang, Z., Conn, P. J., & Niswender, C. M. (2015). Activation of Metabotropic Glutamate Receptor 7 Is Required for Induction of Long-Term Potentiation at SC-CA1 Synapses in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(19), 7600-7615. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4543-14.2015>
- Klausberger, T., Magill, P. J., Márton, L. F., Roberts, J. D. B., Cobden, P. M., Buzsáki, G., & Somogyi, P. (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature*, 421(6925), 844-848. <https://doi.org/10.1038/nature01374>
- Kleim, J. A., Hogg, T. M., VandenBerg, P. M., Cooper, N. R., Bruneau, R., & Remple, M. (2004). Cortical synaptogenesis and motor map reorganization occur during late, but not early, phase of motor skill learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(3), 628-633. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3440-03.2004>
- Klemmer, P., Meredith, R. M., Holmgren, C. D., Klychnikov, O. I., Stahl-Zeng, J., Loos, M., van der Schors, R. C., Wortel, J., de Wit, H., Spijker, S., Rotaru, D. C., Mansvelder, H. D., Smit, A. B., & Li, K. W. (2011). Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25495-25504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210260>
- Kobayashi, M., Kojima, M., Koyanagi, Y., Adachi, K., Imamura, K., & Koshikawa, N. (2009). Presynaptic and postsynaptic modulation of glutamatergic synaptic transmission by activation of alpha(1)- and beta-adrenoceptors in layer V pyramidal neurons of rat cerebral cortex. *Synapse (New York, N.Y.)*, 63(4), 269-281. <https://doi.org/10.1002/syn.20604>
- Koch, H., Hofmann, K., & Brose, N. (2000). Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *Biochemical Journal*, 349(Pt 1), 247-253.
- Koekkoek, S. K. E., Yamaguchi, K., Milojkovic, B. A., Dortland, B. R., Ruigrok, T. J. H., Maex, R., De Graaf, W., Smit, A. E., VanderWerf, F., Bakker, C. E., Willemsen, R., Ikeda, T., Kakizawa, S., Onodera, K., Nelson, D. L., Mientjes, E., Joosten, M., De Schutter, E., Oostra, B. A., ... De Zeeuw, C. I. (2005). Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. *Neuron*, 47(3), 339-352. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.07.005>
- Koga, K., Liu, M.-G., Qiu, S., Song, Q., O'Den, G., Chen, T., & Zhuo, M. (2015). Impaired presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of Fmr1 knock-out mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(5), 2033-2043. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2644-14.2015>
- Koushika, S. P., Richmond, J. E., Hadwiger, G., Weimer, R. M., Jorgensen, E. M., & Nonet, M. L. (2001). A post-docking role for active zone protein Rim. *Nature Neuroscience*, 4(10), 997-1005. <https://doi.org/10.1038/nn732>
- Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, 29(3), 717-727. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00246-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00246-x)

Bibliografía

Krook-Magnuson, E., Armstrong, C., Oijala, M., & Soltesz, I. (2013). On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nature Communications*, 4, 1376. <https://doi.org/10.1038/ncomms2376>

Kusch, V., Bornschein, G., Loreth, D., Bank, J., Jordan, J., Baur, D., Watanabe, M., Kulik, A., Heckmann, M., Eilers, J., & Schmidt, H. (2018). Munc13-3 Is Required for the Developmental Localization of Ca²⁺ Channels to Active Zones and the Nanopositioning of Cav2.1 Near Release Sensors. *Cell Reports*, 22(8), 1965-1973. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.010>

Kyuyoung, C. L., & Huguenard, J. R. (2014). Modulation of short-term plasticity in the corticothalamic circuit by group III metabotropic glutamate receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(2), 675-687. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1477-13.2014>

Ladera, C., Godino, M. D. C., Martín, R., Luján, R., Shigemoto, R., Ciruela, F., Torres, M., & Sánchez-Prieto, J. (2007). The coexistence of multiple receptors in a single nerve terminal provides evidence for pre-synaptic integration. *Journal of Neurochemistry*, 103(6), 2314-2326. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04964.x>

Langnaese, K., Seidenbecher, C., Wex, H., Seidel, B., Hartung, K., Appeltauer, U., Garner, A., Voss, B., Mueller, B., Garner, C. C., & Gundelfinger, E. D. (1996). Protein components of a rat brain synaptic junctional protein preparation. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 42(1), 118-122. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(96\)00147-7](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(96)00147-7)

Larson, J., Kim, D., Patel, R. C., & Floreani, C. (2008). Olfactory discrimination learning in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 90.

Lee, K. (2021). Epac: New emerging cAMP-binding protein. *BMB Reports*, 54(3), 149-156. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.3.233>

Lee, K. H., Chatila, T. A., Ram, R. A., & Thompson, R. F. (2009). Impaired memory of eyeblink conditioning in CaMKIV KO mice. *Behavioral Neuroscience*, 123(2), 438-442. <https://doi.org/10.1037/a0014724>

Lehr, A. B., Kumar, A., Tetzlaff, C., Hafting, T., Fyhn, M., & Stöber, T. M. (2021). CA2 beyond social memory: Evidence for a fundamental role in hippocampal information processing. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 126, 398-412. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.020>

Leerma, J., & Marques, J. M. (2013). Kainate Receptors in Health and Disease. *Neuron*, 80(2), 292-311. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.045>

Li, X., Gardner, E. L., & Xi, Z.-X. (2008). The Metabotropic Glutamate Receptor 7 (mGluR7) Allosteric Agonist AMN082 Modulates Nucleus Accumbens GABA and Glutamate, but not Dopamine, in Rats. *Neuropharmacology*, 54(3), 542-551. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.11.005>

Limperopoulos, C., Bassan, H., Gauvreau, K., Robertson, R. L., Sullivan, N. R., Benson, C. B., Avery, L., Stewart, J., Soul, J. S., Ringer, S. A., Volpe, J. J., & duPlessis, A. J. (2007). Does cerebellar injury in premature infants contribute to the high prevalence of long-term cognitive, learning, and behavioral disability in survivors? *Pediatrics*, 120(3), 584-593. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-1041>

- Linden, D. J., & Ahn, S. (1999). Activation of presynaptic cAMP-dependent protein kinase is required for induction of cerebellar long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(23), 10221-10227. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10221.1999>
- Lippiello, P., Hoxha, E., Volpicelli, F., Lo Duca, G., Tempia, F., & Miniaci, M. C. (2015). Noradrenergic modulation of the parallel fiber-Purkinje cell synapse in mouse cerebellum. *Neuropharmacology*, *89*, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.08.016>
- Lipstein, N., Chang, S., Lin, K.-H., López-Murcia, F. J., Neher, E., Taschenberger, H., & Brose, N. (2021). Munc13-1 is a Ca²⁺-phospholipid-dependent vesicle priming hub that shapes synaptic short-term plasticity and enables sustained neurotransmission. *Neuron*, *109*(24), 3980-4000.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.09.054>
- Lipstein, N., Sakaba, T., Cooper, B. H., Lin, K.-H., Strenzke, N., Ashery, U., Rhee, J.-S., Taschenberger, H., Neher, E., & Brose, N. (2013). Dynamic control of synaptic vesicle replenishment and short-term plasticity by Ca²⁺-calmodulin-Munc13-1 signaling. *Neuron*, *79*(1), 82-96. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.011>
- Liu, K. S. Y., Siebert, M., Mertel, S., Knoche, E., Wegener, S., Wichmann, C., Matkovic, T., Muhammad, K., Depner, H., Mettke, C., Bückers, J., Hell, S. W., Müller, M., Davis, G. W., Schmitz, D., & Sigrist, S. J. (2011). RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6062), 1565-1569. <https://doi.org/10.1126/science.1212991>
- Liu, Y., Yang, X. J., Xia, H., Tang, C.-M., & Yang, K. (2019). GABA releases from parvalbumin-expressing and unspecific GABAergic neurons onto CA1 pyramidal cells are differentially modulated by presynaptic GABAB receptors in mouse hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *520*(2), 449-452. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.044>
- Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, D., Dong, R., Yang, X., Tammimies, K., Uddin, M., Scherer, S. W., & Gai, Z. (2015). Rare de novo deletion of metabotropic glutamate receptor 7 (GRM7) gene in a patient with autism spectrum disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, *168B*(4), 258-264. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32306>
- Loesch, D. Z., Tassone, F., Atkinson, A., Stimpson, P., Trost, N., Pountney, D. L., & Storey, E. (2021). Differential Progression of Motor Dysfunction Between Male and Female Fragile X Premutation Carriers Reveals Novel Aspects of Sex-Specific Neural Involvement. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 577246. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.577246>
- Lonart, G., Schoch, S., Kaeser, P. S., Larkin, C. J., Südhof, T. C., & Linden, D. J. (2003a). Phosphorylation of RIM1alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses. *Cell*, *115*(1), 49-60. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00727-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00727-x)
- Lu, J., Li, H., Wang, Y., Südhof, T. C., & Rizo, J. (2005). Solution structure of the RIM1alpha PDZ domain in complex with an ELKS1b C-terminal peptide. *Journal of Molecular Biology*, *352*(2), 455-466. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.047>
- Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1999). Beta-arrestin-

