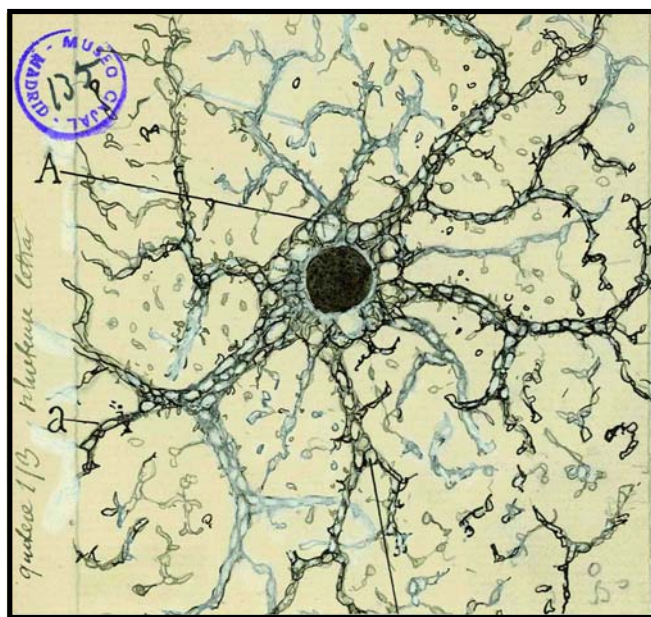


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Facultad de Medicina  
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**COMUNICACIÓN ENTRE  
NEURONAS Y ASTROCITOS  
MEDIADA POR ENDOCANNABINOIDES**



Tesis Doctoral  
Marta Navarrete Llinás  
Madrid, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Facultad de Medicina  
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**COMUNICACIÓN ENTRE  
NEURONAS Y ASTROCITOS  
MEDIADA POR ENDOCANNABINOIDES**

Tesis Doctoral  
Marta Navarrete Llinás  
Madrid, 2009



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACION



CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

Instituto de Neurobiología "Ramón y Cajal"

*Dr. Alfonso Araque*  
*Instituto Cajal, CSIC*  
*Doctor Arce 37, Madrid 28002*  
*Tel: 91 585 4710*  
*Fax: 91 585 4754*  
*E-mail: araque@cajal.csic.es*

Dr. Alfonso Araque Almendros, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto Cajal,

HACE CONSTAR:

Que Dña. Marta Navarrete Llinás ha realizado bajo mi dirección los trabajos de investigación destinados a la obtención del grado de Doctora en el Instituto Cajal (CSIC), cuyos resultados están recogidos en la presente memoria de Tesis Doctoral titulada **“Comunicación entre Neuronas y Astrocitos mediada por Endocannabinoides”**.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid a 1 de Abril de 2009,

Dr. Alfonso Araque  
Profesor de Investigación del CSIC

**A la memoria de mi Padre**

**A mi Madre**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo. Para mí la Tesis no es sólo este libro, sino que es cada minuto que durante estos años he compartido con todos vosotros. Empecé estando aún en la facultad, gracias al apoyo del Dr. Joaquín Espinosa, el cual me deslumbró con sus majestuosas lecciones de Química Cuántica. Fue en este laboratorio donde viví mis peores momentos personales, pero tuve la gran suerte de estar al lado de un segundo padre, que es lo que fue él para mí. Joaquín y Cipri, a quienes les debo un agradecimiento mayúsculo por muchos motivos, entre ellos, porque fueron los primeros en enseñarme la pasión por la Ciencia.

Añorando mi bata blanca cambié a un laboratorio en donde se investigaban los astrocitos, y yo pensé “¿y eso qué será?”. Fue el Dr. Alfonso Araque quien confió en mí, aún sabiendo que teníamos mucho camino que recorrer, y me dio la oportunidad de conocer la ciencia del primer mundo. Quiero expresar mi agradecimiento más sincero a Alfonso por toda la aportación humana y científica que me ha brindado. Gracias por hacerme ver que la ciencia, y en concreto la electrofisiología, puede ser un mundo apasionante. ¿Quién diría en mis comienzos que me gustaría cambiar cables y no ponerme una bata blanca? Gracias por enseñarme tus mayores principios: El principio de incertidumbre de los mundos de Araque, la dieta Araque, la noche Araque, al Club de fans de Araque, la campaña de motivación de Araque (sin plumas), la sabiduría de Araque. Ya ahora el Profesor Araque era, es, siempre será un referente donde fijarme.

A Gertru Perea, porque sin ella este trabajo no hubiese sido posible. No sé cómo se puede agradecer tanto a una persona, sus excelentes lecciones de seguridad, su optimismo en el trabajo, su paciencia y su comprensión. Gracias por convencerme de que la ciencia es un juego y que lo importante es participar. Creo por ello, que le tendría que dar las gracias a la ciencia por darme la oportunidad de conocer a Gertru, donde además de compañera la considero amiga. Gracias por ayudarme en mis malos momentos, vale, que han sido muchos, pero sin ti no hubiese sido capaz de superarlos, y ya sabes nuestro lema: “Ánimo pequeña”.

A Whashington Buño, a quien admiro por su generosidad, por su pasión por la investigación, por su sabiduría y sus ganas de aprender. Gracias por endulzarnos la hora taller con chocolate.

A todo el A-15-17, Marco, David, Carolina y Sol a quienes no sólo me han dejado un trozo de su laboratorio, sino también he disfrutado de su amistad. Para mi ha sido realmente especial haber compartido con vosotros todo este tiempo.

A mi Tutor, Ángel Núñez, por hacernos esos Martes tan amenos, por ayudarnos tantas veces con la sufrida burocracia universitaria y por supuesto a su alegría.

A Nueva York, porque marcó un antes y un después en mi Vida. A Alberto Pereda quien me brindó la oportunidad de conocer no sólo una gran ciudad sino también por poder ver una ciencia diferente en un país diferente. Al rilí, incrí, dipolaraix, ther... que marcó mi vida como científica (o algo parecido), al frente de liberación astrocitaria (FLA) y a un sin fin de recuerdos. A todos mis amigos, por sus ganas de conocer qué demonios está investigando esta loca ahora.

A Jorge y Leyre, por ayudarme con esas técnicas tan diferentes para mí y a Laura, que tiñó con un aire Argentino los últimos coletazos de esta Tesis. A Eduardo, por su característico humor picante. A Raúl, por su heroica paciencia, su ambulancia particular, los Martes de Café, las comidas tertulianas. Al Instituto Cajal en general.

Y por último, dos agradecimientos especiales:

A mi Familia, y en especial a mi Padre, a ti “Canete”, que aunque la maldita ciencia no me dio la oportunidad de despedirme de ti, ahora me ofrece la ocasión de dedicarte uno de nuestros mayores sueños. Sé que en los malos momentos siempre estabas en algún lugar para darme buenos consejos y en los buenos, estabas para disfrutarlos como el que más. A mi Madre, quien nunca perdió la fe en mí y de quien aprendí que todo tiene su parte positiva “siempre tiene una sonrisa para nosotros”. A los Víctors, Emilia y Juanjo a quienes les agradezco toda su confianza puesta en mí. Ellos fueron mi principio y a ellos les debo todo.

A ti Vicente, por todo: Tu no comprensión y tu paciencia, tus tardes de soledad (que ya me gustarían a mi), tu alegría, tu confianza en mi, tus ambiciones (contagiosas), por todo... Porque en pocas palabras se pueden decir muchas cosas, en Octubre te diré la palabra más importante de nuestras vidas... Por nuestros sueños.

Cuando despertó, el dinosaurio todavía estaba allí.

Augusto Monterroso.

Razonar y convencer, ¡qué difícil, largo y trabajoso!  
¿Sugestionar? ¡Qué fácil, rápido y barato!

Santiago Ramón y Cajal

Portada: 'Gruesa célula neurógica de la capa de las pirámides del asta de Ammón del hombre adulto.-A, grandes vacuolas del soma; a, b, huecos de las expansiones destinados á los gliosomas'. Dibujo original de S. Ramón y Cajal, conservado en el Museo Cajal.

# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes en el estudio de las células de glía	5
2. El ión calcio como base de la excitabilidad celular de los astrocitos	6
3. La sinapsis tripartita	9
3.1 Comunicación neurona-astrocito. Los astrocitos responden a la actividad sináptica	9
3.2 Comunicación astrocito-neurona. Participación de los astrocitos en la fisiología neuronal	11
4. Sistema endocannabinoide	13
4.1 Expresión de receptores de cannabinoides CB1 por astrocitos	15

## II. OBJETIVOS

19

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención y preparación de rodajas de hipocampo de ratón	23
2. Registros electrofisiológicos	23
3. Estimulación de axones	
3.1. Estimulación eléctrica convencional	24
3.2. Estimulación eléctrica mínima	25
4. Imagen de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular.	26
5. Foto-estimulación de neuronas	28
6. Inmunocitoquímica	28
7. Agentes Farmacológicos	29
8. Análisis de datos	30

## IV. RESULTADOS

1. Los astrocitos expresan receptores funcionales CB1	33
2. Los astrocitos responden con aumentos intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ a la despolarización neuronal	37
3. Endocannabinoides procedentes de neuronas piramidales de CA1 provocan elevaciones de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos	41
4. Consecuencias de las elevaciones de $\text{Ca}^{2+}$ astrocitarias en la excitabilidad neuronal.	
4.1. Las elevaciones de $\text{Ca}^{2+}$ mediadas por receptores CB1 en astrocitos generan corrientes lentas de entrada debidas a glutamato en neuronas piramidales	46

5. Consecuencias de las elevaciones de $\text{Ca}^{2+}$ astrocitarias sobre la transmisión sináptica excitadora.	
5.1. Las elevaciones de $\text{Ca}^{2+}$ mediadas por receptores CB1 en astrocitos provocan una potenciación transitoria de la transmisión sináptica excitadora	50
5.2. La potenciación sináptica requiere del aumento de $\text{Ca}^{2+}$ astrocitario	55
5.3. La potenciación sináptica inducida por endocannabinoides está mediado por los receptores mGlu de tipo I	59
5.4. La potenciación sináptica inducida por endocannabinoides es mediada por activación de proteínas G no sensibles a toxina pertúsica	60
5.5. La modulación sináptica inducida por endocannabinoides no depende de la expresión diferencial de receptores de CB1 sino de rutas específicas de señalización intercelular	61
5.6. Endocannabinoides inducen depresión homosináptica y potenciación heterosináptica	62
<b>V. DISCUSIÓN</b>	67
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	75
<b>VII. REFERENCIAS</b>	79
<b>VIII. SEPARATA</b>	91

---

## ABREVIATURAS

2AG:	2-araquidonilglicerol
AEA:	araquidoniletanolamida
AM:	acetoxi metiléster
AMPA:	ácido (RS)-2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPc:	adenil monofosfato cíclico
AP5:	ácido D-2-amino-5-fosfonopentanoico
ATP:	adenosina 5'-trifosfato
BAPTA:	ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
CNQX:	6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona
DIC:	contraste de interferencia diferencial (del inglés "Differential Interferente Contrast")
DSI/DSE:	supresión de la inhibición/excitación inducida por despolarización
EPSC:	corriente excitadora postsináptica
GABA:	ácido $\gamma$ -aminobutírico
HEPES:	ácido N-2(2-hidroxietil) peperacina-N-(2-etanosulfónico)
IP <sub>3</sub> :	inositol 1,4,5-trifosfato
mAChR:	receptor metabotrópico de acetilcolina
MAEA:	(R)-(+)-metanandamida
mGluR:	receptor metabotrópico de glutamato
mM:	milimolar
mV:	milivoltio
M $\Omega$ :	megaohmios
ND:	despolarización neuronal
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NP-EGTA:	o-nitrofenil ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético
pA:	picoamperio
PLC:	fosfolipasa C
PTX:	toxina pertúsica
SICs:	corrientes lentas de entrada
SN:	sistema nervioso
TTX:	tetrodotoxina
WIN:	WIN 55,212-2
$\mu$ M:	micromolar

## SUMMARY

Endocannabinoids and their receptor CB1 play key roles in brain function, and cannabinoid effects in brain physiology and drug-related behaviour are thought to be mediated by receptors present in neurons. Neuron-astrocyte communication relies on the expression by astrocytes of neurotransmitter receptors. Yet, the expression of cannabinoid receptors by astrocytes *in situ* and their involvement in the neuron-astrocyte communication remain largely unknown. Using electrophysiological and  $\text{Ca}^{2+}$  imaging techniques in mouse we show that hippocampal astrocytes express CB1 receptors that upon activation lead to phospholipase C-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from internal stores. These receptors are activated by endocannabinoids released by neurons, increasing astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  levels, which stimulate glutamate release that activates NMDA receptors in pyramidal neurons. Moreover, endocannabinoids released by hippocampal pyramidal neurons increase the probability of transmitter release at single CA3-CA1 synapses. This synaptic potentiation is due to CB1R-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes, which stimulate the release of glutamate that activates presynaptic group I metabotropic glutamate receptors. While endocannabinoids induce  $G_{i/o}$  protein-mediated homosynaptic depression by activation of presynaptic CB1Rs, they lead to heterosynaptic potentiation by activation of CB1Rs in astrocytes. These results reveal the existence of a new endocannabinoid-glutamate signaling pathway where astrocytes serve as a bridge for non-synaptic interneuronal communication. In summary, astrocytes respond to endocannabinoids, which leads to the modulation of neuronal excitability and synaptic transmission, indicating that astrocytes are actively involved in brain physiology.



## **I. INTRODUCCIÓN**

## **1. ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DE GLÍA.**

El Sistema Nervioso (SN) es un conjunto organizado de células que se comporta como un procesador de información que recibe del medio ambiente y de su propia actividad, y a través de la integración de la misma elabora diferentes respuestas biológicas. Las neuronas son reconocidas como los elementos celulares responsables del procesamiento de información del SN, gracias a una de sus propiedades fundamentales, la excitabilidad eléctrica, que constituye el sustrato biofísico de la codificación de información neuronal. Las neuronas transfieren la información entre ellas a través de estructuras especializadas en su membrana celular, las sinapsis, principalmente mediante la liberación de neurotransmisores químicos desde la terminal presináptica que provocan la activación de receptores específicos en la membrana postsináptica, lo cual representa la principal forma de comunicación en el SN. Otros tipos celulares fundamentales del SN son las células de glía. Este tipo celular fue descrito originalmente por R. Virchow en 1846, quien propuso el término de glía para referirse a estas células no neuronales y a la función que desempeñaban en el SN, esto es, ser el aglutinante (el significado en griego de glía) del SN. Posteriores estudios permitieron conocer y clasificar los distintos tipos de células gliales en dos grandes grupos: macroglía y microglía. Las células de la microglía son macrófagos con funciones fagocíticas implicadas en procesos inflamatorios en el SN. Por su parte, astrogλία, oligodendrogλία y células endimogliales en el SN central y células de Schwann en el SN periférico, constituyen el grupo de células de macroglía. Los oligodendrocitos y las células de Schwann son los responsables de la formación de la vaina de mielina que envuelve los axones neuronales en el SN central y periférico, respectivamente. Las células endimogliales son un tipo especializado de glía que revisten los ventrículos y el canal endimario en contacto con el líquido cefalorraquídeo.

La astrogλία forma un grupo heterogéneo de células que presentan diferentes morfologías y fenotipos en distintas regiones del SN, por ejemplo, células de Müller en la retina, células de la glía de Bergmann en el cerebelo, astrocitos protoplásmicos localizados en la sustancia gris, astrocitos fibrosos presentes en los tractos nerviosos de la sustancia blanca, astrocitos perivasculares en contacto con los vasos sanguíneos, etc. (véase Kettenmann y Ransom, 2005).

Durante siglos el estudio de las células de glía estuvo en un relativo segundo plano, sin embargo, es en la década de 1980 cuando se retoma con mayor interés el estudio de las células de la astroglia, desarrollándose numerosos estudios que pusieron de manifiesto las diferentes funciones que desempeñan estas células en el SN. La astroglia participa de forma relevante en numerosos aspectos del desarrollo, el metabolismo y la patología del SN, siendo decisivos en el soporte estructural y metabólico neuronal, la supervivencia, diferenciación y guía neuronal, el crecimiento neurítico, la sinaptogénesis, y la homeostasis cerebral regulando la concentración local de iones y sustancias neuroactivas (revisado por Kettenmann y Ransom, 2005).

## **2. EL IÓN CALCIO COMO BASE DE LA EXCITABILIDAD CELULAR DE LOS ASTROCITOS.**

La idea clásica que excluía a las células de glía de una participación activa en la fisiología del SN se basaba en el hecho de que éstas carecen de una propiedad fundamental que poseen las neuronas, a saber, la excitabilidad eléctrica. Las neuronas presentan en su membrana un conjunto de canales de membrana activados por voltaje o ligandos cuya activación produce flujos de corriente y, por tanto, cambios en el potencial de membrana. Estos cambios de potencial de la membrana celular constituyen el sustrato biofísico que subyace a los procesos de transferencia e integración de la información a nivel celular en las neuronas.

Las células gliales son células no excitables eléctricamente. Aunque estas células pueden presentar en su membrana la mayoría de los canales expresados por las neuronas (Sontheimer, 1994), el nivel de expresión de algunos canales voltaje-dependientes, cruciales para la generación de respuestas activas, es relativamente bajo, lo que dificulta que las células gliales sufran cambios significativos en su potencial de membrana en respuesta a diferentes estímulos y, aunque pueden mostrar pequeñas variaciones en su potencial de membrana, éstas sólo representan respuestas pasivas principalmente debidas a las variaciones de la concentración extracelular de potasio generadas por la actividad neuronal (Orkand *et al.*, 1966).

Las células eléctricamente excitables transforman su señal eléctrica en señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que son las responsables de desencadenar respuestas fisiológicas (secreción, movimiento, regulación de la expresión génica). Es decir, el  $\text{Ca}^{2+}$  es el encargado de

transformar señales eléctricas en respuestas complejas intracelulares. En el SN el  $\text{Ca}^{2+}$  está implicado en distintos procesos fisiológicos neuronales, e.g., controlando la excitabilidad celular, la liberación de neurotransmisor o la plasticidad sináptica (véase Nicholls *et al.*, 2001).

Aunque carecen de excitabilidad eléctrica, las células gliales y en particular los astrocitos sí son células excitables y su excitabilidad se basa en variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991). El desarrollo de nuevas técnicas de imagen y marcadores fluorescentes sensibles a iones, que conseguían monitorizar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células vivas, permitió demostrar que los astrocitos muestran una excitabilidad basada en variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este hallazgo supuso un cambio substancial en la visión de los astrocitos y sus funciones en el SN.

Los astrocitos muestran variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que puede presentarse de forma espontánea o en respuesta a diferentes estímulos. Esta señal de  $\text{Ca}^{2+}$  puede actuar como un mensajero intracelular o intercelular con importantes consecuencias funcionales. Esta excitabilidad celular en astrocitos se manifiesta como aumentos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y se basa en la existencia de bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma celular.

En tanto que las neuronas pueden utilizar el gradiente electroquímico de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular para aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, gracias a la activación de canales específicos activados por voltaje o ligando en su membrana, los astrocitos utilizan el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo endoplásmico como principal fuente para aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. La movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios intracelulares depende fundamentalmente de la activación de dos tipos de receptores: receptores de rianodina, sensibles a rianodina y cafeína; y receptores de inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), sensibles a  $\text{IP}_3$  producido por la activación de fosfolipasa C (PLC).

Una de las características de la excitabilidad por  $\text{Ca}^{2+}$  es que puede presentarse en ausencia de actividad neuronal (Parri *et al.*, 2001; Aguado *et al.*, 2002; Nett *et al.*, 2002). Esta señalización endógena se manifiesta en forma de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y se ha registrado en diferentes áreas cerebrales, por ejemplo, neocorteza, cerebelo, hipocampo y tálamo (Grosche *et al.*, 1999; Parri *et al.*, 2001; Aguado *et al.*, 2002; Nett

*et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2003). La presencia de estas oscilaciones es dependiente de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de reservorios sensibles a  $\text{IP}_3$ .

Por otro lado, los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  originados en un astrocito pueden propagarse sin decremento a los astrocitos vecinos formando lo que se denomina una “onda de  $\text{Ca}^{2+}$ ”, que puede alcanzar cientos de micrómetros con una velocidad de propagación de  $\sim 20 \mu\text{m/s}$  (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991; Newman y Zahs, 1997; Innocenti *et al.*, 2000). Por lo tanto, estas ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían actuar como una forma de comunicación entre astrocitos. Los mecanismos que subyacen a esta comunicación intercelular han sido ampliamente investigados y discutidos, y actualmente existen tres modelos que intentan explicar la propagación de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  (véase Cotrina y Nedergaard, 2005): 1) Difusión de  $\text{IP}_3$  a través de las uniones gap entre astrocitos. Este modelo propone que el  $\text{IP}_3$  formado en la célula estimulada podría difundir pasivamente a través de las uniones gap a los astrocitos con los que estuviese interconectado. 2) Comunicación regenerativa por ATP. El ATP liberado por la célula estimulada, ya sea por conexinas (hemicanales de membrana) o por exocitosis vesicular, actuaría como mensajero extracelular activando receptores purinérgicos en las células vecinas e iniciando el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células, lo cual produciría la liberación de ATP que activamente propagaría la onda de  $\text{Ca}^{2+}$ . 3) Liberación focal de ATP. En este modelo la estimulación de una célula daría lugar a la liberación de ATP que activaría los receptores purinérgicos de las células adyacentes e incrementaría su  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estos modelos no son excluyentes entre sí, es más, podrían coexistir en diferentes áreas cerebrales o bajo determinadas condiciones.

Mientras la existencia de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido claramente demostrada en preparaciones en cultivo (Cornell-Bell, *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991; Newman y Zahs, 1997, Araque *et al.*, 1998a,b; Harris-White *et al.*, 1998), la presencia de esta comunicación a larga distancia en preparaciones más intactas, como rodajas de cerebro o *in vivo* está discutida (véase Perea y Araque, 2005b). Algunos estudios muestran la presencia de estas ondas en rodajas de cerebro, pero restringidas en el número de células involucradas (Schipke *et al.*, 2002; Sul *et al.*, 2004), sugiriendo la posible existencia de circuitos gliales en la propagación de estas ondas.

Así pues, los astrocitos son capaces de comunicarse entre sí, transfiriendo la señal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual representa una forma de comunicación intercelular en el SN.

### 3. LA SINAPSIS TRIPARTITA.

En muchas regiones del SN central existe una íntima asociación entre los procesos astrocitarios y los elementos neuronales, ya sea con los cuerpos neuronales, dendritas o sinapsis (Ramón y Cajal, 1899; Ventura y Harris, 1999), lo cual supone una adecuada disposición física para la posible existencia de comunicación entre ellos. En la última década, diversos estudios han demostrado que los astrocitos pueden responder a la actividad neuronal con aumentos de su  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, existiendo así una comunicación entre neuronas y astrocitos más allá de la simple recaptura de neurotransmisores liberados a la hendidura sináptica. Además, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los astrocitos puede provocar la liberación de gliotransmisores, que pueden modular la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica, originándose una comunicación entre astrocitos y neuronas (véase Araque *et al.*, 2001, Perea y Araque, 2007).

Por tanto, dada la asociación física y la comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas, se ha propuesto un nuevo concepto en la fisiología sináptica: La Sinapsis Tripartita, en la que la sinapsis está funcionalmente constituida por tres elementos, esto es, los elementos pre y postsinápticos neuronales y los astrocitos adyacentes, existiendo un flujo de información entre estos tres elementos y donde los astrocitos participan activamente como elementos reguladores en la transferencia de información en el SN (Araque *et al.*, 1999).

#### ***3.1 Comunicación neurona-astrocito. Los astrocitos responden a la actividad sináptica.***

Los astrocitos expresan en su membrana una gran variedad de receptores de distintos neurotransmisores, tanto de tipo ionotrópico, que permiten un flujo selectivo de iones a través de la membrana celular, como metabotrópico, acoplados a distintas rutas de segundos mensajeros intracelulares. La aplicación exógena de diferentes neurotransmisores (glutamato, adenosina, norepinefrina, GABA, ATP, histamina o acetilcolina), resulta efectiva en aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tanto *in vitro* como *in situ* (véase Porter y McCarthy, 1997; Perea y Araque 2002; Kettenmann y Ransom, 2005, Haydon y Carmignoto, 2006). Muchos de estos neurotransmisores actúan a través de la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G,

	Neurotransmisor	Modelo Experimental	Área Cerebral	Referencias
Actividad Espontánea		Rodajas de Cerebro	Tálamo Ventrobasal Hipocampo Cerebelo Corteza Stratum	Aguado 2002, Parri et al., 2001 Aguado 2002, Nett et al., 2002 Aguado 2002; Grosche 1999 Aguado 2002; Peters et al., 2003 Aguado 2002
		In vivo	Corteza	Bekar et al., 2008; Dombek et al., 2007; Hirase et al., 2004; Takata y Hirase 2008; Göbel et al., 2007
Generada por Actividad Sináptica	Norepinefrina	Rodajas de Cerebro	Cerebelo	Kulik et al., 1999
		In vivo	Corteza	Bekar et al., 2008
	ATP	Rodajas de Cerebro	Hipocampo Cerebelo Retina Bulbo Olfativo	Bowser y Khakh, 2004 Beierlein y Regehr, 2006; Piet y Jahr 2007 Newman, 2003 Rieger et al., 2007
	GABA	Rodajas de Cerebro	Hipocampo	Serrano et al., 2006; Kang et al., 1998
	Glutamato	Rodajas de Cerebro	Hipocampo Corteza Núcleo Accumbens Cerebelo Bulbo Olfativo	Araque et al., 2002; Bezzi et al., 1998; Pasti et al., 1997; Perea y Araque, 2005 Pasti et al., 1997; Schipke et al., 2008 D'Ascenzo, et al., 2007 Beierlein y Regehr, 2006; Piet y Jahr 2007 Rieger et al., 2007
		In vivo	Corteza	Wang et al., 2006; Schummers et al., 2008
	Acetilcolina	Rodajas de Cerebro	Hipocampo	Araque et al., 2002; Perea y Araque, 2005
Óxido Nítrico	Rodajas de Cerebro	Cerebelo	Matyash, et al., 2001	
Generada No Sinápticamente	Endocannabinoide	Rodajas de Cerebro	Hipocampo	Navarrete y Araque, 2008

**Tabla 1.** La señal de  $Ca^{2+}$  astrocitaria.

que por la acción de segundos mensajeros (PLC e  $IP_3$ , principalmente) producen la liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios intracelulares y el consiguiente aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citosol (Pasti *et al.*, 1997; Porter y McCarthy, 1997; Veis *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1998; Kulik *et al.*, 1999; Araque *et al.*, 2002). Por tanto, la excitabilidad celular mostrada por los astrocitos puede ser desencadenada por activación de receptores de neurotransmisores.

El control sináptico de la señal de  $Ca^{2+}$  astrocitaria ha sido demostrado en determinadas regiones del SN central como en la retina (Newman, 2003), cerebelo (Grosche *et al.*, 1999; Kulik *et al.*, 1999), hipocampo (Porter y McCarthy, 1996; Pasti *et*

*al.*, 1997; Bezzi *et al.*, 1998; Araque *et al.*, 2002; Perea y Araque, 2005a) y corteza cerebral (Peters *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006) (Ver Tabla 1). Asimismo, la respuesta de los astrocitos a determinados neurotransmisores liberados sinápticamente, como glutamato, GABA, acetilcolina, noradrenalina y óxido nítrico, está bien documentada (véase Kettenmann y Ransom, 2005; Volterra y Meldolesi, 2005), pero se desconoce el posible control que otros sistemas de neurotransmisores puedan ejercer sobre la excitabilidad de los astrocitos.

### ***3.2. Comunicación astrocito-neurona. Participación de los astrocitos en la fisiología neuronal.***

Además de la comunicación entre neuronas y astrocitos, en la que los astrocitos actúan como receptores de la información sináptica, los astrocitos a su vez son capaces de enviar señales a los elementos sinápticos, estableciéndose así una comunicación entre astrocitos y neuronas.

Así como la comunicación neurona-astrocito está basada en el control sináptico de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria, esta señal de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta clave en los procesos de comunicación astrocito-neurona, ya que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  lleva a la liberación de neurotransmisores, denominados gliotransmisores, los cuales participan en la modulación de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica. Los astrocitos, ya sea en preparaciones en cultivo o *in situ*, pueden liberar distintos gliotransmisores (véase Volterra y Bezzi, 2002), entre otros, glutamato, ATP, D-Serina o  $\text{TNF}\alpha$ . La mayoría de estos gliotransmisores son liberados por mecanismos  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes (véase Perea y Araque, 2005b), aunque posiblemente en condiciones patológicas existen otros mecanismos alternativos (véase Volterra y Bezzi, 2002).

En preparaciones de células en cultivo así como en rodajas de cerebro, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos estimula la liberación de glutamato que activa receptores de tipo NMDA en la neurona postsináptica, aumentando así la excitabilidad neuronal (Araque *et al.*, 1998a,b; Parri *et al.*, 2001; Fellin *et al.*, 2004; Perea y Araque 2005a).

Asimismo, los astrocitos pueden estar involucrados en la modulación de la transmisión sináptica. En preparaciones de células en cultivo se ha descrito el papel modulador de los astrocitos en la transmisión sináptica, donde el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$



astrocitario estimula la liberación de glutamato, el cual reduce transitoriamente la transmisión sináptica excitadora e inhibitoria evocada por potenciales de acción. Esta modulación es debida a la activación de receptores metabotrópicos de glutamato en la terminal presináptica que reduce la liberación de neurotransmisor (Araque *et al.*, 1998a). Recientemente, en rodajas de hipocampo se ha demostrado el papel potenciador de los astrocitos en la transmisión sináptica, incrementando transitoriamente la probabilidad de liberación de neurotransmisor de las terminales presinápticas, mediada por la activación de receptores metabotrópicos de glutamato, lo que se traduce en un aumento de la eficacia en la transmisión sináptica (Perea y Araque, 2007).

Los astrocitos pueden intervenir en fenómenos de plasticidad heterosináptica. En rodajas de cerebro, se ha descrito su participación en la depresión heterosináptica dependiente de actividad (Zhang *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2005). En este caso, los astrocitos, mediante la liberación de ATP, que se degrada en el medio extracelular a adenosina, provocan la reducción de la liberación de neurotransmisor a través de la activación de receptores purinérgicos A1 en las terminales presinápticas. Esta modulación existe no sólo en presencia de una intensa actividad sináptica, sino que se expresa en estado basal, indicando que los astrocitos regulan el tono de la actividad sináptica excitadora (Pascual *et al.*, 2005). La transmisión sináptica espontánea también puede ser modulada por la actividad de los astrocitos. En células en cultivo, el aumento de  $Ca^{2+}$  astrocitario provoca la liberación de glutamato y el aumento de la frecuencia de corrientes sinápticas miniaturas, dependiente de la activación de receptores NMDA en las terminales presinápticas (Araque *et al.*, 1998b). En preparaciones más intactas, se ha demostrado que los astrocitos, a través de la liberación  $Ca^{2+}$ -dependiente de glutamato, pueden incrementar la frecuencia de corrientes sinápticas inhibitorias miniaturas (Kang *et al.*, 1998), y aumentar la frecuencia de corrientes sinápticas excitadoras espontáneas en las neuronas de CA1 de hipocampo (Fiacco y McCarthy, 2004), activando receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I en las terminales inhibitorias y excitatorias, respectivamente.

La modulación de la transmisión sináptica ha sido demostrada también para las células de Müller en la retina (Newman, 2003), la glía de Bergmann (Brockhaus y Deitmer, 2002) y las células perisinápticas de Schwann en el SN Periférico (Robiatille, 1998). Por tanto, la capacidad de los astrocitos de responder a la actividad sináptica y de modular en distinto grado la actividad sináptica y la excitabilidad neuronal sugiere que

estas células pueden ser elementos activos capaces de intervenir en los procesos de comunicación e integración del SN.