Bibliografía

dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5402), 655-661. <https://doi.org/10.1126/science.283.5402.655>

Macek, T. A., Schaffhauser, H., & Conn, P. J. (1998). Protein Kinase C and A3 Adenosine Receptor Activation Inhibit Presynaptic Metabotropic Glutamate Receptor (mGluR) Function and Uncouple mGluRs from GTP-Binding Proteins. *The Journal of Neuroscience*, 18(16), 6138-6146. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-16-06138.1998>

MacLellan, C. L., Gyawali, S., & Colbourne, F. (2006). Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. *Behavioural Brain Research*, 175(1), 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.001>

Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., & Kano, M. (2001). Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*, 31(3), 463-475. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00375-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00375-0)

Magupalli, V. G., Schwarz, K., Alpadi, K., Natarajan, S., Seigel, G. M., & Schmitz, F. (2008). Multiple RIBEYE-RIBEYE interactions create a dynamic scaffold for the formation of synaptic ribbons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(32), 7954-7967. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1964-08.2008>

Marafi, D., Mitani, T., Isikay, S., Hertecant, J., Almannai, M., Manickam, K., Abou Jamra, R., El-Hattab, A. W., Rajah, J., Fatih, J. M., Du, H., Karaca, E., Bayram, Y., Punetha, J., Rosenfeld, J. A., Jhangiani, S. N., Boerwinkle, E., Akdemir, Z. C., Erdin, S., ... Lupski, J. R. (2020). Biallelic GRM7 variants cause epilepsy, microcephaly, and cerebral atrophy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 7(5), 610-627. <https://doi.org/10.1002/acn3.51003>

Martin, N. P., Whalen, E. J., Zamah, M. A., Pierce, K. L., & Lefkowitz, R. J. (2004). PKA-mediated phosphorylation of the beta1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cellular Signalling*, 16(12), 1397-1403. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.05.002>

Martín, R., Bartolomé-Martín, D., Torres, M., & Sánchez-Prieto, J. (2011). Non-additive potentiation of glutamate release by phorbol esters and metabotropic mGlu7 receptor in cerebrocortical nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*, 116(4), 476-485. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07134.x>

Martín, R., Durroux, T., Ciruela, F., Torres, M., Pin, J.-P., & Sánchez-Prieto, J. (2010). The Metabotropic Glutamate Receptor mGlu7 Activates Phospholipase C, Translocates Munc-13-1 Protein, and Potentiates Glutamate Release at Cerebrocortical Nerve Terminals. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17907-17917. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080838>

Martín, R., Ferrero, J. J., Collado-Alsina, A., Aguado, C., Luján, R., Torres, M., & Sánchez-Prieto, J. (2018). Bidirectional modulation of glutamatergic synaptic transmission by metabotropic glutamate type 7 receptors at Schaffer collateral-CA1 hippocampal synapses. *The Journal of Physiology*, 596(5), 921-940. <https://doi.org/10.1113/JP275371>

Martín, R., Torres, M., & Sánchez-Prieto, J. (2007). mGluR7 inhibits glutamate release through a PKC-independent decrease in the activity of P/Q-type Ca²⁺ channels and by diminishing cAMP in hippocampal nerve terminals. *The European Journal of Neuroscience*, 26(2), 312-322. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05660.x>

- Martina, M., & Jonas, P. (1997). Functional differences in Na⁺ channel gating between fast-spiking interneurons and principal neurons of rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, *505* (Pt 3)(Pt 3), 593-603. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.593ba.x>
- Martínez-Cerdeño, V. (2017). Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Developmental Neurobiology*, *77*(4), 393-404. <https://doi.org/10.1002/dneu.22417>
- Mato, S., Lafourcade, M., Robbe, D., Bakiri, Y., & Manzoni, O. J. (2008). Role of the cyclic-AMP/PKA cascade and of P/Q-type Ca⁺⁺ channels in endocannabinoid-mediated long-term depression in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, *54*(1), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.04.014>
- Maurin, T., Lebrigand, K., Castagnola, S., Paquet, A., Jarjat, M., Popa, A., Grossi, M., Rage, F., & Bardoni, B. (2018). HITS-CLIP in various brain areas reveals new targets and new modalities of RNA binding by fragile X mental retardation protein. *Nucleic Acids Research*, *46*(12), 6344-6355. <https://doi.org/10.1093/nar/gky267>
- Maurin, T., Melancia, F., Jarjat, M., Castro, L., Costa, L., Delhayé, S., Khayachi, A., Castagnola, S., Mota, E., Di Giorgio, A., Servadio, M., Drozd, M., Poupon, G., Schiavi, S., Sardone, L., Azoulay, S., Ciranna, L., Martin, S., Vincent, P., ... Bardoni, B. (2019). Involvement of Phosphodiesterase 2A Activity in the Pathophysiology of Fragile X Syndrome. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *29*(8), 3241-3252. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy192>
- Maus, L., Lee, C., Altas, B., Sertel, S. M., Weyand, K., Rizzoli, S. O., Rhee, J., Brose, N., Imig, C., & Cooper, B. H. (2020). Ultrastructural Correlates of Presynaptic Functional Heterogeneity in Hippocampal Synapses. *Cell Reports*, *30*(11), 3632-3643.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.083>
- McKiernan, C. J., Brondyk, W. H., & Macara, I. G. (1993). The Rab3A GTPase interacts with multiple factors through the same effector domain. Mutational analysis of cross-linking of Rab3A to a putative target protein. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(32), 24449-24452. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)80546-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)80546-8)
- McMahon, H. T., Barrie, A. P., Lowe, M., & Nicholls, D. G. (1989). Glutamate release from guinea-pig synaptosomes: Stimulation by reuptake-induced depolarization. *Journal of Neurochemistry*, *53*(1), 71-79. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07296.x>
- Medina, J. F., & Lisberger, S. G. (2008). Links from complex spikes to local plasticity and motor learning in the cerebellum of awake-behaving monkeys. *Nature Neuroscience*, *11*(10), 1185-1192. <https://doi.org/10.1038/nn.2197>
- Medine, C. N., Rickman, C., Chamberlain, L. H., & Duncan, R. R. (2007). Munc18-1 prevents the formation of ectopic SNARE complexes in living cells. *Journal of Cell Science*, *120*(24), 4407-4415. <https://doi.org/10.1242/jcs.020230>
- Meiselbach, H., Sticht, H., & Enz, R. (2006). Structural Analysis of the Protein Phosphatase 1 Docking Motif: Molecular Description of Binding Specificities Identifies Interacting Proteins. *Chemistry & Biology*, *13*(1), 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.10.009>
- Mello-Carpes, P. B., da Silva de Vargas, L., Gayer, M. C., Roehrs, R., & Izquierdo, I. (2016). Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation

Bibliografía

and can promote BDNF increase and memory persistence. *Neurobiology of Learning and Memory*, 127, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.11.014>

Mercier, J.-F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., & Bouvier, M. (2002). Quantitative Assessment of β 1- and β 2-Adrenergic Receptor Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44925-44931. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205767200>

Meredith, R. M., Holmgren, C. D., Weidum, M., Burnashev, N., & Mansvelder, H. D. (2007). Increased threshold for spike-timing-dependent plasticity is caused by unreliable calcium signaling in mice lacking fragile X gene FMR1. *Neuron*, 54(4), 627-638. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.028>

Michelassi, F., Liu, H., Hu, Z., & Dittman, J. S. (2017). A C1-C2 Module in Munc13 Inhibits Calcium-Dependent Neurotransmitter Release. *Neuron*, 95(3), 577-590.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.015>

Miki, T., Nakamura, Y., Malagon, G., Neher, E., & Marty, A. (2018). Two-component latency distributions indicate two-step vesicular release at simple glutamatergic synapses. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06336-5>

Miledi, R. (1966). Strontium as a substitute for calcium in the process of transmitter release at the neuromuscular junction. *Nature*, 212(5067), 1233-1234. <https://doi.org/10.1038/2121233a0>

Millán, C., Luján, R., Shigemoto, R., & Sánchez-Prieto, J. (2002). Subtype-specific expression of group III metabotropic glutamate receptors and Ca²⁺ channels in single nerve terminals. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47796-47803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207531200>

Misura, K. M., Scheller, R. H., & Weis, W. I. (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*, 404(6776), 355-362. <https://doi.org/10.1038/35006120>