#### 4. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.

Durante siglos se ha utilizado un conjunto de compuestos psicoactivos presentes en un resina secretada por la planta *Cannabis sativa*, denominados cannabinoides (véase Adams y Martin, 1996). A estos compuestos se les atribuyen numerosos efectos sobre el cerebro, incluyendo entre otros, euforia, aumento de apetito, disminución de náusea y deterioro de la coordinación motora. Desde la identificación de su componente psicoactivo principal, (-)-trans- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) (Gaoni y Mechoulam, 1964), se han sintetizado o aislado numerosos compuestos relacionados, y juntos forman una clase de compuestos denominados cannabinoides.

Los cannabinoides ejercen sus efectos mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta el momento, se han caracterizado dos tipos de receptores de cannabinoides, denominados receptores CB1 y CB2, aunque se postula la existencia de receptores adicionales (Matsuda *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 1993). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por presentar siete dominios transmembrana, conteniendo 472-473 aminoácidos organizados. El receptor CB1 se expresa abundantemente en hipocampo, corteza, ganglios basales y cerebelo donde desempeña funciones neuromodulatorias relevantes en la fisiología cerebral (Chevaleyre *et al.*, 2006; Freund *et al.*, 2003; Heifets y Castillo, 2009; Rodriguez *et al.*, 2001). En menor grado de expresión, se encuentra también en hipotálamo y médula espinal. También se expresa en Sistema Nervioso Periférico, testículos, sistema inmune, glándula adrenal, médula ósea, corazón, vasos sanguíneos, pulmón, próstata, timo, amígdalas y bazo (Ramos Atance y Fernandez Ruiz, 2000; Howlett *et al.*, 2002). El receptor CB1 se expresa principalmente como receptor presináptico, y su efecto fundamental es la regulación de la liberación de algunos neurotransmisores, como dopamina, noradrenalina, glutamato y serotonina (Ishac *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 1999)

Por su parte, los recetores CB2 son expresados principalmente por las células del sistema inmune como por ejemplo, en células mieloides, macrófagos y monocitos de bazo, en leucocitos de sangre circulante, también en una gran variedad de líneas de

células inmunes en cultivo (células mieloides y eritroides, macrófagos, mastocitos y linfocitos T y B) (Pertwee, 1997,1998; Howlett *et al.*, 2002) y en distintos tejidos como bazo, timo, amígdalas, médula ósea y páncreas. También ha sido propuesta su presencia en corazón (Bouchard *et al.*, 2003; Lepicier *et al.*, 2003).

Los endocannabinoides son compuestos endógenos sintetizados y liberados principalmente por las neuronas, capaces de unirse y activar receptores de membrana y finalmente son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula. A diferencia de lo que ocurre con otros neurotransmisores, los endocannabinoides no son almacenados en el interior de vesículas sinápticas debido a la naturaleza lipofílica de estos compuestos (Piomelli, 2003). Su almacenamiento se produce en forma de un precursor (fosfolípido de membrana). Su síntesis se produce mediante hidrólisis de estos lípidos de membrana en el momento que existe necesidad de los mismos y son rápidamente recaptados por un transportador de alta afinidad, presente tanto en las neuronas como en las células gliales. Este mismo transportador puede también facilitar la difusión del endocanabinoide nuevamente sintetizado al espacio extracelular (Beltramo *et al.*, 1997; Di Marzo *et al.*, 1994; 2004, Hajos *et al.*, 2004; Hillard *et al.*, 1997). Una vez en el interior celular, los endocannabinoides son degradados por enzimas específicos. Así por ejemplo, la anandamida es degradada por la hidrolasa de la amida del ácido graso (FAAH) (Cravatt *et al.*, 1996, Hillard *et al.*, 1995, McKinney y Cravatt, 2005) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) es degradado por la lipasa del monoacilglicerol (Dinh *et al.*, 2002).

Los principales mecanismos intracelulares en los que están implicados los receptores de cannabinoides CB1 incluyen la inhibición de la adenilato ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos y la activación de la vía de las MAP quinasas (Howlett, 1998, Guzmán *et al.*, 2001). Se cree que el acoplamiento de estos receptores a proteínas  $G_{i/o}$  constituye la base de todos estos efectos. También, inhiben los canales de  $Ca^{2+}$  de tipo N, L (Mackie y Hille, 1992) y P/Q (Devane *et al.*, 1988) y aumentan la conductancia del  $K^+$ . El efecto combinado sobre ambos tipos de canales y el hecho de que la localización de estos receptores CB1 sea preferentemente presináptica, parece ser la base de la inhibición que los cannabinoides ejercen sobre la liberación de neurotransmisores. Finalmente, todos estos mecanismos de señalización pueden modular la comunicación sináptica y la expresión génica neuronal (Chevalleyre *et al.*, 2006; Heifets y Castillo, 2009).

#### **4.1. Expresión de receptores de cannabinoides CB1 por astrocitos.**

La presencia de receptores CB1 en astrocitos es controvertida. Algunos datos sugieren que los astrocitos en cultivo de ratas Wistar y Sprague-Dawley y ratones CD1 expresan el receptor CB1 (Bouaboula *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 1998; Molina-Holgado *et al.*, 2003), mientras que astrocitos cultivados de ratas de OFA y ratones C57BL/6 parecen no expresarlos (Jung *et al.*, 1997; Walter y Stella, 2003). Estos resultados contradictorios pueden ser explicados por las diferentes condiciones experimentales (estructuras usadas para preparar los cultivos de astrocitos y por las discrepancias en las condiciones y edades de dichos cultivos astrocitarios), ya que todas estas variables afectan al estado de diferenciación de astrocitos, y por tanto a la expresión del receptor CB1 (Daaka *et al.*, 1996; Noe *et al.*, 2000).

Respecto a los astrocitos *in situ*, se ha demostrado con microscopía electrónica y anticuerpos dirigidos contra la porción N-terminal de los receptores CB1, que los astrocitos expresan receptores CB1 en el núcleo caudado putamen, núcleo accumbens (Rodríguez *et al.*, 2001), en el asta dorsal de la médula espinal y en la amígdala. (Moldrich y Wenger, 2000; Salio *et al.*, 2002).

Por otra parte, la producción de endocannabinoides por astrocitos en cultivo está bien documentada (Walter *et al.*, 2002; Walter y Stella, 2003), pero *in situ* sigue siendo tema en estudio. En cultivo la síntesis de cannabinoides por astrocitos está regulada por  $Ca^{2+}$ , puesto que la estimulación de los astrocitos con ionomicina, ATP o endotelina-1 aumenta la producción de endocannabinoides (Walter *et al.*, 2002; Walter y Stella, 2003). Finalmente, se ha sugerido que los aumentos de los niveles de endocannabinoides que ocurren durante condiciones neuropatológicas (Panikashvili *et al.*, 2001) pueden ser debidos en parte a los endocannabinoides producidos por los astrocitos.

## **II. OBJETIVOS**

Recientes estudios han demostrado la existencia de una comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas (Araque *et al.*, 2001; Nedergaard *et al.*, 2003; Volterra y Bezzi, 2002, Perea y Araque, 2007). Los astrocitos responden con elevaciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  a neurotransmisores liberados por las terminales sinápticas (Perea y Araque, 2005a; Porter y McCarthy, 1996), modulan la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica mediante la liberación de sustancias neuroactivas llamadas gliotransmisores (Araque *et al.*, 1999; Beattie *et al.*, 2002; Volterra y Bezzi, 2002).

El sistema endocannabinoide está formado por neurotransmisores y receptores que activan una vía de señalización intercelular implicada en la modulación de la neurotransmisión, lo que se traduce en distintas respuestas fisiológicas mediadas por los mismos. Aunque la presencia de receptores de cannabinoides se ha demostrado en astrocitos en cultivo (Molina-Holgado, 2003; Stella, 2004; Walter y Stella, 2003), se desconoce la posible expresión de receptores funcionales de cannabinoides por astrocitos *in situ*. Por ello, planteamos como Primer Objetivo

**EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN ASTROCITOS DE HIPOCAMPO.**

Si bien los endocannabinoides desempeñan un papel importante en la fisiología cerebral, resulta crucial la identificación de los mecanismos celulares implicados en la señalización por endocannabinoides. Por lo tanto, planteamos como Segundo Objetivo

**EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE GENERACIÓN DE LA SEÑAL DE  $\text{Ca}^{2+}$  INDUCIDA POR ENDOCANNABINOIDES EN ASTROCITOS.**

Dado que la comunicación entre neuronas y astrocitos es una comunicación bidireccional, en la que los astrocitos, además de responder a la actividad sináptica con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pueden comunicarse con las neuronas mediante la liberación de gliotransmisores  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente. Por tanto, planteamos como Tercer Objetivo

**EL ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE LA SEÑAL DE  $\text{Ca}^{2+}$   
ASTROCITARIA INDUCIDA POR ENDOCANNABINOIDES SOBRE LA  
EXCITABILIDAD NEURONAL.**

Puesto que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria generada experimentalmente ha sido demostrada ser capaz de modular la transmisión sináptica (Perea y Araque 2007; Zhang *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2005), planteamos como Cuarto Objetivo

**EL ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE LA SEÑAL DE  $\text{Ca}^{2+}$ .  
ASTROCITARIA INDUCIDA POR ENDOCANNABINOIDES SOBRE LA  
TRANSMISIÓN SINÁPTICA EXCITADORA.**

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE RODAJAS DE HIPOCAMPO DE RATÓN.

Las rodajas de hipocampo se obtuvieron de ratones C57BL/6 de 12-17 días de edad. Los animales fueron decapitados y sus hemisferios expuestos por craneotomía. El cerebro fue rápidamente extraído y bañado periódicamente con líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a 4 °C (Araque y *col.*, 2002; Perea y Araque, 2005a). Todos los procedimientos para manipular y sacrificar animales siguieron las directrices de la Comisión de la Comunidad Europea (86/609/CEE) y fueron supervisados por el veterinario oficial del Instituto Cajal. Una vez situado el cerebro en la cámara de corte, se realizaron cortes transversales (350-400  $\mu\text{m}$  de espesor) con vibrátomo (Pelco 101, Series 1000, St Louis, MES). Las rodajas así obtenidas, se incubaron durante >1 h en LCA, burbujeadas permanentemente con carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), a temperatura ambiente (21-24 °C). El LCA contenía (en mM): NaCl: 124, KCl: 2.69, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.25, MgSO<sub>4</sub>: 2, NaHCO<sub>3</sub>: 26, CaCl<sub>2</sub>: 2 y glucosa: 10 (pH= 7.3). Posteriormente, las preparaciones fueron transferidas a la cámara de registro (para rodajas sumergidas, con un volumen de 2 ml), donde se mantuvo el burbujeo con carbógeno. En algunos experimentos el LCA fue modificado para optimizar la activación de los receptores de NMDA, sustituyendo equimolarmente el Mg<sup>2+</sup> por Ca<sup>2+</sup> y se añadió 10  $\mu\text{M}$  de glicina. Las células fueron visualizadas con un microscopio Olympus BX50WI (Olympus Optical, Tokyo, Japan), equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC), un objetivo de 40x de inmersión en agua y una cámara CCD sensible a la luz infrarroja. En algunos casos, se utilizaron ratones modificados genéticamente que carecen del receptor CB1, generosamente donados por el Dr. A. Zimmer (Zimmer y *col.*, 1999).

## 2. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Los registros electrofisiológicos de las neuronas piramidales de CA1 se realizaron usando la técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula entera. Los electrodos de registro se fabricaron a partir de capilares de borosilicato con capilar interno (OD-ID: 1.5-0.86 mm; Sutter Instrument Co., Novato, CA), con una resistencia de 6-10 M $\Omega$ , y llenados con una solución intracelular que contenía (en mM): KMeSO<sub>4</sub>: 100, KCl: 50, HEPES: 10, ATP-Na<sub>2</sub>: 4 (pH = 7.3). Los registros de las corrientes iónicas

de membrana se obtuvieron con un amplificador PC-ONE (Dagan Instruments, Minneapolis, MN). Las capacidades rápida y lenta de la membrana celular fueron neutralizadas y la resistencia en serie fue compensada (~ 70%), y el potencial de membrana se mantuvo a -60 mV ó -70 mV. Las señales fueron filtradas a 1 KHz y transferidas con una frecuencia de muestreo de 10 KHz a un ordenador Pentium IV a través de una tarjeta de conversión analógico-digital DigiData 1440 (Axon Instruments). El programa de ordenador pCLAMP 10 (Axon Instruments) se utilizó para la generación de los estímulos y la adquisición y almacenamiento de los datos. En algunos experimentos se realizaron registros electrofisiológicos de pares de neuronas piramidales de CA1, cuyos somas distaban < 100  $\mu$ m.

Para analizar los efectos de la despolarización neuronal (ND) sobre la frecuencia de corrientes lentas de entradas, SICs (del inglés “Slow Inward Currents”), se compararon el número de SICs registradas en una neurona durante 50 s antes (basal) y 50 s después del inicio de la despolarización neuronal. Para ilustrar el curso temporal de los efectos de la despolarización neuronal sobre la aparición de SICs, el número de SICs fue agrupado en intervalos de 5 s y el número de SICs para cada intervalo fue calculado promediando los valores obtenidos a partir del registro apareado de 16 neuronas (n = 8 rodajas). Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-24 °C), a menos que se indique lo contrario.

### **3. ESTIMULACIÓN DE AXONES.**

#### ***3.1. Estimulación eléctrica convencional***

La estimulación eléctrica de las vías axónicas se produjo por estimulación convencional mediante el uso de electrodos bipolares de nicrom (80  $\mu$ m de diámetro), conectados a un estimulador a través de unidades de aislamiento (Grass S88, Quincy, MA, USA). Los electrodos de estimulación se situaron sobre *stratum radiatum* de CA1 para estimular las colaterales de Schaffer. Salvo indicación expresa en el texto, se aplicaron estímulos a 0.33 Hz.

### 3.2. Estimulación eléctrica mínima

Para el estudio de las posibles consecuencias del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario por endocannabinoides en la transmisión sináptica se estimularon los axones de las colaterales de Schaffer mediante estimulación mínima, que permite registrar la actividad de una o muy pocas sinapsis (Dobrunz and Stevens, 1997; Stevens y Wang, 1995; Isaac et al., 1996), utilizando bajos valores de intensidad de estimulación (5-10 mA en la salida del estimulador).

Se utilizaron para la estimulación dos electrodos de plata clorurados (Ag/AgCl) incluidos de manera independiente en un capilar septado (TST 150-6, World Precision Instruments, Inc.) y estirado, con un diámetro en la punta del electrodo de  $\sim 5 \mu\text{m}$ . Los capilares se llenaron con solución extracelular y se conectaron a un estimulador (S-900, DAGAN Corporation) y a una unidad de aislamiento del estímulo (S-910, DAGAN Corporation).

Se analizaron las corrientes sinápticas, denominadas EPSCs o aciertos (éxitos en la liberación de neurotransmisor desde la terminal presináptica), aquéllas cuya amplitud superaban tres veces el desvío estándar de la señal basal, i.e., EPSCs  $> 3 \text{ pA}$ . La ausencia de EPSCs fue considerada como un fallo en la liberación de neurotransmisor en la terminal presináptica. La clasificación de aciertos y fallos se realizó visualmente siguiendo este criterio.

Para aceptar que los registros obtenidos eran consecuencia de la estimulación mínima de una o muy pocas sinapsis, se siguieron además los siguientes criterios (Stevens y Wang, 1995; Isaac et al., 1996; Dobrunz y Stevens, 1997):

- 1) La proporción de fallos y aciertos, así como la amplitud de los aciertos no sufrieron cambios aún cuando se aumentó la intensidad de estimulación  $\sim 65 \%$ .
- 2) La latencia y la forma de los EPSCs no cambiaron durante la estimulación.
- 3) La disminución de la intensidad de estimulación provocó la rápida desaparición de todas las respuestas.

Se analizaron los siguientes parámetros generados por estimulación mínima:

- a) Potencia sináptica: amplitud media de los EPSCs.

b) Probabilidad de liberación: proporción del número de EPSCs registrados respecto al número total de estímulos.