Mitsukawa, K., Yamamoto, R., Ofner, S., Nozulak, J., Pescott, O., Lukic, S., Stoehr, N., Mombereau, C., Kuhn, R., McAllister, K. H., van der Putten, H., Cryan, J. F., & Flor, P. J. (2005). A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: Activation of receptor signaling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18712-18717. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508063102>

Mittelstaedt, T., & Schoch, S. (2007). Structure and evolution of RIM-BP genes: Identification of a novel family member. *Gene*, 403(1-2), 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.08.004>

Miyashiro, K. Y., Beckel-Mitchener, A., Purk, T. P., Becker, K. G., Barret, T., Liu, L., Carbonetto, S., Weiler, I. J., Greenough, W. T., & Eberwine, J. (2003). RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron*, 37(3), 417-431. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00034-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00034-5)

Mochida, S. (2019). Presynaptic Calcium Channels. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms20092217>

- Mojtahedian, S., Kogan, D. R., Kanzawa, S. A., Thompson, R. F., & Lavond, D. G. (2007). Dissociation of conditioned eye and limb responses in the cerebellar interpositus. *Physiology & Behavior*, *91*(1), 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.01.006>
- Monday, H. R., Kharod, S. C., Yoon, Y. J., Singer, R. H., & Castillo, P. E. (2022). Presynaptic FMRP and local protein synthesis support structural and functional plasticity of glutamatergic axon terminals. *Neuron*, *110*(16), 2588-2606.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.05.024>
- Montecucco, C., Schiavo, G., & Pantano, S. (2005). SNARE complexes and neuroexocytosis: How many, how close? *Trends in Biochemical Sciences*, *30*(7), 367-372. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.05.002>
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, *8*(6), 608-619. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)
- Mugnaini, E., Sekerková, G., & Martina, M. (2011). The unipolar brush cell: A remarkable neuron finally receiving deserved attention. *Brain Research Reviews*, *66*(1-2), 220-245. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.10.001>
- Mukherjee, K., Yang, X., Gerber, S. H., Kwon, H.-B., Ho, A., Castillo, P. E., Liu, X., & Südhof, T. C. (2010). Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(14), 6504-6509. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002307107>
- Muñoz-Cuevas, J., Vara, H., & Colino, A. (2004). Characterization of release-independent short-term depression in the juvenile rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, *558*(Pt 2), 527-548. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.062133>
- Murchison, C. F., Zhang, X.-Y., Zhang, W.-P., Ouyang, M., Lee, A., & Thomas, S. A. (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell*, *117*(1), 131-143. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00259-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00259-4)
- Murphy, B. J., Rossie, S., De Jongh, K. S., & Catterall, W. A. (1993). Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na⁺ channel alpha subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(36), 27355-27362.
- Myoga, M. H., & Regehr, W. G. (2011). Calcium microdomains near R-type calcium channels control the induction of presynaptic long-term potentiation at parallel fiber to purkinje cell synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(14), 5235-5243. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5252-10.2011>
- Nair, D., Hosy, E., Petersen, J. D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., & Sibarita, J.-B. (2013). Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(32), 13204-13224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-12.2013>
- Neher, E., & Brose, N. (2018). Dynamically Primed Synaptic Vesicle States: Key to Understand Synaptic Short-Term Plasticity. *Neuron*, *100*(6), 1283-1291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.024>

Bibliografía

- Neher, E., & Sakaba, T. (2003). Combining deconvolution and fluctuation analysis to determine quantal parameters and release rates. *Journal of Neuroscience Methods*, *130*(2), 143-157. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2003.09.020>
- Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, *260*(5554), 799-802. <https://doi.org/10.1038/260799a0>
- Netrakanti, P. R., Cooper, B. H., Dere, E., Poggi, G., Winkler, D., Brose, N., & Ehrenreich, H. (2015). Fast cerebellar reflex circuitry requires synaptic vesicle priming by munc13-3. *Cerebellum (London, England)*, *14*(3), 264-283. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0645-0>
- Nicholas, A. P., Pieribone, V. A., & Hökfelt, T. (1993). Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: An in situ hybridization study. *Neuroscience*, *56*(4), 1023-1039. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90148-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90148-9)
- Nicholls, D. G. (1989). Regulation of Calcium in Isolated Nerve Terminals (Synaptosomes): Relationship to Neurotransmitter Release. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *568*(1), 81-88. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb12493.x>
- Nicholls, D. G., Sihra, T. S., & Sanchez-Prieto, J. (1987). Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *Journal of Neurochemistry*, *49*(1), 50-57. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb03393.x>
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *50*, 295-322. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>
- Niswender, C. M., Johnson, K. A., Weaver, C. D., Jones, C. K., Xiang, Z., Luo, Q., Rodriguez, A. L., Marlo, J. E., de Paulis, T., Thompson, A. D., Days, E. L., Nalywajko, T., Austin, C. A., Williams, M. B., Ayala, J. E., Williams, R., Lindsley, C. W., & Conn, P. J. (2008). Discovery, characterization, and antiparkinsonian effect of novel positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 4. *Molecular Pharmacology*, *74*(5), 1345-1358. <https://doi.org/10.1124/mol.108.049551>
- Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., Strachan, R. T., Huang, T.-Y., Bressler, E. A., Hara, M. R., Shenoy, S. K., Gygi, S. P., & Lefkowitz, R. J. (2011). Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Science Signaling*, *4*(185), ra51. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001707>
- Nolan, B. C., & Freeman, J. H. (2006). Purkinje cell loss by OX7-saporin impairs acquisition and extinction of eyeblink conditioning. *Learning & Memory*, *13*(3), 359-365. <https://doi.org/10.1101/lm.168506>
- Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, N., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1994). Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell*, *77*(3), 361-369. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90151-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90151-1)
- Norris, S. A., Hathaway, E. N., Taylor, J. A., & Thach, W. T. (2011). Cerebellar inactivation impairs memory of learned prism gaze-reach calibrations. *Journal of Neurophysiology*, *105*(5), 2248-2259. <https://doi.org/10.1152/jn.01009.2010>

- Oddi, D., Crusio, W. E., D'Amato, F. R., & Pietropaolo, S. (2013). Monogenic mouse models of social dysfunction: Implications for autism. *Behavioural Brain Research*, *251*, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.002>
- O'Dell, T. J., Connor, S. A., Guglietta, R., & Nguyen, P. V. (2015). β -Adrenergic receptor signaling and modulation of long-term potentiation in the mammalian hippocampus. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *22*(9), 461-471. <https://doi.org/10.1101/lm.031088.113>
- Ohtsuka, T., Takao-Rikitsu, E., Inoue, E., Inoue, M., Takeuchi, M., Matsubara, K., Deguchi-Tawarada, M., Satoh, K., Morimoto, K., Nakanishi, H., & Takai, Y. (2002). Cast: A novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *The Journal of Cell Biology*, *158*(3), 577-590. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202083>
- Okamoto, N., Hori, S., Akazawa, C., Hayashi, Y., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1994). Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(2), 1231-1236.
- Oliet, S. H., Piet, R., & Poulain, D. A. (2001). Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science (New York, N.Y.)*, *292*(5518), 923-926. <https://doi.org/10.1126/science.1059162>
- Padmashri, R., Reiner, B. C., Suresh, A., Spartz, E., & Dunaevsky, A. (2013). Altered structural and functional synaptic plasticity with motor skill learning in a mouse model of fragile X syndrome. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(50), 19715-19723. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2514-13.2013>
- Palazzo, E., Romano, R., Luongo, L., Boccella, S., De Gregorio, D., Giordano, M. E., Rossi, F., Marabese, I., Scafuro, M. A., de Novellis, V., & Maione, S. (2015). MMPIP, an mGluR7-selective negative allosteric modulator, alleviates pain and normalizes affective and cognitive behavior in neuropathic mice. *Pain*, *156*(6), 1060-1073. <https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000150>
- Palesi, F., De Rinaldis, A., Castellazzi, G., Calamante, F., Muhlert, N., Chard, D., Tournier, J. D., Magenes, G., D'Angelo, E., & Gandini Wheeler-Kingshott, C. A. M. (2017). Contralateral cortico-ponto-cerebellar pathways reconstruction in humans in vivo: Implications for reciprocal cerebro-cerebellar structural connectivity in motor and non-motor areas. *Scientific Reports*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13079-8>
- Palfreyman, M. T., & Jorgensen, E. M. (2017). Unc13 Aligns SNAREs and Superprimed Synaptic Vesicles. *Neuron*, *95*(3), 473-475. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.017>
- Pan, B., & Zucker, R. S. (2009). A General Model of Synaptic Transmission and Short-Term Plasticity. *Neuron*, *62*(4), 539-554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.025>
- Papantoniou, C., Laugks, U., Betzin, J., Capitanio, C., Ferrero, J. J., Sánchez-Prieto, J., Schoch, S., Brose, N., Baumeister, W., Cooper, B. H., Imig, C., & Lučić, V. (2023). Munc13- and SNAP25-dependent molecular bridges play a key role in synaptic vesicle priming. *Science Advances*, *9*(25), eadf6222. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf6222>
- Papay, R., Gaivin, R., Jha, A., McCune, D. F., McGrath, J. C., Rodrigo, M. C., Simpson, P. C., Doze, V. A., & Perez, D. M. (2006). Localization of the mouse alpha1A-adrenergic receptor (AR) in the brain: alpha1AAR is expressed in neurons, GABAergic interneurons, and NG2 oligodendrocyte progenitors. *The Journal of Comparative Neurology*, *497*(2), 209-222. <https://doi.org/10.1002/cne.20992>

Bibliografía

- Park, D.-H., Park, S., Song, J.-M., Kang, M., Lee, S., Horak, M., & Suh, Y. H. (2020). N-linked glycosylation of the mGlu7 receptor regulates the forward trafficking and transsynaptic interaction with Elfn1. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *34*(11), 14977-14996. <https://doi.org/10.1096/fj.202001544R>
- Paschalis, A., Churchill, L., Marina, N., Kasymov, V., Gourine, A., Ackland, G., Paschali, A., Churchil, L., Marin, N., Kasymo, V., Gourin, A., & Acklan, G. (2009). 1-Adrenoceptor Distribution In the Rat Brain An Immunohistochemical study. *Neuroscience Letters*, *458*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.023>
- Pavlos, N. J., & Jahn, R. (2011). Distinct yet overlapping roles of Rab GTPases on synaptic vesicles. *Small GTPases*, *2*(2), 77-81. <https://doi.org/10.4161/sgtp.2.2.15201>
- Pekhletski, R., Gerlai, R., Overstreet, L. S., Huang, X. P., Agopyan, N., Slater, N. T., Abramow-Newerly, W., Roder, J. C., & Hampson, D. R. (1996). Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(20), 6364-6373. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-20-06364.1996>
- Pelkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricoire, L., Wester, J. C., & McBain, C. J. (2017). Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiological Reviews*, *97*(4), 1619-1747. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>
- Pelkey, K. A., Lavezzari, G., Racca, C., Roche, K. W., & McBain, C. J. (2005). mGluR7 is a metaplastic switch controlling bidirectional plasticity of feedforward inhibition. *Neuron*, *46*(1), 89-102. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.02.011>
- Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science (New York, N.Y.)*, *317*(5841), 1083-1086. <https://doi.org/10.1126/science.1144640>
- Perroy, J., El Far, O., Bertaso, F., Pin, J. P., Betz, H., Bockaert, J., & Fagni, L. (2002). PICK1 is required for the control of synaptic transmission by the metabotropic glutamate receptor 7. *The EMBO Journal*, *21*(12), 2990-2999. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf313>
- Perroy, J., Prezeau, L., De Waard, M., Shigemoto, R., Bockaert, J., & Fagni, L. (2000). Selective Blockade of P/Q-Type Calcium Channels by the Metabotropic Glutamate Receptor Type 7 Involves a Phospholipase C Pathway in Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *20*(21), 7896-7904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-21-07896.2000>
- Peterson, Y. K., & Luttrell, L. M. (2017). The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Pharmacological Reviews*, *69*(3), 256-297. <https://doi.org/10.1124/pr.116.013367>
- Pin, J.-P., Galvez, T., & Prézeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, *98*(3), 325-354. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(03\)00038-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(03)00038-x)
- Pobbati, A. V., Stein, A., & Fasshauer, D. (2006). N- to C-Terminal SNARE Complex Assembly Promotes Rapid Membrane Fusion. *Science*, *313*(5787), 673-676. <https://doi.org/10.1126/science.1129486>

- Poolos, N. P. (2012). Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN) Ion Channelopathy in Epilepsy. En J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen, & A. V. Delgado-Escueta (Eds.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (4th ed.). National Center for Biotechnology Information (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98137/>
- Prinslow, E. A., Stepien, K. P., Pan, Y.-Z., Xu, J., & Rizo, J. (2019). Multiple factors maintain assembled trans-SNARE complexes in the presence of NSF and α SNAP. *eLife*, *8*, e38880. <https://doi.org/10.7554/eLife.38880>
- Qian, H., Matt, L., Zhang, M., Nguyen, M., Patriarchi, T., Koval, O. M., Anderson, M. E., He, K., Lee, H.-K., & Hell, J. W. (2012). B2-Adrenergic receptor supports prolonged theta tetanus-induced LTP. *Journal of Neurophysiology*, *107*(10), 2703-2712. <https://doi.org/10.1152/jn.00374.2011>
- Quade, B., Camacho, M., Zhao, X., Orlando, M., Trimbuch, T., Xu, J., Li, W., Nicastro, D., Rosenmund, C., & Rizo, J. (2019). Membrane bridging by Munc13-1 is crucial for neurotransmitter release. *eLife*, *8*, e42806. <https://doi.org/10.7554/eLife.42806>
- Raman, I. M., Tong, G., & Jahr, C. E. (1996). Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron*, *16*(2), 415-421. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80059-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80059-8)
- Ramírez-Franco, J., Bartolomé-Martín, D., Alonso, B., Torres, M., & Sánchez-Prieto, J. (2014). Cannabinoid type 1 receptors transiently silence glutamatergic nerve terminals of cultured cerebellar granule cells. *PLoS One*, *9*(2), e88594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088594>
- Ramón y Cajal, S. (1904). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados: Estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos. Volumen II.* <https://digibug.ugr.es/handle/10481/69714>
- Ramos, C., Chardonnet, S., Marchand, C. H., Decottignies, P., Ango, F., Daniel, H., & Le Maréchal, P. (2012). Native presynaptic metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) interacts with exocytosis proteins in rat cerebellum. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(24), 20176-20186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.347468>
- Rehmann, H. (2013). Epac-inhibitors: Facts and artefacts. *Scientific Reports*, *3*, 3032. <https://doi.org/10.1038/srep03032>
- Rehmann, H., de Rooij, J., & Bos, J. L. (2010). Chapter 186—Epac, cAMP-Regulated Guanine Nucleotide Exchange Factors for Rap1 and Rap2. En R. A. Bradshaw & E. A. Dennis (Eds.), *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)* (pp. 1525-1529). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00186-8>
- Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., de Rooij, J., Bos, J. L., & Wittinghofer, A. (2003). Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nature Structural Biology*, *10*(1), 26-32. <https://doi.org/10.1038/nsb878>
- Reim, K., Wegmeyer, H., Brandstätter, J. H., Xue, M., Rosenmund, C., Dresbach, T., Hofmann, K., & Brose, N. (2005). Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses. *The Journal of Cell Biology*, *169*(4), 669-680. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502115>

Bibliografía

- Ren, W., Palazzo, E., Maione, S., & Neugebauer, V. (2011). Differential effects of mGluR7 and mGluR8 activation on pain-related synaptic activity in the amygdala. *Neuropharmacology*, *61*(8), 1334-1344. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.006>
- Richter, W., Day, P., Agrawal, R., Bruss, M. D., Granier, S., Wang, Y. L., Rasmussen, S. G. F., Horner, K., Wang, P., Lei, T., Patterson, A. J., Kobilka, B., & Conti, M. (2008). Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *The EMBO Journal*, *27*(2), 384-393. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601968>
- Rickman, C., Medine, C. N., Bergmann, A., & Duncan, R. R. (2007). Functionally and Spatially Distinct Modes of munc18-Syntaxin 1 Interaction. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(16), 12097-12103. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700227200>
- Roberts, J. E., Mankowski, J. B., Sideris, J., Goldman, B. D., Hatton, D. D., Mirrett, P. L., Baranek, G. T., Reznick, J. S., Long, A. C. J., & Bailey, D. B. (2009). Trajectories and Predictors of the Development of Very Young Boys with Fragile X Syndrome. *Journal of Pediatric Psychology*, *34*(8), 827-836. <https://doi.org/10.1093/jpepsy/jsn129>
- Roberts, J. E., McCary, L. M., Shinkareva, S. V., & Bailey, D. B. (2016). Infant Development in Fragile X Syndrome: Cross-Syndrome Comparisons. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *46*(6), 2088-2099. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2737-1>
- Rodríguez-Castañeda, F., Maestre-Martínez, M., Coudeville, N., Dimova, K., Junge, H., Lipstein, N., Lee, D., Becker, S., Brose, N., Jahn, O., Carlomagno, T., & Griesinger, C. (2010). Modular architecture of Munc13/calmodulin complexes: Dual regulation by Ca²⁺ and possible function in short-term synaptic plasticity. *The EMBO Journal*, *29*(3), 680-691. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.373>
- Roh, M., Lee, H., Seo, H., Lim, C.-S., Park, P., Choi, J. E., Kwak, J.-H., Lee, J., Kaang, B.-K., McHugh, T. J., & Lee, K. (2020). Perseverative stereotypic behavior of Epac2 KO mice in a reward-based decision making task. *Neuroscience Research*, *161*, 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.08.010>
- Rosemond, E., Wang, M., Yao, Y., Storjohann, L., Stormann, T., Johnson, E. C., & Hampson, D. R. (2004). Molecular basis for the differential agonist affinities of group III metabotropic glutamate receptors. *Molecular Pharmacology*, *66*(4), 834-842. <https://doi.org/10.1124/mol.104.002956>
- Rosenmund, C., Sigler, A., Augustin, I., Reim, K., Brose, N., & Rhee, J. (2002). Differential Control of Vesicle Priming and Short-Term Plasticity by Munc13 Isoforms. *Neuron*, *33*, 411-424. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00568-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00568-8)
- Rosenmund, C., & Stevens, C. F. (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, *16*(6), 1197-1207. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80146-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80146-4)
- Rossi, D., Gruart, A., Contreras-Murillo, G., Muhaisen, A., Ávila, J., Delgado-García, J. M., Pujadas, L., & Soriano, E. (2020). Reelin reverts biochemical, physiological and cognitive alterations in mouse models of Tauopathy. *Progress in Neurobiology*, *186*, 101743. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101743>
- Rostaing, P., Real, E., Siksou, L., Lechère, J.-P., Boudier, T., Boeckers, T. M., Gertler, F., Gundelfinger, E. D., Triller, A., & Marty, S. (2006). Analysis of synaptic ultrastructure without