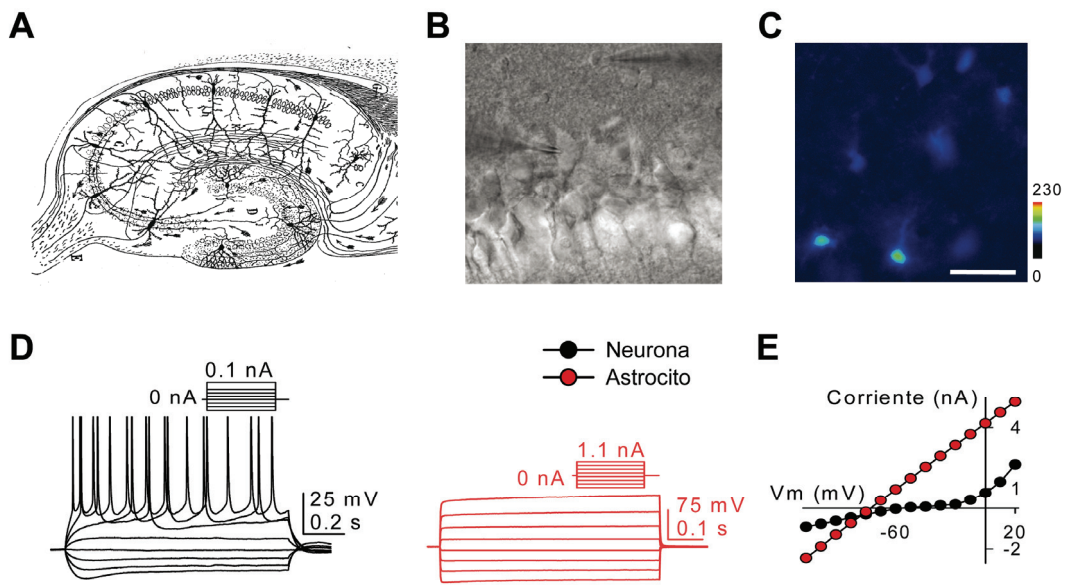
c) Eficacia sináptica: amplitud media de todas las respuestas, incluyendo fallos y aciertos.

Se aplicaron estímulos a 0.33 Hz durante el tiempo de registro. En estos experimentos la solución extracelular contenía en su composición Picrotoxina (50  $\mu\text{M}$ ), un bloqueante del canal asociado a los receptores  $\text{GABA}_A$  (receptor ionotrópico involucrado en la transmisión rápida inhibitoria), y Saclofen (100  $\mu\text{M}$ ), antagonista de los receptores  $\text{GABA}_B$  (receptor metabotrópico involucrado en la transmisión inhibitoria por segundos mensajeros) consiguiendo así aislar las respuestas sinápticas excitadoras.

#### 4. IMAGEN DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR.

Los astrocitos de la región del *stratum radiatum* fueron identificados de acuerdo a sus propiedades morfológicas y electrofisiológicas (Pasti y col., 1997; Bergles y Jahr, 1997; Bezzi y col., 1998; Bergles y col., 2000; Araque y col., 2002): soma pequeño y redondeado ( $< 15 \mu\text{m}$ ), con numerosos procesos delgados y ramificados (detectados tras el llenado de la célula con el marcador fluorescente) (Fig 1). Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron registrados mediante microscopía de fluorescencia, utilizando el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  fluo-4-AM (Molecular Probes, Eugene, OR). Las rodajas fueron incubadas con fluo-4-AM durante 30-60 min a temperatura ambiente. Se aplicó directamente 2-5  $\mu\text{l}$  del marcador a una concentración de 2 mM sobre el hipocampo, alcanzando una concentración final de 2-10  $\mu\text{M}$ . En estas condiciones, la mayoría de las células llenadas fueron astrocitos (Araque y col., 2002; Kang y col., 1998; Nett y col., 2002; Parri y col., 2001; Perea y Araque, 2005a), que fueron identificados por sus características morfológicas, confirmadas en algunos casos por sus propiedades electrofisiológicas. Las células fueron iluminadas a 490 nm utilizando una lámpara de xenón acoplada a un monocromador Polychrome II (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Germany). Las células se iluminaron durante 200-500 ms cada 1 s. Para estimar si existían cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se analizó la razón  $(F-F_0)*100/F_0$ , siendo F la fluorescencia obtenida en cada secuencia y  $F_0$  la fluorescencia basal ( $F_0 =$  promedio de 5-10 valores de fluorescencia anteriores al estímulo aplicado o valores correspondientes al inicio del

registro, en el caso de variaciones espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$ ). A los valores de fluorescencia se restó la señal de fondo (“background”, correspondiente a procesos de autofluorescencia de las células y uniones no específicas de la sonda con otros elementos). Se consideró que existía respuesta astrocitaria de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando la señal de fluorescencia,  $(F-F_0)*100/F_0$ , era 3 veces superior al desvío estándar de la señal basal.



**Figura 1. Modelo experimental. Identificación morfológica y electrofisiológica de neuronas piramidales de CA1 y astrocitos del *stratum radiatum* de hipocampo de ratón.** (A) Dibujo de Cajal representando un hipocampo de mamífero. Reproducido con el permiso de un dibujo original conservado en el Legado Cajal. (B) Imagen de microscopía de infrarrojo con contraste de fase mostrando el registro de una neurona piramidal y un astrocito en el *stratum radiatum*. (C) Imagen en pseudocolor en una región representativa de *stratum radiatum* que muestra 8 astrocitos llenados con Fluo 4-AM. Barra calibración, 40  $\mu\text{m}$ . (D) Registros en fijación de corriente de las variaciones del potencial de membrana inducidas por pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes en la neurona piramidal y un astrocito. Nótese la ausencia de potenciales de acción en el astrocito. (E) Relación corriente-voltaje medidas en el estado estacionario de las corrientes en el astrocito y la neurona. Los astrocitos muestran una relación corriente-voltaje lineal, indicando un comportamiento pasivo frente a cambios de potencial de membrana.

Los parámetros utilizados para cuantificar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria fueron: la probabilidad de ocurrencia de una espiga de  $\text{Ca}^{2+}$ , definida como aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorios, y la frecuencia de las espigas de  $\text{Ca}^{2+}$ , denominada oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$ . La probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  fue calculada a partir del número de elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  agrupadas en intervalos de 5 s registrados a partir de 6 a 14 astrocitos en el campo visual. El tiempo de la espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  se consideró en el inicio de la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$ . La frecuencia de la oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  se obtuvo a partir del número de las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurrían en 6 a 14 astrocitos en el campo visual, durante intervalos de 50 segundos antes (basal) y después del inicio de la despolarización neuronal. Para probar

los efectos de la despolarización neuronal, ND (del inglés “Neural Depolarization”) para la probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo diversas condiciones, se promedió y comparó la probabilidad basal (50 s antes de la ND) y máxima (5-10 s después de la ND) en diversas rodajas. Los valores medios se obtuvieron del análisis de al menos 4 rodajas para cada condición.

## 5. FOTO-ESTIMULACIÓN DE NEURONAS.

Alternativamente a la estimulación de neuronas por pulsos despolarizantes, se utilizaron técnicas de foto-estimulación de agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (conocidos como “jaulas de  $\text{Ca}^{2+}$ ”), con las que se conseguía aumentar rápidamente los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una neurona. Como agente quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó *o*-nitrofenil EGTA (NP-EGTA; Molecular Probes, Eugene, OR), el cual es fotoactivable por luz ultravioleta (UV). NP-EGTA presenta una alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  que disminuye drásticamente (hasta 12.000 veces) después de la estimulación con luz UV, permitiendo el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma celular.

La estimulación con pulsos de luz UV se realizó con un sistema de iluminación JML-C2 (Rapp OptoElectronic, Hamburg, Germany). Para la estimulación selectiva de una única neurona y la monitorización de los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se incluyeron NP-EGTA (5 mM) y Fluo-4 (50-100  $\mu\text{M}$ ) en la pipeta de registro. La estimulación con pulsos de luz UV se concentró en el soma provocando consistentemente la fotólisis de NP-EGTA y el correspondiente aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona registrada.

En estos experimentos las neuronas fueron iluminados durante 50-100 ms a 150V y la captura de las imágenes se realizó cada 0.5 s.

## 6. INMUNOCITOQUÍMICA.

Los ratones fueron anestesiados y perfundidos transcardialmente con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) a 0.1 M. Los cerebros fueron extraídos y postfijados en paraformaldehído al 4% en el PB al 0.1 M durante 3 h. Se realizaron cortes transversales de 35  $\mu\text{m}$  de grosor en vibrátomo que posteriormente fueron procesadas para estudiar la expresión de los receptores CB1 en astrocitos. Las secciones fueron preincubadas en 0.25% Triton X-100 con suero normal de cabra al 3% en PB 0.1

M durante 2 h. Posteriormente, se transfirieron a una nueva solución que contenía el anticuerpo para los receptores de cannabinoides del tipo 1 (CB1Rs) policlonal anti-rata (dilución 1:250; Affinity Bioreagents). Para detectar la colocalización de los receptores CB1 en astrocitos, se utilizó como marcador astrocitario el anticuerpo para GFAP (GFAP-Cy3 monoclonal de ratón, dilución 1:1000; Sigma) que fue añadido a la solución que contenía el anticuerpo para receptores CB1. Las secciones fueron incubadas durante 24 h a 4°C y transferidas a una solución que contenía el anticuerpo secundario, Alexa 488 anti-conejo conjugado IgG (1:1000; Molecular Probes). Finalmente, las rodajas fueron montadas en glicerol (50% en PB 0.1 M) y examinadas usando microscopía confocal. Los controles se realizaron en ausencia del anticuerpo primario para receptores de CB1, y no se detectó marcaje específico alguno.

## 7. AGENTES FARMACOLÓGICOS.

N- (Piperidin-1-il) - 5 (4-iodofenil) - 1 (2,4-diclorofenil) - 4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (AM-251), Araquidoniletanolamida (AEA), 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetate (BAPTA), 6 ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), D (-) - ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (AP5), clorohidrato de piridina 2-Metil-6- (feniletinil) (MPEP), 2-Araquidonilglicerol (2AG), (S) - (+) - ácido  $\alpha$ -Amino-4-carboxi-2-metilbenzeneacético (LY367385), (RS) - ácido propilsulfónico 3-Amino-2- (4-clorofenil) (Saclofen), (R) - (+) - Metanandamida (MAEA), thapsigargin, fueron suministrados por Tocris Cookson (Bristol, UK). Tetrodotoxina (TTX) fue adquirida a Alomone Labs. (Jerusalén, Israel); 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphorylcholine (Et-O-CH<sub>3</sub>) Calbiochem; Fluo-4-AM (Molecular Probes, Eugene, OR). El resto de drogas fueron suministradas por Sigma.

WIN, 2AG, AEA, MAEA fueron aplicados por pulsos de presión durante 1-5 s (PMI-100 DAGAN, Minneapolis, MN). Se utilizaron capilares llenados con soluciones de WIN (300  $\mu$ M), 2AG (100  $\mu$ M), AEA (300  $\mu$ M) o MAEA ( $\mu$ M 300), en LCA. GABA (300 mM, pH = 4) fue aplicado ionofóricamente. Los experimentos por pulsos de presión y por ionoforesis fueron realizados en presencia de 1  $\mu$ M TTX.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se realizaron mediante el uso de los programas Excel (Microsoft Office 2003) y SigmaPlot 8.0. La medida de fluorescencia en los astrocitos y el tratamiento de las imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizaron con los programas IPLab 3.7 (Scanalytics, BD Biosciences Rockville, MD, USA) y Photoshop 7.0, respectivamente. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar, indicándose en cada caso el tamaño de la muestra ( $n$ ). Las diferencias estadísticas fueron establecidas usando el test *t de Student*, asignándose un asterisco (\*) a diferencias significativas con  $p < 0.05$ , dos asteriscos (\*\*) a diferencias muy significativas con  $p < 0.01$  y tres asteriscos (\*\*\*) a diferencias altamente significativas con  $p < 0.001$ .



## **IV. RESULTADOS**

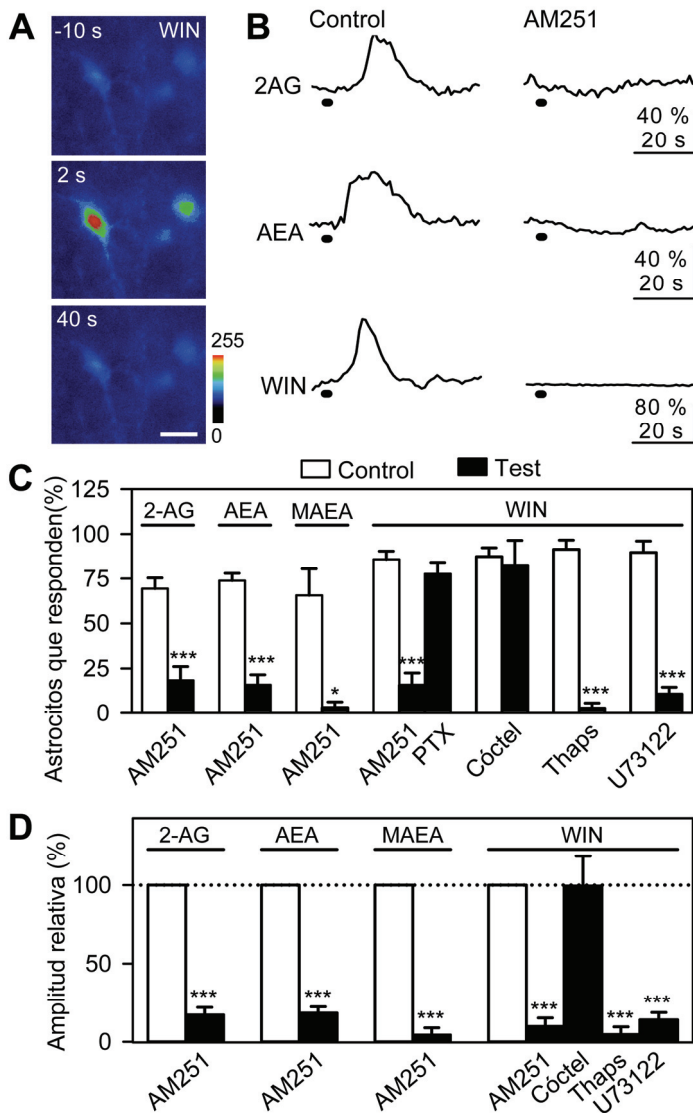
Los astrocitos presentan en su membrana una amplia batería de receptores de un gran número de transmisores. Las preparaciones de células en cultivo han permitido caracterizar diferentes tipos de receptores mediante la aplicación exógena de distintos neurotransmisores (revisado por Verkhratsky y *et al.*, 1998; Kettenmann y Steinhäuser, 2005). Sin embargo, la presencia de estos receptores en preparaciones más intactas (como rodajas de cerebro en cultivo, rodajas frescas agudas o *in vivo*), así como su activación por la actividad neuronal sólo ha sido confirmada para algunos neurotransmisores, a saber, glutamato, adenosina, ATP, GABA, histamina, acetilcolina y noradrenalina (Duffy *et al.*, 1995; Porter y McCarthy, 1996, 1997; Pasti *et al.*, 1997; Bezzi *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1998; Robitaille, 1998; Verkhratsky *et al.*, 1998; Guthrie *et al.*, 1999; Kulik *et al.*, 1999; Shelton y McCarthy, 1999, 2000; Araque *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006). El sistema de señalización por endocannabinoides resulta clave en numerosos procesos fisio-patológicos cerebrales, desde fenómenos de plasticidad sináptica, que representan el sustrato celular de la memoria y el aprendizaje, hasta fenómenos comportamentales como los procesos de adicción (e.g., Chevaleyre *et al.*, 2006)

Mientras que la expresión de receptores de cannabinoides en células gliales ha sido estudiada en preparaciones en cultivo (Molina-Holgado *et al.*, 2002; Piomelli, 2003), la presencia de estos receptores en astrocitos de preparaciones más intactas, como rodajas de cerebro o *in vivo* no está documentada. Así pues, investigamos si los astrocitos de hipocampo *in situ* expresan receptores funcionales de endocannabinoides de tipo CB1.