fixative using high-pressure freezing and tomography. *The European Journal of Neuroscience*, 24(12), 3463-3474. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05234.x>

Rovira, X., Malhaire, F., Scholler, P., Rodrigo, J., Gonzalez-Bulnes, P., Llebaria, A., Pin, J.-P., Giraldo, J., & Goudet, C. (2015). Overlapping binding sites drive allosteric agonism and positive cooperativity in type 4 metabotropic glutamate receptors. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(1), 116-130. <https://doi.org/10.1096/fj.14-257287>

Sadana, R., & Dessauer, C. W. (2009). Physiological Roles for G Protein-Regulated Adenylyl Cyclase Isoforms: Insights from Knockout and Overexpression Studies. *Neuro-Signals*, 17(1), 5-22. <https://doi.org/10.1159/000166277>

Safo, P. K., & Regehr, W. G. (2005). Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron*, 48(4), 647-659. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.020>

Sakaba, T., & Neher, E. (2001). Preferential potentiation of fast-releasing synaptic vesicles by cAMP at the calyx of Held. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 331-336. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.331>

Sakaba, T., & Neher, E. (2003). Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABAB receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature*, 424(6950), Article 6950. <https://doi.org/10.1038/nature01859>

Sakamoto, H., Ariyoshi, T., Kimpara, N., Sugao, K., Taiko, I., Takikawa, K., Asanuma, D., Namiki, S., & Hirose, K. (2018). Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. *Nature Neuroscience*, 21(1), 41-49. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0041-9>

Sakayori, N., Kato, S., Sugawara, M., Setogawa, S., Fukushima, H., Ishikawa, R., Kida, S., & Kobayashi, K. (2019). Motor skills mediated through cerebellothalamic tracts projecting to the central lateral nucleus. *Molecular Brain*, 12(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0431-x>

Salin, P. A., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1996). Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron*, 16(4), 797-803. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80099-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80099-9)

Sandoval, G., Shim, S., Hong, D., Garrett, A., Quintin, E.-M., Marzelli, M., Patnaik, S., Lightbody, A., & Reiss, A. (2018). Neuroanatomical abnormalities in fragile X syndrome during the adolescent and young adult years. *Journal of Psychiatric Research*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.10.014>

Sansig, G., Bushell, T. J., Clarke, V. R., Rozov, A., Burnashev, N., Portet, C., Gasparini, F., Schmutz, M., Klebs, K., Shigemoto, R., Flor, P. J., Kuhn, R., Knoepfel, T., Schroeder, M., Hampson, D. R., Collett, V. J., Zhang, C., Duvoisin, R. M., Collingridge, G. L., & van Der Putten, H. (2001). Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(22), 8734-8745. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-22-08734.2001>

Santos, A. R., Kanellopoulos, A. K., & Bagni, C. (2014). Learning and behavioral deficits associated with the absence of the fragile X mental retardation protein: What a fly and mouse model can teach us. *Learning & Memory*, 21(10), 543-555. <https://doi.org/10.1101/lm.035956.114>

Bibliografía

- Sara, S. J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(3), 211-223. <https://doi.org/10.1038/nrn2573>
- Saugstad, J. A., Kinzie, J. M., Shinohara, M. M., Segerson, T. P., & Westbrook, G. L. (1997). Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile. *Molecular Pharmacology*, 51(1), 119-125. <https://doi.org/10.1124/mol.51.1.119>
- Saugstad, J. A., Segerson, T. P., & Westbrook, G. L. (1996). Metabotropic glutamate receptors activate G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(19), 5979-5985. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-19-05979.1996>
- Scanziani, M., Gähwiler, B. H., & Chrapak, S. (1998). Target cell-specific modulation of transmitter release at terminals from a single axon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 12004-12009. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.12004>
- Schaefer, G. B., & Mendelsohn, N. J. (2008). Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 10(1), 4-12. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31815efdd7>
- Scheschonka, A., Findlow, S., Schemm, R., El Far, O., Caldwell, J. H., Crump, M. P., Holden-Dye, K., O'Connor, V., Betz, H., & Werner, J. M. (2008). Structural determinants of calmodulin binding to the intracellular C-terminal domain of the metabotropic glutamate receptor 7A. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(9), 5577-5588. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709505200>
- Schevon, C. A., Weiss, S. A., McKhann, G., Goodman, R. R., Yuste, R., Emerson, R. G., & Trevelyan, A. J. (2012). Evidence of an inhibitory restraint of seizure activity in humans. *Nature Communications*, 3, 1060. <https://doi.org/10.1038/ncomms2056>
- Schiavo, G., Rossetto, O., Catsicas, S., Poverino de Laureto, P., DasGupta, B. R., Benfenati, F., & Montecucco, C. (1993). Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 23784-23787.
- Schikorski, T., & Stevens, C. F. (2001). Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nature Neuroscience*, 4(4), 391-395. <https://doi.org/10.1038/86042>
- Schlüter, O. M., Basu, J., Südhof, T. C., & Rosenmund, C. (2006). Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: Implications for short-term synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(4), 1239-1246. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3553-05.2006>
- Schlüter, O. M., Schmitz, F., Jahn, R., Rosenmund, C., & Südhof, T. C. (2004). A Complete Genetic Analysis of Neuronal Rab3 Function. *Journal of Neuroscience*, 24(29), 6629-6637. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1610-04.2004>
- Schmidt, H. (2019). Control of Presynaptic Parallel Fiber Efficacy by Activity-Dependent Regulation of the Number of Occupied Release Sites. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsys.2019.00030>
- Schneggenburger, R., Meyer, A. C., & Neher, E. (1999). Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron*, 23(2), 399-409. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80789-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80789-8)

- Schoch, S., Castillo, P. E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2002). RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature*, *415*(6869), 321-326. <https://doi.org/10.1038/415321a>
- Schoepp, D. D., Jane, D. E., & Monn, J. A. (1999). Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, *38*(10), 1431-1476. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00092-1)
- Schonewille, M., Belmeguenai, A., Koekkoek, S. K., Houtman, S. H., Boele, H. J., van Beugen, B. J., Gao, Z., Badura, A., Ohtsuki, G., Amerika, W. E., Hosy, E., Hoebeek, F. E., Elgersma, Y., Hansel, C., & De Zeeuw, C. I. (2010). Purkinje cell-specific knockout of the protein phosphatase PP2B impairs potentiation and cerebellar motor learning. *Neuron*, *67*(4), 618-628. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.009>
- Schonewille, M., Gao, Z., Boele, H.-J., Veloz, M. F. V., Amerika, W. E., Simek, A. A. M., De Jeu, M. T., Steinberg, J. P., Takamiya, K., Hoebeek, F. E., Linden, D. J., Huganir, R. L., & De Zeeuw, C. I. (2011). Reevaluating the role of LTD in cerebellar motor learning. *Neuron*, *70*(1), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.044>
- Schulz, H. L., Stohr, H., & Weber, B. H. F. (2002). Characterization of three novel isoforms of the metabotropic glutamate receptor 7 (GRM7). *Neuroscience Letters*, *326*(1), 37-40. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00306-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00306-3)
- Scott, I. D., & Nicholls, D. G. (1980). Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. *The Biochemical Journal*, *186*(1), 21-33. <https://doi.org/10.1042/bj1860021>
- Seabra, M. C., Goldstein, J. L., Südhof, T. C., & Brown, M. S. (1992). Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(20), 14497-14503.
- Segev, A., Garcia-Oscos, F., & Kourrich, S. (2016). Whole-cell Patch-clamp Recordings in Brain Slices. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *112*, 54024. <https://doi.org/10.3791/54024>
- Selvam, C., Lemasson, I. A., Brabet, I., Oueslati, N., Karaman, B., Cabaye, A., Tora, A. S., Commare, B., Courtiol, T., Cesarini, S., McCort-Tranchepain, I., Rigault, D., Mony, L., Bessiron, T., McLean, H., Leroux, F. R., Colobert, F., Daniel, H., Goupil-Lamy, A., ... Acher, F. C. (2018). Increased Potency and Selectivity for Group III Metabotropic Glutamate Receptor Agonists Binding at Dual sites. *Journal of Medicinal Chemistry*, *61*(5), 1969-1989. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01438>
- Sergaki, M. C., López-Ramos, J. C., Stagkourakis, S., Gruart, A., Broberger, C., Delgado-García, J. M., & Ibáñez, C. F. (2017). Compromised Survival of Cerebellar Molecular Layer Interneurons Lacking GDNF Receptors GFR α 1 or RET Impairs Normal Cerebellar Motor Learning. *Cell Reports*, *19*(10), 1977-1986. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.030>
- Shen, N., Guryev, O., & Rizo, J. (2005). Intramolecular occlusion of the diacylglycerol-binding site in the C1 domain of munc13-1. *Biochemistry*, *44*(4), 1089-1096. <https://doi.org/10.1021/bi0476127>
- Shibasaki, T., Takahashi, H., Miki, T., Sunaga, Y., Matsumura, K., Yamanaka, M., Zhang, C., Tamamoto, A., Satoh, T., Miyazaki, J.-I., & Seino, S. (2007). Essential role of Epac2/Rap1 signaling

Bibliografía

in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19333-19338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707054104>

Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P. J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., & Mizuno, N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(19), 7503-7522. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-19-07503.1997>

Shin, O.-H., Lu, J., Rhee, J.-S., Tomchick, D. R., Pang, Z. P., Wojcik, S. M., Camacho-Perez, M., Brose, N., Machius, M., Rizo, J., Rosenmund, C., & Südhof, T. C. (2010). Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca²⁺ regulator of synaptic exocytosis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(3), 280-288. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1758>

Shmuelof, L., & Krakauer, J. W. (2011). Are we ready for a natural history of motor learning? *Neuron*, 72(3), 469-476. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.017>

Sik, A., Penttonen, M., & Buzsáki, G. (1997). Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: An in vivo intracellular study. *The European Journal of Neuroscience*, 9(3), 573-588. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01634.x>

Siksou, L., Triller, A., & Marty, S. (2009). An emerging view of presynaptic structure from electron microscopic studies. *Journal of Neurochemistry*, 108(6), 1336-1342. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05888.x>

Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24-45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>

Sinha, R., Ahmed, S., Jahn, R., & Klingauf, J. (2011). Two synaptobrevin molecules are sufficient for vesicle fusion in central nervous system synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14318-14323. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101818108>

Snider, R. S. (1950). Recent contributions to the anatomy and physiology of the cerebellum. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 64(2), 196-219. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1950.02310260034002>

Sokolov, A. A., Miall, R. C., & Ivry, R. B. (2017). The Cerebellum: Adaptive Prediction for Movement and Cognition. *Trends in Cognitive Sciences*, 21(5), 313-332. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2017.02.005>

Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., & Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362(6418), Article 6418. <https://doi.org/10.1038/362318a0>

Somogyi, P., Dalezios, Y., Luján, R., Roberts, J. D. B., Watanabe, M., & Shigemoto, R. (2003). High level of mGluR7 in the presynaptic active zones of select populations of GABAergic terminals innervating interneurons in the rat hippocampus. *The European Journal of Neuroscience*, 17(12), 2503-2520. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02697.x>

Song, Y., Ailenberg, M., & Silverman, M. (1998). Cloning of a novel gene in the human kidney homologous to rat munc13s: Its potential role in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 53(6), 1689-1695. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00942.x>

- Sorensen, S. D., Macek, T. A., Cai, Z., Saugstad, J. A., & Conn, P. J. (2002). Dissociation of protein kinase-mediated regulation of metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) interactions with calmodulin and regulation of mGluR7 function. *Molecular Pharmacology*, *61*(6), 1303-1312. <https://doi.org/10.1124/mol.61.6.1303>
- Spencer, C. M., Alekseyenko, O., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L. A., & Paylor, R. (2005). Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. *Genes, Brain, and Behavior*, *4*(7), 420-430. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00123.x>
- Srivastava, D. P., Jones, K. A., Woolfrey, K. M., Burgdorf, J., Russell, T. A., Kalmbach, A., Lee, H., Yang, C., Bradberry, M. M., Wokosin, D., Moskal, J. R., Casanova, M. F., Waters, J., & Penzes, P. (2012). Social, Communication, and Cortical Structural Impairments in Epac2-Deficient Mice. *Journal of Neuroscience*, *32*(34), 11864-11878. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1349-12.2012>
- Stachniak, T. J., Sylwestrak, E. L., Scheiffele, P., Hall, B. J., & Ghosh, A. (2019). Efn1-Induced Constitutive Activation of mGluR7 Determines Frequency-Dependent Recruitment of Somatostatin Interneurons. *The Journal of Neuroscience*, *39*(23), 4461-4474. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2276-18.2019>
- Stahl, J. S., James, R. A., Oommen, B. S., Hoebeek, F. E., & De Zeeuw, C. I. (2006). Eye movements of the murine P/Q calcium channel mutant tottering, and the impact of aging. *Journal of Neurophysiology*, *95*(3), 1588-1607. <https://doi.org/10.1152/jn.00318.2005>
- Steinmetz, J. E., Logan, C. G., Rosen, D. J., Thompson, J. K., Lavond, D. G., & Thompson, R. F. (1987). Initial localization of the acoustic conditioned stimulus projection system to the cerebellum essential for classical eyelid conditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(10), 3531-3535. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.10.3531>
- Stepien, K. P., Prinslow, E. A., & Rizo, J. (2019). Munc18-1 is crucial to overcome the inhibition of synaptic vesicle fusion by α SNAP. *Nature Communications*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12188-4>
- Ster, J., de Bock, F., Bertaso, F., Abitbol, K., Daniel, H., Bockaert, J., & Fagni, L. (2009). Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus. *The Journal of Physiology*, *587*(Pt 1), 101-113. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.157461>
- Stoodley, C. J., D'Mello, A. M., Ellegood, J., Jakkamsetti, V., Liu, P., Nebel, M. B., Gibson, J. M., Kelly, E., Meng, F., Cano, C. A., Pascual, J. M., Mostofsky, S. H., Lerch, J. P., & Tsai, P. T. (2017). Altered cerebellar connectivity in autism spectrum disorders and rescue of autism-related behaviors in mice. *Nature neuroscience*, *20*(12), 1744-1751. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0004-1>
- Storm, D. R., Hansel, C., Hacker, B., Parent, A., & Linden, D. J. (1998). Impaired cerebellar long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. *Neuron*, *20*(6), 1199-1210. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80500-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80500-0)
- Südhof, T. C. (2012). The Presynaptic Active Zone. *Neuron*, *75*(1), 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, *80*(3), 675-690. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>