## 1. LOS ASTROCITOS EXPRESAN RECEPTORES FUNCIONALES CB1.

Para conocer si los astrocitos *in situ* expresan receptores CB1 registramos los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en astrocitos situados en el *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo y analizamos las respuestas a la aplicación local de distintos agonistas de receptores CB1, tanto endógenos como sintéticos. La aplicación local de 2-Araquidonilglicerol (2AG), Araquidoniletanolamida (AEA), (R) - (+) - Metanandamida (MAEA) o (R) - (+) - WIN 55.212-2 (WIN) por pulsos de presión a través de una micropipeta, aumentó los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en 125 de 169 astrocitos

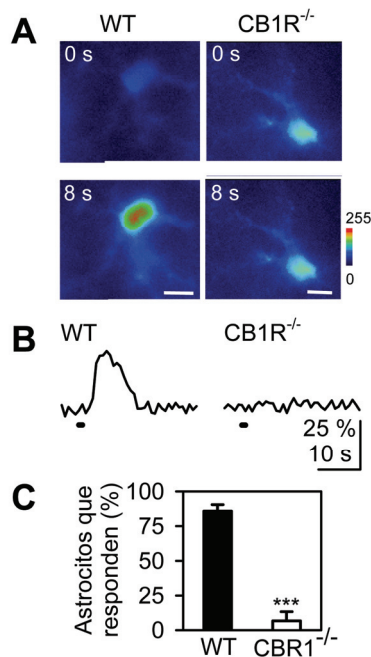
registrados (de una muestra representativa de  $n = 21$  rodajas; Figura 2, A-C). El número de astrocitos que respondían y el cambio relativo de fluorescencia generado por los distintos agonistas fueron bloqueados por el antagonista selectivo de receptores CB1, AM251 ( $2 \mu\text{M}$ ; Figura 2, B-D), indicando que los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  observados estaban mediados por la activación de receptores CB1.



**Figura 2. La activación de los receptores de cannabinoides genera aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de hipocampo.** (A) Imágenes en pseudocolor representando intensidad de fluorescencia de un astrocito de hipocampo, de la región *stratum radiatum*, llenado con fluo-4 AM, en control (-10 s), 2 s y 40 s después de la aplicación de WIN por pulsos de presión. Barra de calibración,  $15 \mu\text{m}$ . (B) Trazos representativos de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario generados por la aplicación local (2 s) de 2AG ( $100 \mu\text{M}$ ), AEA ( $300 \mu\text{M}$ ), y WIN ( $300 \mu\text{M}$ ), en control y en presencia de  $2 \mu\text{M}$  de AM251, antagonista de receptores CB1. (C y D) Proporción de astrocitos que responden y cambios de fluorescencia relativos inducidos por agonistas de receptores CB1 en control (barras blancas) y bajo diferentes condiciones experimentales (barras negras). El cóctel contiene antagonistas glutamatérgicos, GABAérgicos, colinérgicos, purinérgicos y TTX. Cada barra representa  $\geq 30$  astrocitos de  $\geq 4$  rodajas. Las diferencias significativas fueron establecidas con  $p < 0.05$  (\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*)

Dado que estas respuestas astrocitarias podrían ser inducidas indirectamente por la activación de receptores CB1 presentes en los terminales sinápticos glutamatérgicos y GABAérgicos (Alger, 2002; Chevaleyre *et al.*, 2006; Freund *et al.*, 2003; Llano *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 2001), analizamos las respuestas de los astrocitos a la aplicación local de WIN tras bloquear la neurotransmisión glutamatérgica, GABAérgica,

colinérgica y purinérgica. Para ello utilizamos un cóctel de antagonistas que contenía CNQX (20  $\mu$ M; de los receptores de glutamato AMPA y kainato), AP5 (50  $\mu$ M; de los receptores NMDA de glutamato), MPEP (50  $\mu$ M; de los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR5), LY367385 (100  $\mu$ M; de los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR1), picrotoxina (50  $\mu$ M; de los receptores de GABA<sub>A</sub>), saclofen (100  $\mu$ M; de los receptores de GABA<sub>B</sub>), atropina (50  $\mu$ M; de los receptores colinérgicos muscarínicos), CPT (10  $\mu$ M; de los receptores de adenosina A1), y suramina (100  $\mu$ M; de los receptores purinérgicos P2Y). El cóctel también contenía TTX (1  $\mu$ M) para prevenir la actividad sináptica mediada por potenciales de acción. En estas condiciones, la proporción de astrocitos que respondían a la aplicación local de WIN y la amplitud de los aumentos de Ca<sup>2+</sup> no se afectaron significativamente, sugiriendo que las respuestas observadas estaban mediadas por la activación directa de receptores CB1 en astrocitos.



**Figura 3. Los astrocitos de ratones transgénicos de receptores CB1 (CB1<sup>-/-</sup>) no responden con aumentos de Ca<sup>2+</sup> a la aplicación de cannabinoides.** (A) Imágenes en pseudocolor que representan intensidades de fluorescencia de astrocitos llenados con fluo-4 AM en rodajas de hipocampo tanto de ratones silvestres (WT) como de ratones transgénicos (CB1<sup>-/-</sup>) (de izquierda a derecha, respectivamente) antes y 8 s después de la aplicación localizada de WIN (300  $\mu$ M). Barra de calibración, 7  $\mu$ m. (B) Niveles de Ca<sup>2+</sup> generados por la aplicación local (2 s) de WIN, en ratones WT y ratones CB1<sup>-/-</sup>. (C) Proporción de astrocitos que responden a la aplicación de WIN en ratones WT y CB1<sup>-/-</sup>. Cada barra representa el número de astrocitos  $\geq$  30 en  $\geq$  8 rodajas. Las diferencias significativas fueron establecidas con  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Para confirmar la expresión de receptores CB1 funcionales en astrocitos, estudiamos además los aumentos de Ca<sup>2+</sup> astrocitarios en rodajas de hipocampo de ratones transgénicos que carecen de la expresión de receptores CB1 (CB1<sup>-/-</sup>) (Zimmer *et al.*, 1999). En estas preparaciones, la aplicación de WIN no produjo aumentos de Ca<sup>2+</sup> en 27 de 30 astrocitos de 8 rodajas de hipocampo (Figura 3). Para comprobar que los astrocitos de estos ratones transgénicos conservan la maquinaria necesaria para responder con aumentos de Ca<sup>2+</sup>, decidimos aplicar ATP (adenosina 5'-trifosfato) por su capacidad de generar aumentos de Ca<sup>2+</sup> intracelular en los astrocitos, mediante la

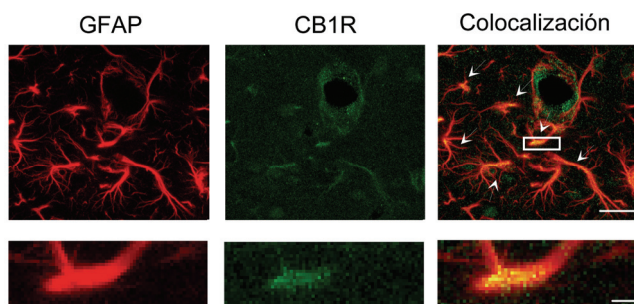
activación de receptores purinérgicos. Con este fin aplicamos ATP y aumentó el  $\text{Ca}^{2+}$  en 22 de 23 astrocitos registrados, confirmando que estas rodajas mantenían la maquinaria necesaria para aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Por lo tanto, estos resultados indican que son los receptores CB1 los responsables de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios observados.

Los receptores CB1 se acoplan principalmente a proteínas  $G_{i/o}$  sensibles a toxina pertúsica (PTX), que regulan los niveles de adenosil monofosfato cíclico (AMPC). Además, recientes estudios indican que estos receptores también se pueden acoplar a proteínas  $G_{q/11}$  que activan fosfolipasa C (PLC) (Lauckner *et al.*, 2005). El siguiente objetivo de estudio que nos propusimos fue estudiar la cascada intracelular involucrada en las respuestas astrocitarias mediadas por receptores CB1. Para ello utilizamos herramientas farmacológicas. Así, primero quisimos investigar la naturaleza de la proteína G implicada mediante incubación de las rodajas con 7.5  $\mu\text{g/ml}$  PTX durante 4-8 h y analizamos la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria. Para confirmar la eficacia del tratamiento con PTX, primero aplicamos GABA, que provoca aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por los receptores  $\text{GABA}_B$  (Kang *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2006), que están acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  (Catsicas y Mobbs, 2001). Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  generados por GABA fueron observados regularmente en las rodajas control (21 de 38 astrocitos  $n = 7$  rodajas) pero éstos no se observaron en 24 de 29 astrocitos de 4 rodajas pretratadas con PTX. En esas rodajas tratadas con PTX la proporción de los astrocitos que respondieron con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  a la aplicación local de WIN era similar a las rodajas control (Figura 2, C), indicando que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria inducida por la activación de receptores CB1 no estaba mediada por proteínas G sensibles a PTX.

Posteriormente, analizamos la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares incubando las rodajas con tapsigargina, un inhibidor de la ATP-asa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico que conduce al agotamiento de dichos reservorios (Araque *et al.*, 1998a). Tras la obtención de los registros en condiciones control, las rodajas fueron incubadas con tapsigargina (1  $\mu\text{M}$ ) durante 30-45 min. Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios generados por WIN en condiciones control desaparecieron tras la incubación con tapsigargina (Figura 2, C), indicando que los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  generados por activación de los receptores CB1 requieren del  $\text{Ca}^{2+}$  procedente de los reservorios intracelulares.

Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios también fueron bloqueados por el antagonista de la fosfolipasa C (PLC), U73122 ( $4\mu\text{M}$ ) (Figura 2, D), indicando que las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por los cannabinoides en astrocitos están mediadas por receptores CB1 que activan PLC, probablemente a través de una proteína  $G_{q/11}$ , movilizándolo de los reservorios intracelulares.

Para confirmar la expresión funcional de receptores CB1 en astrocitos quisimos obtener asimismo alguna evidencia morfológica de la presencia de éstos receptores en astrocitos. Con este fin, realizamos análisis inmunocitoquímicos usando anticuerpos contra el receptor CB1 y contra un marcador específico de astrocitos, GFAP (proteína fibrilar ácida o también llamada filamentos gliales). Analizando estas preparaciones se observaron marcajes de los receptores CB1 en los procesos astrocitaros que son identificados por la presencia de inmunomarcaje contra GFAP. Estos análisis inmunocitoquímicos fueron realizados en la región del *stratum radiatum* de hipocampo de ratón (Figura 4).



**Figura 4. Localización inmunocitoquímica de los receptores CB1 y astrocitos de hipocampo de la región del *stratum radiatum*.** Las imágenes muestran de izquierda a derecha marcajes para astrocitos por GFAP, receptores CB1 y su colocalización. La región marcada con el rectángulo muestra la sección de un proceso astrocitario que en las imágenes inferiores se presenta con mayor aumento. Las flechas indican el

doble marcaje de los procesos astrocitaros. Las fotos son obtenidas con microscopía confocal de una serie de 4 imágenes consecutivas ( $0.4\ \mu\text{m}$  de grosor). Escalas de calibración,  $20\ \mu\text{m}$  y  $3\ \mu\text{m}$  (superior e inferior, respectivamente).

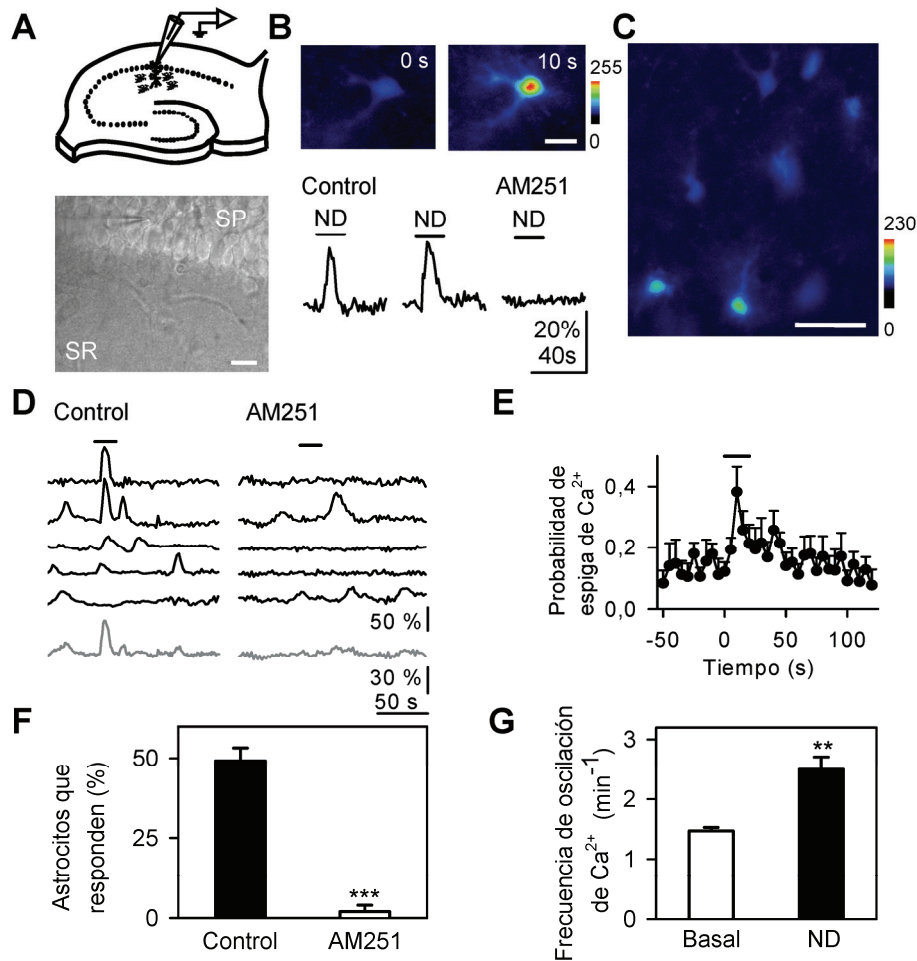
## 2. LOS ASTROCITOS RESPONDEN CON AUMENTOS INTRACELULARES DE $\text{Ca}^{2+}$ A LA DESPOLARIZACIÓN NEURONAL.

Las neuronas piramidales son capaces de liberar al medio extracelular endocannabinoides bajo diversas condiciones experimentales, tales como la despolarización neuronal, ND (del inglés “neuronal depolarization”) o activación postsináptica de los receptores metabotrópicos de glutamato (Alger, 2002; Chevaleyre *et al.*, 2006; Kreitzer y Regehr; 2002). En consecuencia, investigamos si la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos mediada por receptores CB1 se podía generar

endógenamente por endocannabinoides procedentes de las neuronas piramidales de CA1. Para ello registramos electrofisiológicamente neuronas piramidales de CA1 y analizamos los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos adyacentes en el *stratum radiatum* (en una ventana de  $\sim 150 \mu\text{m}$  de ancho perpendicular al *stratum pyramidale*). Para la producción de endocannabinoides se estimuló una neurona piramidal de CA1 mediante pulsos despolarizantes (de  $-60$  a  $0$  mV) durante 2 a 50 s; un protocolo utilizado comúnmente para la liberación de endocannabinoides (Chevalleyre y Castillo, 2003; Kreitzer y Regehr, 2001; Wilson y Nicoll, 2001).

En astrocitos relativamente silentes, la despolarización neuronal (ND) provocó una elevación lenta y transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  (17 de 31 astrocitos de 4 rodajas). Estas respuestas astrocitarias pudieron ser reproducidas por sucesivas despolarizaciones neuronales y fueron bloqueadas en presencia de AM251 ( $2 \mu\text{M}$ ) ( $n = 13$ ; Figura 5, B).