Bibliografía

- Südhof, T. C., & Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5913), 474-477. <https://doi.org/10.1126/science.1161748>
- Summerhill, S., Stroud, T., Nagendra, R., Perros-Huguet, C., & Trevethick, M. (2008). A cell-based assay to assess the persistence of action of agonists acting at recombinant human β 2 adrenoceptors. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 58(3), 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.06.003>
- Summers, R. J., Papaioannou, M., Harris, S., & Evans, B. A. (1995). Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain. *British Journal of Pharmacology*, 116(6), 2547-2548.
- Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C. T., Saxe, D., & Warren, S. T. (1992). DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics*, 1(6), 397-400. <https://doi.org/10.1093/hmg/1.6.397>
- Tabet, R., Moutin, E., Becker, J. A. J., Heintz, D., Fouillen, L., Flatter, E., Krężel, W., Alunni, V., Koebel, P., Dembélé, D., Tassone, F., Bardoni, B., Mandel, J.-L., Vitale, N., Muller, D., Le Merrer, J., & Moine, H. (2016). Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(26), E3619-3628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522631113>
- Takao-Rikitsu, E., Mochida, S., Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Inoue, M., Ohtsuka, T., & Takai, Y. (2004). Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *The Journal of Cell Biology*, 164(2), 301-311. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307101>
- Tassone, F., Long, K. P., Tong, T.-H., Lo, J., Gane, L. W., Berry-Kravis, E., Nguyen, D., Mu, L. Y., Laffin, J., Bailey, D. B., & Hagerman, R. J. (2012). FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome Medicine*, 4(12), 100. <https://doi.org/10.1186/gm401>
- Terrone, G., Pauletti, A., Pascente, R., & Vezzani, A. (2016). Preventing epileptogenesis: A realistic goal? *Pharmacological Research*, 110, 96-100. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.009>
- Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T., & Tesmer, J. J. G. (2005). Snapshot of activated G proteins at the membrane: The G α q-GRK2-Gbetagamma complex. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5754), 1686-1690. <https://doi.org/10.1126/science.1118890>
- Thomsen, C., Pekhletski, R., Haldeman, B., Gilbert, T. A., O'Hara, P., & Hampson, D. R. (1997). Cloning and characterization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4b. *Neuropharmacology*, 36(1), 21-30. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(96\)00153-0](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(96)00153-0)
- Tibbs, G. R., Barrie, A. P., Van Mieghem, F. J., McMahon, H. T., & Nicholls, D. G. (1989). Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: Effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release. *Journal of Neurochemistry*, 53(6), 1693-1699. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb09232.x>
- tom Dieck, S., Altmann, W. D., Kessels, M. M., Qualmann, B., Regus, H., Brauner, D., Fejtová, A., Bracko, O., Gundelfinger, E. D., & Brandstätter, J. H. (2005). Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse. *The Journal of Cell Biology*, 168(5), 825-836. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408157>

- Tomassy, G. S., De Leonibus, E., Jabaudon, D., Lodato, S., Alfano, C., Mele, A., Macklis, J. D., & Studer, M. (2010). Area-specific temporal control of corticospinal motor neuron differentiation by COUP-TFI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(8), 3576-3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911792107>
- Tomioka, N. H., Yasuda, H., Miyamoto, H., Hatayama, M., Morimura, N., Matsumoto, Y., Suzuki, T., Odagawa, M., Odaka, Y. S., Iwayama, Y., Won Um, J., Ko, J., Inoue, Y., Kaneko, S., Hirose, S., Yamada, K., Yoshikawa, T., Yamakawa, K., & Aruga, J. (2014). Eln1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nature Communications*, *5*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms5501>
- Toonen, R. F. G., & Verhage, M. (2007). Munc18-1 in secretion: Lonely Munc joins SNARE team and takes control. *Trends in Neurosciences*, *30*(11), 564-572. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.08.008>
- Tsai, P. T., Hull, C., Chu, Y., Greene-Colozzi, E., Sadowski, A. R., Leech, J. M., Steinberg, J., Crawley, J. N., Regehr, W. G., & Sahin, M. (2012). Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature*, *488*(7413), 647-651. <https://doi.org/10.1038/nature11310>
- Tsalkova, T., Mei, F. C., Li, S., Chepurny, O. G., Leech, C. A., Liu, T., Holz, G. G., Woods, V. L., & Cheng, X. (2012). Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(45), 18613-18618. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210209109>
- Turner, J. P., & Salt, T. E. (2003). Group II and III metabotropic glutamate receptors and the control of the nucleus reticularis thalami input to rat thalamocortical neurones in vitro. *Neuroscience*, *122*(2), 459-469. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.014>
- Tzounopoulos, T., Janz, R., Südhof, T. C., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1998). A role for cAMP in long-term depression at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, *21*(4), 837-845. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80599-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80599-1)
- Ugolini, A., Large, C. H., & Corsi, M. (2008). AMN082, an allosteric mGluR7 agonist that inhibits afferent glutamatergic transmission in rat basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, *55*(4), 532-536. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.04.020>
- Uriu, Y., Kiyonaka, S., Miki, T., Yagi, M., Akiyama, S., Mori, E., Nakao, A., Beedle, A. M., Campbell, K. P., Wakamori, M., & Mori, Y. (2010). Rab3-interacting Molecule γ Isoforms Lacking the Rab3-binding Domain Induce Long Lasting Currents but Block Neurotransmitter Vesicle Anchoring in Voltage-dependent P/Q-type Ca^{2+} Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(28), 21750-21767. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.101311>
- Valerio, A., Ferraboli, S., Paterlini, M., Spano, P., & Barlati, S. (2001). Identification of novel alternatively-spliced mRNA isoforms of metabotropic glutamate receptor 6 gene in rat and human retina. *Gene*, *262*(1-2), 99-106. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00547-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00547-3)
- van Beugen, B. J., Nagaraja, R. Y., & Hansel, C. (2006). Climbing fiber-evoked endocannabinoid signaling heterosynaptically suppresses presynaptic cerebellar long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(32), 8289-8294. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0805-06.2006>

Bibliografía

- van Huijstee, A. N., & Kessels, H. W. (2020). Variance analysis as a tool to predict the mechanism underlying synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience Methods*, 331, 108526. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108526>
- van Neerven, J., Pompeiano, O., Collewyn, H., & van der Steen, J. (1990). Injections of beta-noradrenergic substances in the flocculus of rabbits affect adaptation of the VOR gain. *Experimental Brain Research*, 79(2), 249-260. <https://doi.org/10.1007/BF00608233>
- Van Overwalle, F., Manto, M., Cattaneo, Z., Clausi, S., Ferrari, C., Gabrieli, J. D. E., Guell, X., Heleven, E., Lupo, M., Ma, Q., Michelutti, M., Olivito, G., Pu, M., Rice, L. C., Schmahmann, J. D., Siciliano, L., Sokolov, A. A., Stoodley, C. J., van Dun, K., ... Leggio, M. (2020). Consensus Paper: Cerebellum and Social Cognition. *Cerebellum (London, England)*, 19(6), 833-868. <https://doi.org/10.1007/s12311-020-01155-1>
- Vanhoose, A. M., & Winder, D. G. (2003). NMDA and beta1-adrenergic receptors differentially signal phosphorylation of glutamate receptor type 1 in area CA1 of hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5827-5834. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05827.2003>
- Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J.-S., Brose, N., Enk, C., Reim, K., & Rosenmund, C. (2002). Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 9037-9042. <https://doi.org/10.1073/pnas.122623799>
- Vasudevan, S., & Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128(6), 1105-1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.038>
- Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den, T. K., Berg, Missler, M., Geuze, H. J., & Südhof, T. C. (2000). Synaptic Assembly of the Brain in the Absence of Neurotransmitter Secretion. *Science*, 287(5454), 864-869. <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.864>
- Villacres, E. C., Wong, S. T., Chavkin, C., & Storm, D. R. (1998). Type I Adenylyl Cyclase Mutant Mice Have Impaired Mossy Fiber Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 18(9), 3186-3194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-09-03186.1998>
- Wada, E., Shigemoto, R., Kinoshita, A., Ohishi, H., & Mizuno, N. (1998). Metabotropic glutamate receptor subtypes in axon terminals of projection fibers from the main and accessory olfactory bulbs: A light and electron microscopic immunohistochemical study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 393(4), 493-504.
- Waites, C. L., Leal-Ortiz, S. A., Okerlund, N., Dalke, H., Fejtova, A., Altroch, W. D., Gundelfinger, E. D., & Garner, C. C. (2013). Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation. *The EMBO Journal*, 32(7), 954-969. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.27>
- Walter, A. M., Pinheiro, P. S., Verhage, M., & Sørensen, J. B. (2013). A sequential vesicle pool model with a single release sensor and a Ca(2+)-dependent priming catalyst effectively explains Ca(2+)-dependent properties of neurosecretion. *PLoS Computational Biology*, 9(12), e1003362. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003362>
- Wang, H., Pineda, V. V., Chan, G. C. K., Wong, S. T., Muglia, L. J., & Storm, D. R. (2003). Type 8 Adenylyl Cyclase Is Targeted to Excitatory Synapses and Required for Mossy Fiber Long-Term

- Potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 23(30), 9710-9718. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-30-09710.2003>
- Wang, X., Hu, B., Zieba, A., Neumann, N. G., Kasper-Sonnenberg, M., Honsbein, A., Hultqvist, G., Conze, T., Witt, W., Limbach, C., Geitmann, M., Danielson, H., Kolarow, R., Niemann, G., Lessmann, V., & Kilimann, M. W. (2009). A protein interaction node at the neurotransmitter release site: Domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and rim converge on the N-terminal domain of Munc13-1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(40), 12584-12596. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1255-09.2009>
- Wang, X.-T., Zhou, L., Dong, B.-B., Xu, F.-X., Wang, D.-J., Shen, E.-W., Cai, X.-Y., Wang, Y., Wang, N., Ji, S.-J., Chen, W., Schonewille, M., Zhu, J. J., De Zeeuw, C. I., & Shen, Y. (2023). cAMP–EPAC–PKCε–RIM1α signaling regulates presynaptic long-term potentiation and motor learning. *eLife*, 12, e80875. <https://doi.org/10.7554/eLife.80875>
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., & Südhof, T. C. (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, 388(6642), Article 6642. <https://doi.org/10.1038/41580>
- Wang, Y., Sugita, S., & Südhof, T. C. (2000). The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 20033-20044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909008199>
- Wayman, G. A., Impey, S., Wu, Z., Kindsvogel, W., Prichard, L., & Storm, D. R. (1994). Synergistic activation of the type I adenylyl cyclase by Ca²⁺ and Gs-coupled receptors in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25400-25405.
- Weisskopf, M. G., Castillo, P. E., Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1994). Mediation of Hippocampal Mossy Fiber Long-Term Potentiation by Cyclic AMP. *Science*, 265(5180), 1878-1882. <https://doi.org/10.1126/science.7916482>
- Wen, H., Linhoff, M. W., McGinley, M. J., Li, G.-L., Corson, G. M., Mandel, G., & Brehm, P. (2010). Distinct roles for two synaptotagmin isoforms in synchronous and asynchronous transmitter release at zebrafish neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), 13906-13911. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008598107>
- Wickner, W., & Rizo, J. (2017). A cascade of multiple proteins and lipids catalyzes membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 28(6), 707-711. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-07-0517>
- Will, E. A., Caravella, K. E., Hahn, L. J., Fidler, D. J., & Roberts, J. E. (2018). Adaptive behavior in infants and toddlers with Down syndrome and fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 177(3), 358-368. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32619>
- Williams, J. H. G., Waiter, G. D., Gilchrist, A., Perrett, D. I., Murray, A. D., & Whiten, A. (2006). Neural mechanisms of imitation and «mirror neuron» functioning in autistic spectrum disorder. *Neuropsychologia*, 44(4), 610-621. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2005.06.010>
- Williams, N. G., Zhong, H., & Minneman, K. P. (1998). Differential coupling of alpha1-, alpha2-, and beta-adrenergic receptors to mitogen-activated protein kinase pathways and differentiation in transfected PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(38), 24624-24632. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24624>

Bibliografía

- Williams, R., Johnson, K. A., Gentry, P. R., Niswender, C. M., Weaver, C. D., Conn, P. J., Lindsley, C. W., & Hopkins, C. R. (2009). Synthesis and SAR of a novel positive allosteric modulator (PAM) of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *19*(17), 4967-4970. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.072>
- Wojcik, S. M., & Brose, N. (2007). Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: Speed and accuracy matter. *Neuron*, *55*(1), 11-24. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.013>
- Wong, M. Y., Liu, C., Wang, S. S. H., Roquas, A. C. F., Fowler, S. C., & Kaeser, P. S. (2018). Liprin- α 3 controls vesicle docking and exocytosis at the active zone of hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(9), 2234-2239. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719012115>
- Xi, Z.-X., Shen, H., Baker, D. A., & Kalivas, P. W. (2003). Inhibition of non-vesicular glutamate release by group III metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry*, *87*(5), 1204-1212. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02093.x>
- Xie, X., Liang, M., Yu, C., & Wei, Z. (2021). Liprin- α -Mediated Assemblies and Their Roles in Synapse Formation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.653381>
- Xu, J., Camacho, M., Xu, Y., Esser, V., Liu, X., Trimbuch, T., Pan, Y.-Z., Ma, C., Tomchick, D. R., Rosenmund, C., & Rizo, J. (2017). Mechanistic insights into neurotransmitter release and presynaptic plasticity from the crystal structure of Munc13-1 C1C2BMUN. *eLife*, *6*, e22567. <https://doi.org/10.7554/eLife.22567>
- Xu, J., Mashimo, T., & Südhof, T. C. (2007). Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca²⁺ sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron*, *54*(4), 567-581. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.004>
- Xu-Friedman, M. A., & Regehr, W. G. (1999). Presynaptic strontium dynamics and synaptic transmission. *Biophysical Journal*, *76*(4), 2029-2042.
- Yang, X., Wang, S., Sheng, Y., Zhang, M., Zou, W., Wu, L., Kang, L., Rizo, J., Zhang, R., Xu, T., & Ma, C. (2015). Syntaxin opening by the MUN domain underlies the function of Munc13 in synaptic-vesicle priming. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*(7), 547-554. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3038>
- Yang, Y., & Calakos, N. (2013). Presynaptic long-term plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *5*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2013.00008>
- Yang, Y., Shu, X., Liu, D., Shang, Y., Wu, Y., Pei, L., Xu, X., Tian, Q., Zhang, J., Qian, K., Wang, Y.-X., Petralia, R. S., Tu, W., Zhu, L.-Q., Wang, J.-Z., & Lu, Y. (2012). EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation. *Neuron*, *73*(4), 774-788. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.003>
- Yao, L., & Sakaba, T. (2010). cAMP modulates intracellular Ca²⁺ sensitivity of fast-releasing synaptic vesicles at the calyx of Held synapse. *Journal of Neurophysiology*, *104*(6), 3250-3260. <https://doi.org/10.1152/jn.00685.2010>

- Yawo, H. (1999). Involvement of cGMP-Dependent Protein Kinase in Adrenergic Potentiation of Transmitter Release from the Calyx-Type Presynaptic Terminal. *The Journal of Neuroscience*, 19(13), 5293. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-13-05293.1999>
- Yuan, L.-L., Adams, J. P., Swank, M., Sweatt, J. D., & Johnston, D. (2002). Protein Kinase Modulation of Dendritic K⁺ Channels in Hippocampus Involves a Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *The Journal of Neuroscience*, 22(12), 4860-4868. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-12-04860.2002>
- Zamah, A. M., Delahunty, M., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to G_s and G_i. Demonstration in a reconstituted system. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 31249-31256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202753200>
- Zamponi, G. W., & Snutch, T. P. (1998). Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single Gβγ subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 4035-4039.
- Zhang, C.-S., Bertaso, F., Eulenburg, V., Lerner-Natoli, M., Herin, G. A., Bauer, L., Bockaert, J., Fagni, L., Betz, H., & Scheschonka, A. (2008). Knock-in mice lacking the PDZ-ligand motif of mGluR7a show impaired PKC-dependent autoinhibition of glutamate release, spatial working memory deficits, and increased susceptibility to pentylentetrazol. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(34), 8604-8614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0628-08.2008>
- Zhang, D., Kaufmann, W. E., Sigafos, J., Bartl-Pokorny, K. D., Krieber, M., Marschik, P. B., & Einspieler, C. (2017). Parents' initial concerns about the development of their children later diagnosed with fragile X syndrome. *Journal of intellectual & developmental disability*, 42(2), 114-122. <https://doi.org/10.3109/13668250.2016.1228858>
- Zhong, N., & Zucker, R. S. (2005). cAMP acts on exchange protein activated by cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange protein to regulate transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(1), 208-214. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3703-04.2005>
- Zhou, P., Pang, Z. P., Yang, X., Zhang, Y., Rosenmund, C., Bacaj, T., & Südhof, T. C. (2013). Syntaxin-1 N-peptide and Habc-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion. *The EMBO Journal*, 32(1), 159-171. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.307>
- Zhou, Y.-T., Long, J.-Y., Fu, J.-Y., Sun, W.-W., Hu, F., Huang, H.-Y., Li, W., Gao, M.-M., Shu, Y., Yi, Y.-H., & Long, Y.-S. (2019). A Species-Correlated Transitional Residue D132 on Human FMRP Plays a Role in Nuclear Localization via an RNA-Dependent Interaction With PABP1. *Neuroscience*, 404, 282-296. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.028>
- Zhu, Y., & Ikeda, S. R. (1994). Modulation of Ca²⁺-channel currents by protein kinase C in adult rat sympathetic neurons. *Journal of Neurophysiology*, 72(4), 1549-1560. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.4.1549>
- Zieba, B. J., Artamonov, M. V., Jin, L., Momotani, K., Ho, R., Franke, A. S., Neppl, R. L., Stevenson, A. S., Khromov, A. S., Chrzanowska-Wodnicka, M., & Somlyo, A. V. (2011). The cAMP-responsive Rap1 guanine nucleotide exchange factor, Epac, induces smooth muscle relaxation by down-

Bibliografía

regulation of RhoA activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16681-16692. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.205062>

Zingerevich, C., Greiss-Hess, L., Lemons-Chitwood, K., Harris, S. W., Hessel, D., Cook, K., & Hagerman, R. J. (2009). Motor abilities of children diagnosed with Fragile X Syndrome with and without autism. *Journal of intellectual disability research: JIDR*, 53(1), 11-18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2008.01107.x>

Zoghbi, H. Y., & Bear, M. F. (2012). Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3), a009886. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009886>

Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology*, 64, 355-405. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>