Los astrocitos de hipocampo presentan oscilaciones espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$  que pueden ser moduladas por diversos neurotransmisores (Nett *et al.*, 2002; Perea y Araque, 2005a). Así pues, analizamos los efectos de la despolarización neuronal (ND) en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  de varios astrocitos en el campo visual (entre 6 y 14 astrocitos), cuantificando dos parámetros, a saber, la probabilidad de que ocurra un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  (espiga de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y la frecuencia media de oscilación, medida durante 50 s antes de la ND (basal) y 50 s después del inicio de la ND (Figura 5, D-G). En 11 rodajas, el  $49 \pm 4$  % de los astrocitos aumentaron su frecuencia media de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la ND (Figura 5, E y G), mientras que las amplitudes relativas de las espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  no se vieron afectadas (la amplitud media de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la ND fue  $86.1 \pm 13.1$  % con relación a las respectivas amplitudes de las oscilaciones basales). Además, la probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó de forma transitoria con la ND ( $n = 7$ ; Figura 5, E). Estos efectos se pudieron reproducir por estímulos neuronales sucesivos (Figura 7, A), y fueron independientes de la duración del estímulo (entre 2 y 50 s; Figura 6).



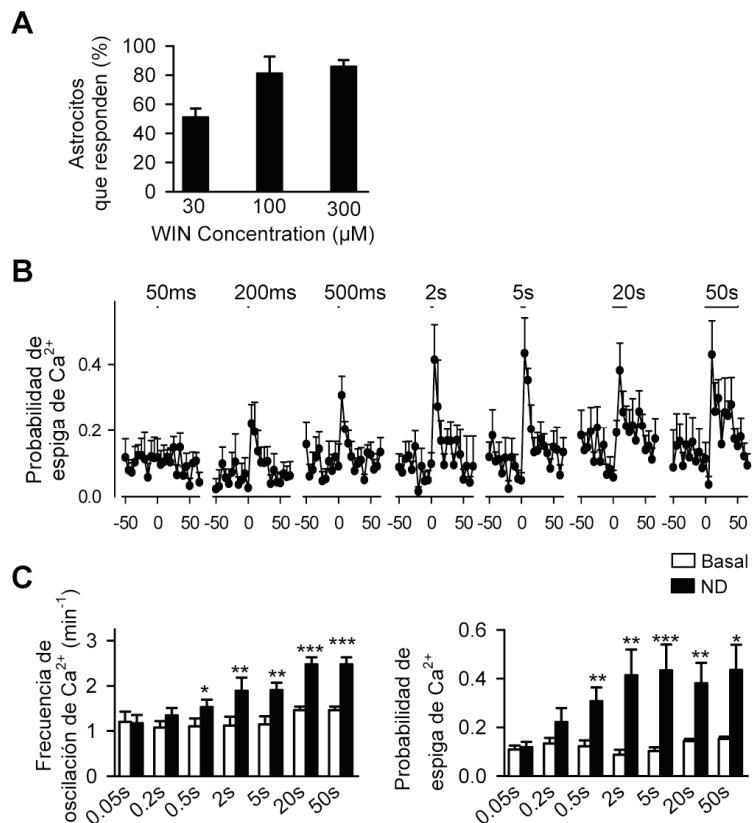
**Figura 5. La liberación de endocannabinoides por las neuronas piramidales de CA1 provoca aumentos de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos adyacentes.** (A) Esquema del diseño experimental e imagen de microscopía de infrarrojo con contraste de fase mostrando la posición de la pipeta de registro en el *stratum pyramidale* (SP) y la posición del *stratum radiatum* (SR), en rodajas de hipocampo. Barra de calibración, 20  $\mu$ m. (B) Arriba, imágenes en pseudocolor que representan las intensidades de fluorescencia de un astrocyto antes y 10 s después de la despolarización neuronal (ND); Abajo, Niveles de Ca<sup>2+</sup> astrocytario generados por la ND (barras horizontales) en control y en presencia de AM251 (2  $\mu$ M). Barra de calibración, 15  $\mu$ m. (C) Imagen en pseudocolor en una región representativa de *stratum radiatum* que muestra 8 astrocytos. Barra calibración, 40  $\mu$ m. (D) Niveles de Ca<sup>2+</sup> de 5 astrocytos de hipocampo y los registros medios correspondientes (gris) en control y en presencia de AM251 (2  $\mu$ M). (E) Probabilidad de espiga de Ca<sup>2+</sup> en astrocytos *versus* tiempo (n = 7 rodajas). El tiempo 0 corresponde al inicio de la ND. (F) Número relativo de astrocytos que aumentaron su oscilación de Ca<sup>2+</sup> en la ND en control y en presencia de AM251 (2  $\mu$ M) (n = 105 astrocytos de 9 rodajas). (G) Frecuencia media de oscilación de Ca<sup>2+</sup> antes (basal) y después del estímulo (ND). Las diferencias significativas fueron establecidas con p < 0.01 (\*\*) y p < 0.001 (\*\*\*)

En resumen, estos resultados indican que la despolarización neuronal modula la señal de Ca<sup>2+</sup> de astrocytos adyacentes, provocando elevaciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> en astrocytos relativamente silentes, aumentando la frecuencia de la oscilación de astrocytos oscilantes y aumentando la probabilidad de aparición de espigas de Ca<sup>2+</sup>.



Cabe destacar que, mientras que la mayoría de los astrocitos muestran aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  frente a estímulos locales exógenos con cannabinoides ( $85.8 \pm 4.5$  % de 42 astrocitos de 6 rodajas, véase Figura 2 y Figura 6, A), la modulación astrocitaria de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  por ND fue observada en un subconjunto de astrocitos ( $49.2 \pm 4.0$  % de 105 astrocitos;  $n = 11$  rodajas). Sin embargo, la mayoría de los astrocitos que respondieron a la primera ND también respondieron a la segunda ND, mientras que los astrocitos que no respondieron al primer estímulo tampoco respondieron a la segunda ND (Figura 7, B). Este resultado indica que las respuestas astrocitarias no resultaron de un vertido incontrolado de endocannabinoides que provocan la estimulación aleatoria de astrocitos, sino que la consistencia en la respuesta sugiere la existencia de una vía de señalización intercelular entre neuronas y astrocitos mediada por endocannabinoides.

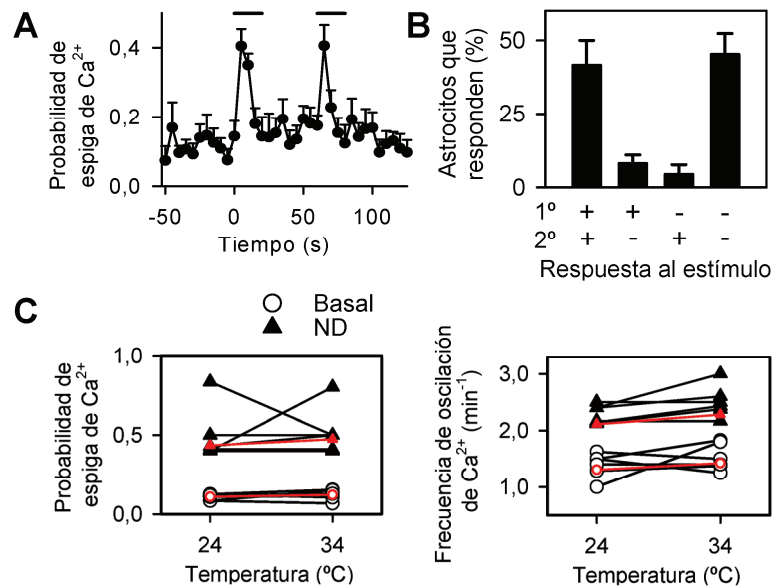
**Figura 6. Señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria producida por distintas concentraciones de WIN y diversos tiempos de despolarización neuronal.** (A) Proporción relativa de astrocitos que responden a distintas concentraciones de WIN (B) Probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos generada por distintos tiempos de despolarización neuronal (barras horizontales). (C) Frecuencia de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  y probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  antes (basal; barras blancas) y después de la despolarización neuronal (ND; barras negras) a distintos tiempos ( $n \geq 54$  astrocitos de  $\geq 6$  rodajas para cada barra). Las diferencias significativas fueron establecidas con \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) y \*\*\* ( $p < 0.001$ ).



Debido a que la señalización por endocannabinoides podría ser afectada por la temperatura (Kreitzer *et al.*, 2002), estudiamos si las respuestas astrocitarias debidas a los endocannabinoides eran sensibles a la temperatura. Analizamos el aumento de la probabilidad de espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  y la frecuencia de la oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por la ND a distintas temperaturas experimentales. Estas dos variables no fueron

estadísticamente diferentes a 24°C y 34°C (Figura 7, C). La proporción de astrocitos que responden a ambas temperaturas también fueron analizadas y no se observaron diferencias significativas ( $55 \pm 3\%$  a 24 °C y  $57 \pm 6\%$  a 34 °C) ( $n = 48$  astrocitos de 6 rodajas), indicando que la señalización neurona-astrocito mediada por endocannabinoides ocurre no sólo a relativamente baja temperatura experimental sino también a temperaturas más fisiológicas.

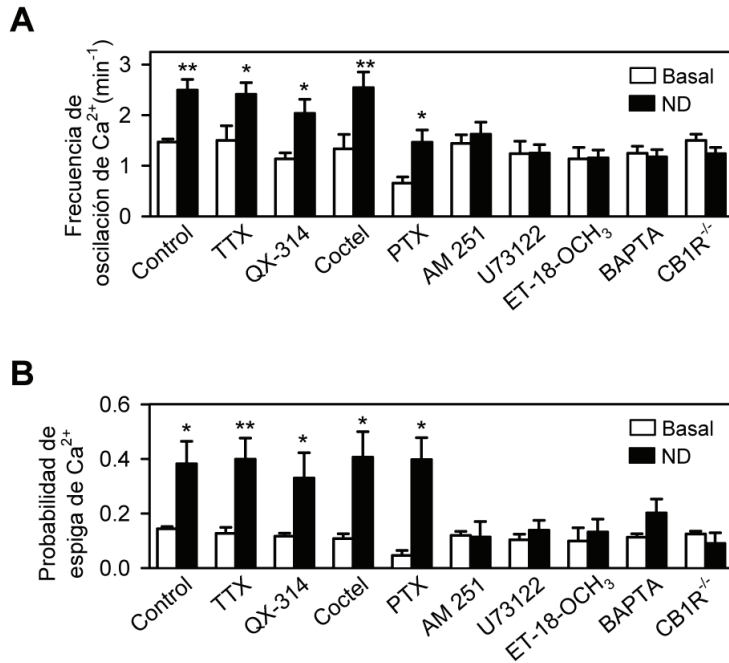
**Figura 7. Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios generados por la despolarización neuronal son mediados por la activación de receptores CB1.** (A) Probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por sucesivas ND (barras horizontales) ( $n = 37$  astrocitos de 4 rodajas). (B) Proporción de astrocitos que respondieron a dos estímulos sucesivos. Nótese que la proporción de astrocitos que responden permanece constante al igual que el número de astrocitos que no responden ( $n = 123$  astrocitos de 10 rodajas). (C) Probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria y frecuencia de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  antes (basal; círculos) y después de la despolarización neuronal (ND; triángulos) a 24 y 34 °C (48 astrocitos de 6 rodajas). Los símbolos rojos indican valores medios.



### 3. ENDOCANNABINOIDES PROCEDENTES DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 PROVOCAN ELEVACIONES DE $\text{Ca}^{2+}$ EN ASTROCITOS.

Para investigar los mecanismos celulares implicados en las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias provocadas por ND comparamos la probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  y la frecuencia media de aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  antes y después de distintos tratamientos farmacológicos (Figura 8, A y B). El aumento de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria generado por la ND no se vio alterada en presencia de TTX ni después de dializar la neurona con QX-314, que bloquea intracelularmente las corrientes de  $\text{Na}^+$  voltaje-dependientes, sugiriendo que los efectos observados tras la ND no requieren de la generación de potenciales de acción. Consistente con los resultados obtenidos tras aplicación local de

agonistas del receptor CB1, los aumentos de probabilidad de aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  y de frecuencia de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  generado por la ND no se afectaron en presencia de un cóctel de antagonistas de distintos receptores de neurotransmisores, pero fueron suprimidos por el antagonista de los receptores CB1, AM251 (2 $\mu\text{M}$ ).



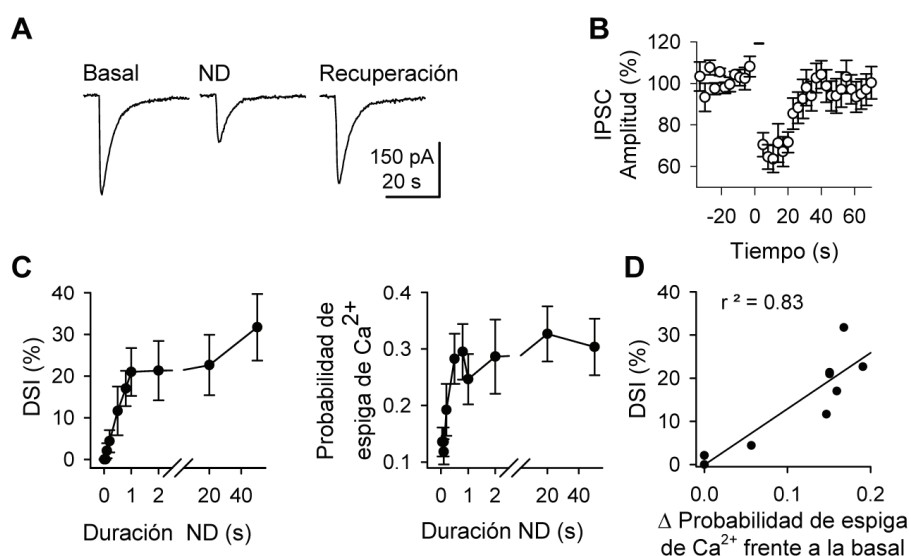
**Figura 8. Caracterización farmacológica de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria mediada por endocannabinoides.** (A y B) Frecuencia media de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos y probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  antes (basal; barras blancas) y después de la despolarización neuronal (ND; barras negras) en control y en distintas condiciones experimentales ( $n \geq 5$  rodajas para cada barra). Las diferencias significativas fueron establecidas con  $p < 0.05$  (\*) y  $p < 0.01$  (\*\*).

Del mismo modo, la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria por la ND no se observó en rodajas de ratones transgénicos del receptor  $\text{CB1}^{-/-}$  ( $n = 34$ ,  $n = 5$  rodajas; Figura 8, A y B), indicando que el aumento de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos provocadas por la ND fue mediado selectivamente por la activación de receptores CB1.

Para investigar la vía de señalización intracelular implicada, incubamos las rodajas con 7.5  $\mu\text{g/ml}$  PTX de la misma forma que cuando se aplicaron agonistas exógenamente. Después de determinar la eficacia del tratamiento con PTX, confirmando la ausencia de las elevaciones  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias en respuesta a la aplicación ionofórica de GABA (31 de 36 astrocitos de 5 rodajas tratadas con PTX no respondieron a GABA), analizamos los efectos de la ND en las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias. Aunque se observó una leve disminución de la frecuencia media de oscilación en rodajas tratadas con PTX, probablemente debido a los efectos deletéreos de la toxina en la viabilidad celular, la frecuencia de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  y la probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron aumentadas después de la despolarización

neuronal (Figura 8, A y B). En cambio, el antagonista de PLC, U73122 (4 $\mu$ M) suprimió la respuesta astrocitaria a la ND.

Por tanto, estos resultados indican que las elevaciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> astrocitarias generadas por la ND son mediadas por la activación de receptores CB1 que estimulan PLC.

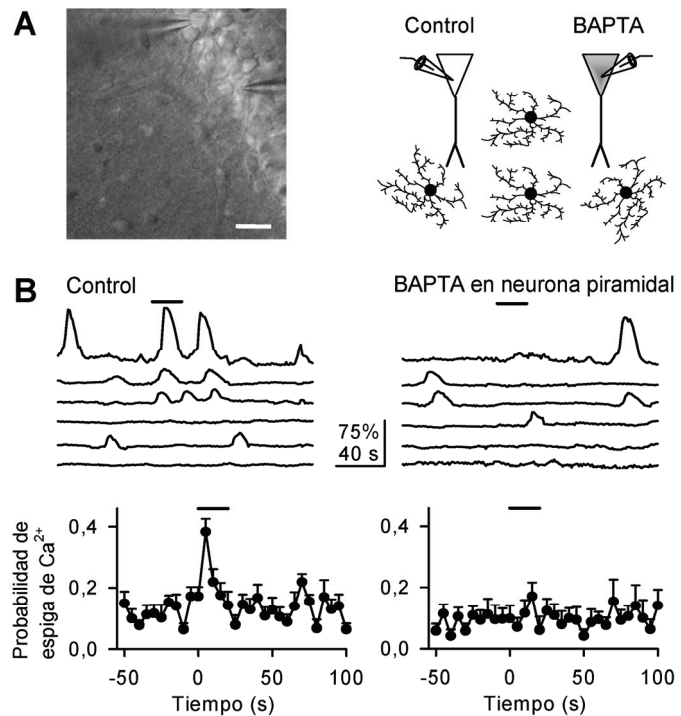


A continuación, investigamos si el aumento de la señal de Ca<sup>2+</sup> astrocitaria inducida por la ND estaba mediada por los endocannabinoides procedentes de las neuronas piramidales. Como ya se ha mencionado, la ND estimula la liberación de endocannabinoides, lo cual reduce transitoriamente la transmisión inhibitoria mediada por la activación de los receptores CB1 presinápticos. Este mecanismo se conoce como supresión de la inhibición inducida por despolarización, DSI (del inglés: depolarization-induced supresion of inhibition) (ver revisiones Alger, 2002; Freund et al., 2003; Chevaleyre et al., 2006, Heifets y Castillo, 2009). Usando este parámetro, DSI, como ensayo endógeno de liberación de endocannabinoides, comparamos simultáneamente

los efectos de la ND en neuronas y astrocitos. Para ello estudiamos la proporción de DSI en neuronas piramidales de CA1 registrando corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) y, simultáneamente, registramos la probabilidad de aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos mediante registros de niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios (Figura 9, A y B).

El aumento de la duración de la ND indujo un aumento gradual de la proporción de DSI y de la probabilidad de aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario (Figura 9, C y D). Ambos parámetros establecieron un alto grado de correlación ( $r^2 = 0.83$ ), sugiriendo que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos resulta de la liberación de endocannabinoides por parte de neuronas piramidales e indica que los endocannabinoides eran igualmente eficaces al inducir efectos tanto en neuronas como en astrocitos.

**Figura 10. Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios son mediados por endocannabinoides liberados por las neuronas piramidales de CA1.** (A) Imagen de microscopía de infrarrojo con contraste de fase y esquema del diseño experimental mostrando el registro simultáneo de dos neuronas piramidales. En una pipeta de registro se incluyó BAPTA (20 mM) para prevenir aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en una neurona piramidal, mientras que la otra neurona fue llenada con solución intracelular estándar (control). Barra de calibración, 25  $\mu\text{m}$ . (B) Trazos representativos de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de 6 astrocitos en un campo representativo (de arriba a abajo) antes y después de la ND (barras horizontales) y probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  de neuronas control y llenadas con BAPTA (de izquierda a derecha, respectivamente) ( $n = 9$  rodajas).



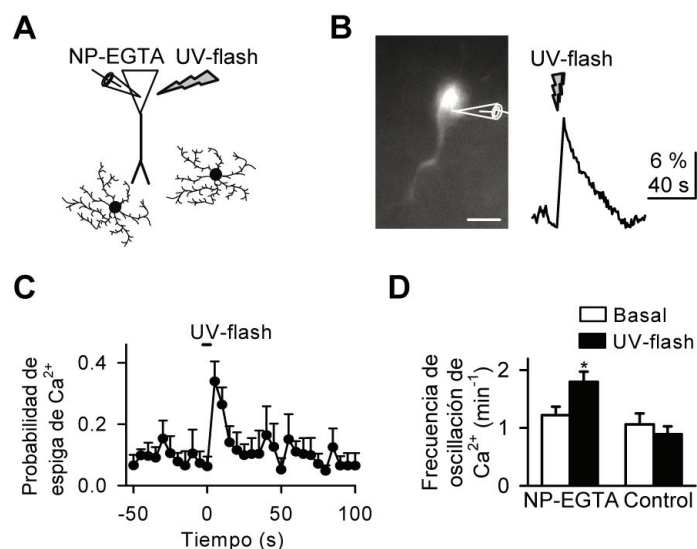
Debido que la liberación de endocannabinoides por despolarización neuronal requiere el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona (Chevalleyre y Castillo; 2003; Kreitzer y Regehr, 2001; Wilson y Nicoll, 2001), realizamos pares de registros a partir de dos neuronas piramidales adyacentes y manipulamos selectivamente los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en una de las neuronas registradas. Para ello, en una pipeta de registro se incluyó BAPTA (20 mM), un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  para prevenir aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto, bloquear la liberación de endocannabinoides. La otra neurona fue

llenada con una solución intracelular estándar, manteniendo así esta neurona como control (Figura 10, A y B).

Así cuando despolarizamos la neurona control aumentó la probabilidad y la frecuencia de aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos, mientras que cuando despolarizamos la neurona llenada con BAPTA no afectó la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria (Figura 10, B). Por otro lado, para confirmar que los endocannabinoides procedían de neuronal piramidales hicimos otro conjunto de experimentos donde registramos una neurona piramidal la cual fue cargada con NP-EGTA (5mM), donante de  $\text{Ca}^{2+}$  fotoactivable por luz ultravioleta (UV), y además se incluyó Fluo-4 (50-100 $\mu\text{M}$ ) por medio de la pipeta de registro para monitorizar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con esta jaula de  $\text{Ca}^{2+}$  pudimos aumentar selectivamente los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en una sola neurona. Estos experimentos fueron realizados en presencia de TTX para prevenir la liberación de neurotransmisor por potenciales de acción. La estimulación con UV elevó el  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona que fue llenada con NP-EGTA y aumentó la probabilidad de aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos adyacentes (Figura 11, A-D). En ausencia de neuronas cargadas con NP-EGTA, los flashes de UV no modificaron los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos (Figura 11, D), indicando que los efectos no eran debidos a la fotoestimulación directa de astrocitos.

**Figura 11. El incremento selectivo de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronal genera liberación de endocannabinoides.**

(A) Dibujo esquemático de las condiciones experimentales. (B) Imagen que muestra intensidades de fluorescencia de una neurona piramidal llenada con NP-EGTA y fluo-4. Barra de calibración, 15  $\mu\text{m}$ . Derecha, niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronal generados tras el estímulo de luz ultravioleta (UV) en el soma. (C) Probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos *versus* tiempo ( $n = 6$  rodajas). Tiempo cero corresponde al comienzo del estímulo, flash de UV (barra horizontal). (D) Frecuencia de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  antes (basal) y después del estímulo de flash UV en control y en neuronas llenadas con NP-EGTA. Las diferencias significativas fueron establecidas como \* ( $p < 0.05$ ).



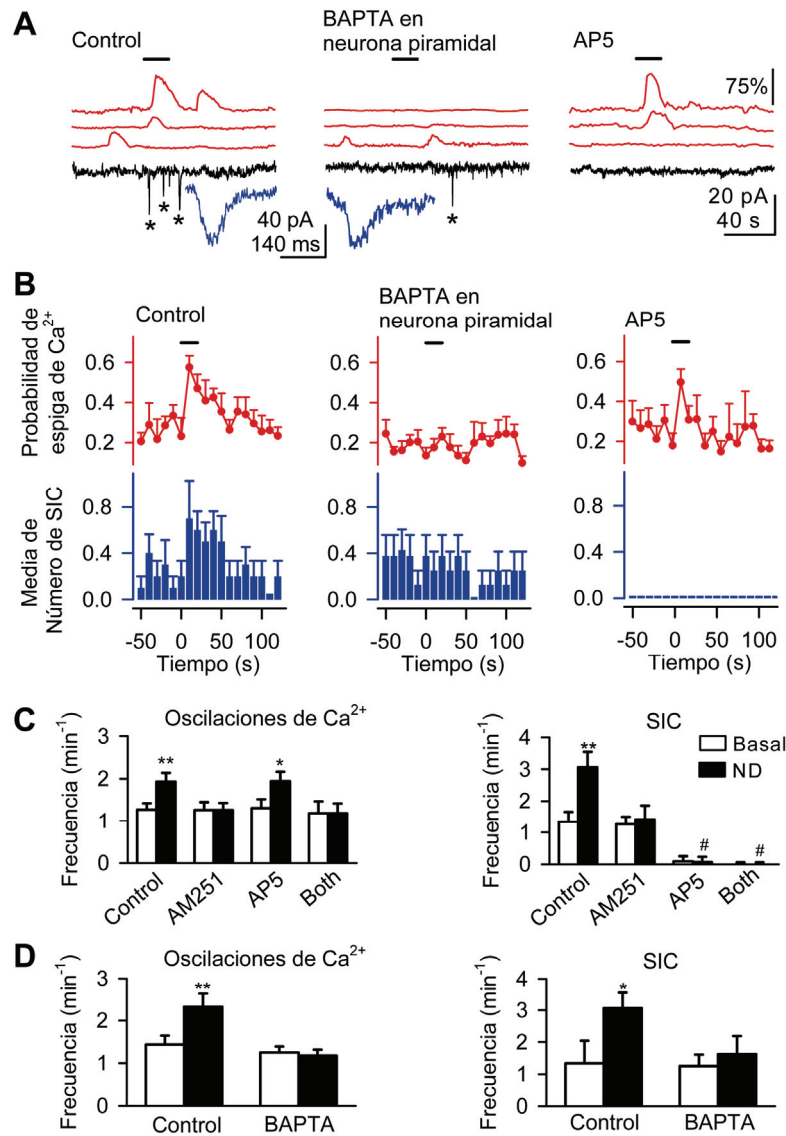
Por tanto, estos resultados indican que las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas piramidales son necesarias y suficientes para inducir aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos y, además, apoya la idea de que los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios son debidos a la activación de los receptores de CB1 por los endocannabinoides liberados por parte de las neuronas  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la ND.

#### **4. CONSECUENCIAS DE LAS ELEVACIONES DE $\text{Ca}^{2+}$ ASTRICITARIAS EN LA EXCITABILIDAD NEURONAL.**

##### ***4.1. Las elevaciones de $\text{Ca}^{2+}$ mediadas por receptores CB1 en astrocitos generan corrientes lentas de entrada debidas a glutamato en neuronas piramidales.***

A continuación, indagamos en las posibles consecuencias fisiológicas de las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias mediadas por endocannabinoides en la excitabilidad neuronal. Recientes estudios indican que estímulos experimentales exógenos, tales como el uso extracelular de ATP, agonistas de mGluR, despolarización astrocitaria o fotoestimulación de compuestos de  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulados, que elevan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos, inducen corrientes lentas de entrada, (SICs), mediadas por glutamato en las neuronas adyacentes (Angulo *et al.*, 2004; Araque *et al.*, 1998a; Fellin *et al.*, 2004; Perea y Araque, 2005a). Por ello nos preguntamos si los endocannabinoides procedentes de las neuronas piramidales pueden servir como señales endógenas que, elevando el  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos, estimulen la liberación de glutamato. Para ello, registramos simultáneamente dos neuronas piramidales cercanas, así como los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de astrocitos adyacentes en presencia de un cóctel que contenía antagonistas de los receptores de los neurotransmisores (véase página 34 y 35) y TTX (excepto AP5), y en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular para optimizar la activación de receptores de NMDA. Debido a que la observación de SICs durante la despolarización neuronal no era posible en la neurona que se estimulaba (ya que estaba a 0 mV), las corrientes se analizaron en la neurona no despolarizada. En estas condiciones, las neuronas piramidales tuvieron una frecuencia basal de SICs de  $1.3 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$  (amplitud media de SICs:  $34 \pm 4 \text{ pA}$ ;  $n = 36$ ; cf. Refs. Angulo *et al.*, 2004; Fellin *et al.*, 2004; Perea y Araque, 2005a).



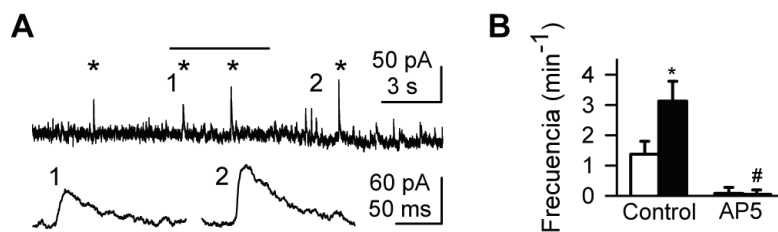


**Figura 12. Los aumentos de  $Ca^{2+}$  en astrocitos inducidos por endocannabinoides generan SICs mediadas por los receptores de NMDA en neuronas piramidales de CA1.** (A) Registro simultáneo de neuronas piramidales de CA1 (trazos negros y azules) y niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular de 3 astrocitos (trazos rojos). Los registros fueron obtenidos durante la despolarización de la neurona en control, de la neurona llenada con BAPTA y de la neurona control en presencia de AP5 (50  $\mu$ M). Los asteriscos indican las corrientes lentas de entrada (SICs) que han sido ampliadas (azul). (B) Probabilidad de espiga de  $Ca^{2+}$  astrocitaria (rojo) y número medio de SICs (azul) provocados por la despolarización neuronal representando el curso temporal de ambas respuestas en las distintas condiciones experimentales (18 neuronas apareadas de 9 rodajas). (C) Frecuencia de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  astrocitarias y de SICs durante 50 s antes (basal; barras blancas) y después de la despolarización neuronal (ND; barras negras) de las neuronas control, en presencia de AM251 (2  $\mu$ M), de AP5 (50  $\mu$ M), o de ambos antagonistas ( $n \geq 5$  rodajas para cada barra). (D) Frecuencia de oscilación de  $Ca^{2+}$  astrocitaria y de SICs 50 s antes de la ND (basal; barras blancas) y después de la ND (barras negras) con las neuronas en control y con las neuronas llenadas con BAPTA ( $n = 8$  rodajas). (E) Dibujo esquemático que representa la señalización neurona-astrocito mediada por endocannabinoides y la señalización astrocito-neurona mediada por glutamato. Las diferencias significativas fueron establecidas \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), y # ( $p < 0.001$ ).



La despolarización de una neurona piramidal (0 mV durante 20 s) aumentó la frecuencia de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos y simultáneamente aumentó la frecuencia de SICs en la neurona adyacente (Figura 12, A-C). Estas SICs se bloquearon totalmente por la presencia de 50  $\mu\text{M}$  de AP5, confirmando que se deben la activación de receptores de NMDA, mientras que el aumento de la frecuencia de la oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  no se alteró (Figura 12, A-C). En cambio, el aumento de la frecuencia de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por ND y el número de SICs fueron bloqueados por la presencia de 2  $\mu\text{M}$  de AM251, no modificándose además su frecuencia basal. Lo siguiente que nos preguntamos fue si estas SICs también ocurrían en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular. Para tal fin no alteramos el  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular y las SICs fueron detectadas como corrientes lentas de salida a potenciales de membrana despolarizados ( $>30$  mV). Así la frecuencia de SICs aumentó después de la ND de la misma manera que en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (de  $1.4 \pm 0.4$  a  $3.1 \pm 0.6$ ;  $n = 4$ ; Figura 13) e igualmente fueron sensibles a AP5, indicando que este fenómeno también ocurre bajo concentraciones extracelulares normales de iones divalentes.

Por lo tanto, presumimos que tales efectos eran debidos a la liberación por parte de la neurona piramidal de endocannabinoides por despolarización neuronal.



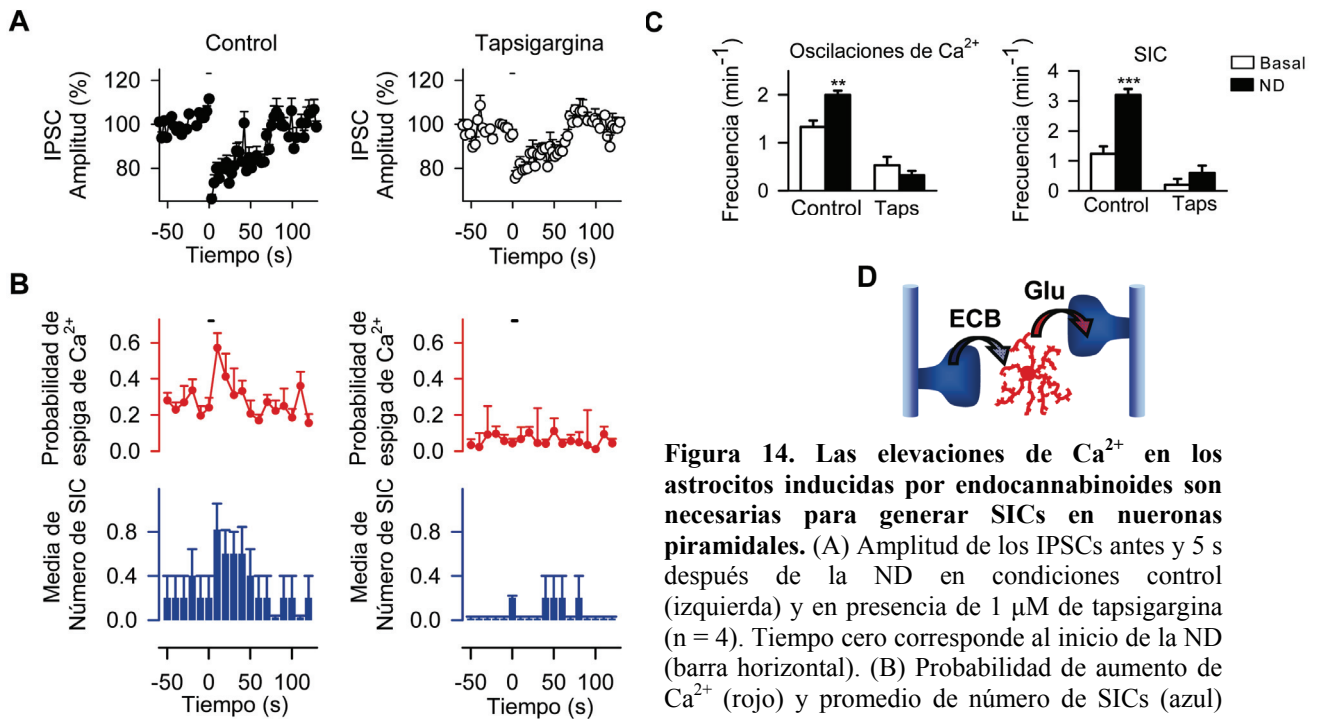
**Figura 13. Los endocannabinoides generan aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos y corrientes lentas en las neuronas piramidales adyacentes.** (A) Corrientes de una neurona piramidal registrada a potencial de

membrana de +30 mV en presencia de TTX y de  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular. Las SICs fueron detectadas como corrientes de salida como se muestran en las dos SICs ampliadas en la parte inferior. (B) Frecuencia de SICs 50 s antes (basal; barras blancas) y después de la despolarización neuronal (ND; barras negras) en solución control y en presencia de AP5 ( $n = 4$  rodajas para cada barra). Las diferencias significativas fueron establecidas como \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), y # ( $p < 0.001$ ).

Para probar esta hipótesis, incluimos BAPTA en una de las pipetas de registro para prevenir el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  y, por tanto, la liberación de endocannabinoides a partir de una neurona, mientras que la otra neurona permanecía como control. La despolarización de la neurona control aumentó la frecuencia de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias y SICs en la neurona adyacente. En cambio, la despolarización de la neurona llenada con BAPTA no modificó significativamente la frecuencia de ambos

parámetros (Figura 12, D). Para probar si los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios mediados por endocannabinoides eran necesarios para aumentar los niveles de glutamato y en consecuencia la frecuencia de SICs, analizamos los efectos que se producían al vaciar los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  de los astrocitos. Para ello incubamos durante 30 minutos las rodajas con 1  $\mu\text{M}$  tapsigargina. En primer lugar confirmamos en estas condiciones experimentales la neurona piramidal mantenía la capacidad, por ND, de liberar endocannabinoides. Mediante registros de IPSCs supervisamos la cantidad de DSI, indicativo de la existencia de endocannabinoides. El fenómeno de DSI se podía observar en presencia de tapsigargina (aunque con una amplitud relativamente más pequeña que en control; cf. Isokawa y Alger, 2006), indicando que la liberación de endocannabinoide no es bloqueada por la presencia de tapsigargina (Figura 14, A). En experimentos paralelos, registramos simultáneamente las corrientes en una neurona piramidal y la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  de los astrocitos adyacentes. La ND produjo un aumento de la probabilidad de aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario y un aumento de la frecuencia de SICs en condiciones control mientras que después de la incubación con tapsigargina ambos aumentos fueron suprimidos (Figura 14 B y C). En conjunto, estos resultados indican que las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por receptores CB1 en astrocitos son requeridas para el aumento de la frecuencia de SICs inducido por la despolarización neuronal.

En conclusión, estos resultados indican que la despolarización de neuronas estimulan la liberación de endocannabinoides, que activan receptores CB1 en astrocitos, aumentando así su  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e inducen la liberación de glutamato, que a su vez sirve como señal de retorno activando receptores de NMDA en neuronas adyacentes.



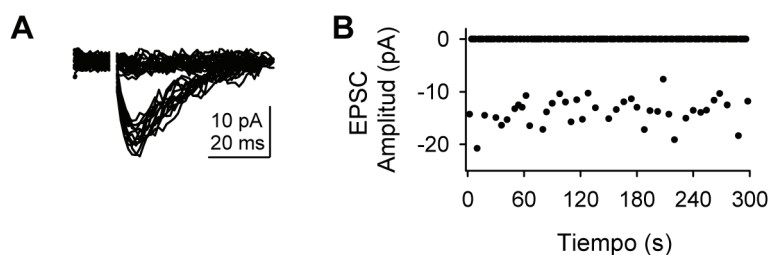
**Figura 14.** Las elevaciones de  $Ca^{2+}$  en los astrocitos inducidas por endocannabinoides son necesarias para generar SICs en neuronas piramidales. (A) Amplitud de los IPSCs antes y 5 s después de la ND en condiciones control (izquierda) y en presencia de 1  $\mu M$  de tapsigargina ( $n = 4$ ). Tiempo cero corresponde al inicio de la ND (barra horizontal). (B) Probabilidad de aumento de  $Ca^{2+}$  (rojo) y promedio de número de SICs (azul) antes y después de la ND (barras horizontales) en condiciones control (izquierda) y en presencia de 1  $\mu M$  tapsigargina (10 neuronas apareadas  $n = 5$  rodajas). (C) Frecuencia de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  astrocitarias y de SICs 50 s antes (basal; barras blancas) y después de la ND (barras negras) en control y en presencia de tapsigargina ( $n = 5$  rodajas). (D) Diagrama esquemático que representa la señalización neurona-astrocito mediada por endocannabinoides y la señalización subsecuente astrocito-neurona mediada por glutamato.

## 5. CONSECUENCIAS DE LAS ELEVACIONES DE $Ca^{2+}$ ASTROCITARIAS SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EXCITADORA.

### 5.1. Las elevaciones de $Ca^{2+}$ mediadas por receptores CB1 en astrocitos provocan una potenciación transitoria de la transmisión sináptica excitadora.

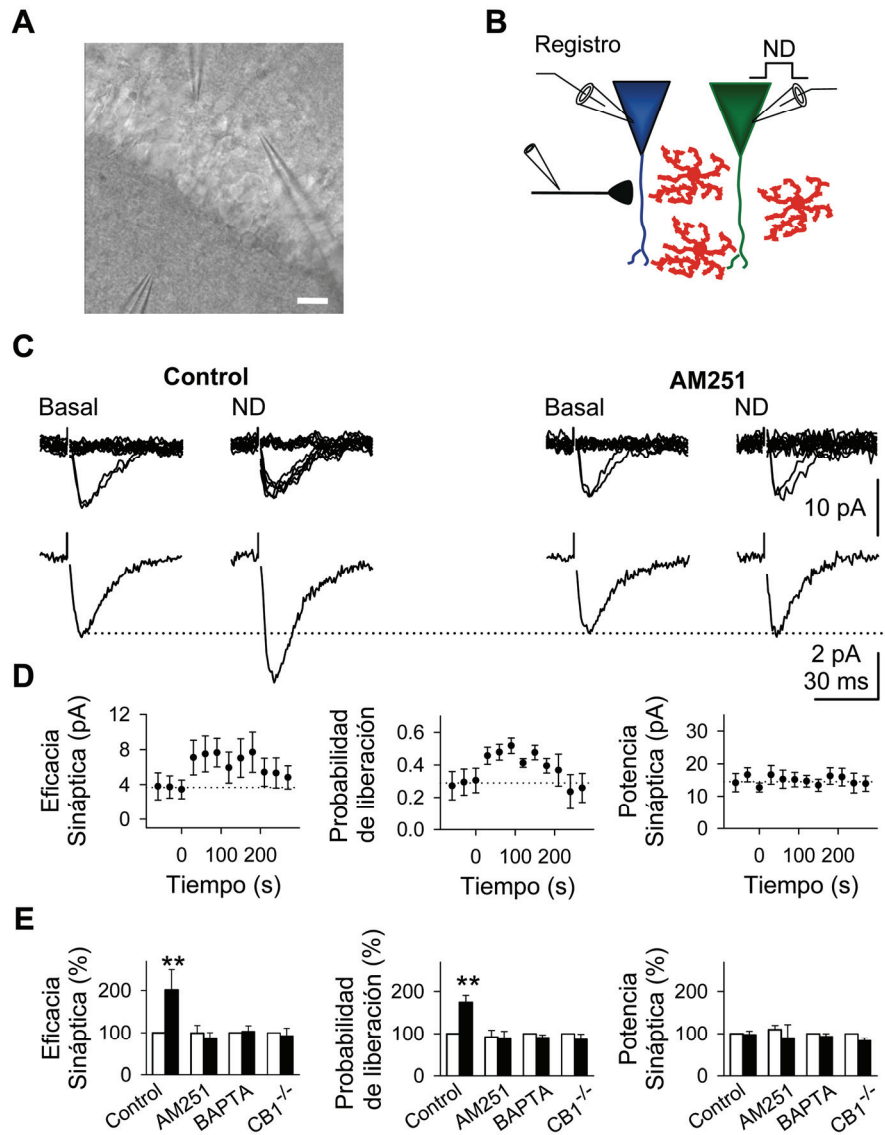
La comunicación neurona-astrocito es una comunicación recíproca donde la actividad neuronal también puede verse influenciada por la actividad astrocitaria. La señal de  $Ca^{2+}$  tiene un papel crucial en la señalización astrocito-neurona, siendo decisiva en los procesos que se acompañan de liberación de sustancias neuroactivas, denominadas “gliotransmisores”, a través de mecanismos  $Ca^{2+}$ -dependientes, como glutamato, ATP y D-Serina (Araque et al., 1998a, b; 2000; Bezzi et al., 1998, 2004; Innocenti et al., 2000; Newman, 2003; Pasti et al., 2001; Zhang et al., 2004; Møthet et al., 2005). Decidimos por tanto, investigar las consecuencias de esta señal de  $Ca^{2+}$  astrocitaria en la transmisión sináptica generada en neuronas piramidales de CA1.

El estudio de esta posible modulación de la transmisión sináptica se enfrenta a problemas conceptuales y metodológicos. El primero se basa en la variabilidad de efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario sobre la transmisión sináptica, habiéndose descrito que los astrocitos provocan el aumento de la transmisión excitadora, de la transmisión inhibitoria y participan en la inhibición de la transmisión excitadora (Araque et al., 1998a, b; Kang et al., 1998; Zhang et al., 2003; Fiacco y McCarthy, 2004; Liu et al., 2004; Pascual et al., 2005, Perea y Araque, 2007). Los obstáculos metodológicos consisten en el hecho de que la estimulación sináptica convencional provoca la activación de un elevado número de axones y sinapsis, lo cual implica la existencia de una alta variabilidad intrínseca en los parámetros que definen la transmisión sináptica. Por tanto, decidimos utilizar como aproximación experimental la “estimulación mínima” de una o muy pocas sinapsis. Para ello, se realizaron pares de registros de neuronas piramidales de CA1 y simultáneamente se monitorizaron los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de los astrocitos del *stratum radiatum* y se estimularon las colaterales de Schaffer utilizando el método de estimulación mínima. La estimulación de una o pocas sinapsis de las colaterales de Schaffer (0.33 Hz) genera en la neurona postsináptica respuestas sinápticas unitarias, caracterizadas por presentar fallos, lo que se observa como ausencia de respuesta, y éxitos de la transmisión sináptica, EPSCs, de amplitud pequeña y estable (Figuras 15 y 16, A-C). La probabilidad de éxito de respuestas es  $\sim 0.3$ , lo cual está de acuerdo con la probabilidad de éxito media para las sinapsis CA3-CA1 (Dobrunz y Stevens, 1997).



**Figura 15. Respuestas sinápticas obtenidas por estimulación mínima de las colaterales de Schaffer en neuronal piramidales de CA1.** (A) Respuestas sinápticas representativas (EPSCs) obtenidas por el método de estimulación

mínima de las colaterales de Schaffer (0.33 Hz). Nótese la existencia de fallos en la transmisión sináptica y la amplitud pequeña y regular de los aciertos. (B) Diagrama de puntos de las respuestas obtenidas en una neurona piramidal por estimulación mínima de las colaterales de Schaffer durante 5 min de registro. Los puntos situados en la línea de 0 representan fallos en la transmisión sináptica.

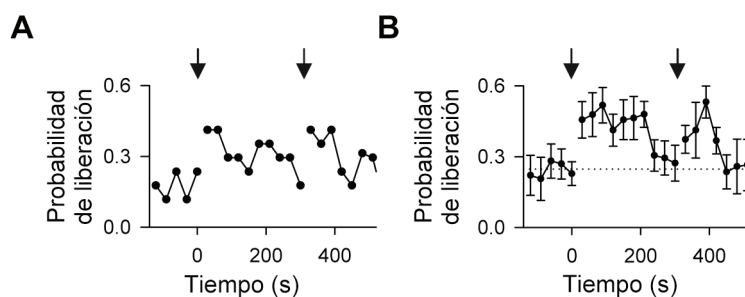


**Figura 16. Los endocannabinoides potencian la liberación de neurotransmisor en sinapsis únicas CA3-CA1.** (A) Imagen de microscopía de infrarrojo con contraste de fase mostrando registro de pares de neuronas de CA1 y el electrodo de estimulación. Barra de calibración, 20  $\mu\text{m}$ . (B) Esquema que representa registros de pares de neuronas y el electrodo de estimulación. ND, despolarización neuronal. (C) Respuestas provocadas por estimulación mínima que muestran las amplitudes regulares de los EPSCs y fallos en la transmisión sináptica (15 estímulos consecutivos) (parte superior) y el promedio de EPSCs ( $n = 50$  estímulos, incluyendo fallos y aciertos; parte inferior) antes (basal) y después de la ND en control y en presencia de 2  $\mu\text{M}$  de AM251. (D) Eficacia sináptica (es decir, amplitud media de las respuestas incluyendo éxitos y fallos en la neurotransmisión), probabilidad de liberación de neurotransmisor (Pr) y potencia sináptica (es decir, amplitud media de los aciertos) *versus* tiempo (Intervalo, 33 s;  $n = 7$ ). Tiempo cero corresponde al principio de la ND. (E) Cambios relativos de parámetros sinápticos antes (basal) y después de la ND en control ( $n = 7$ ), AM251 ( $n = 7$ ), neurona cargada con BAPTA ( $n = 11$ ) y en ratones transgénicos que carecen del receptor CB1 (CB1<sup>-/-</sup>) ( $n = 13$ ). \*\*  $P < 0.01$ . Las barras de error indican SEM.

Se analizaron los siguientes parámetros: probabilidad de éxito de las corrientes postsinápticas excitadoras, denominadas EPSCs ( $0.31 \pm 0.02$ ; rango, 0.07 - 0.83;  $n = 53$ ), amplitud media de los EPSCs (denominada “potencia sináptica”;  $11.9 \pm 0.6\text{pA}$ ;

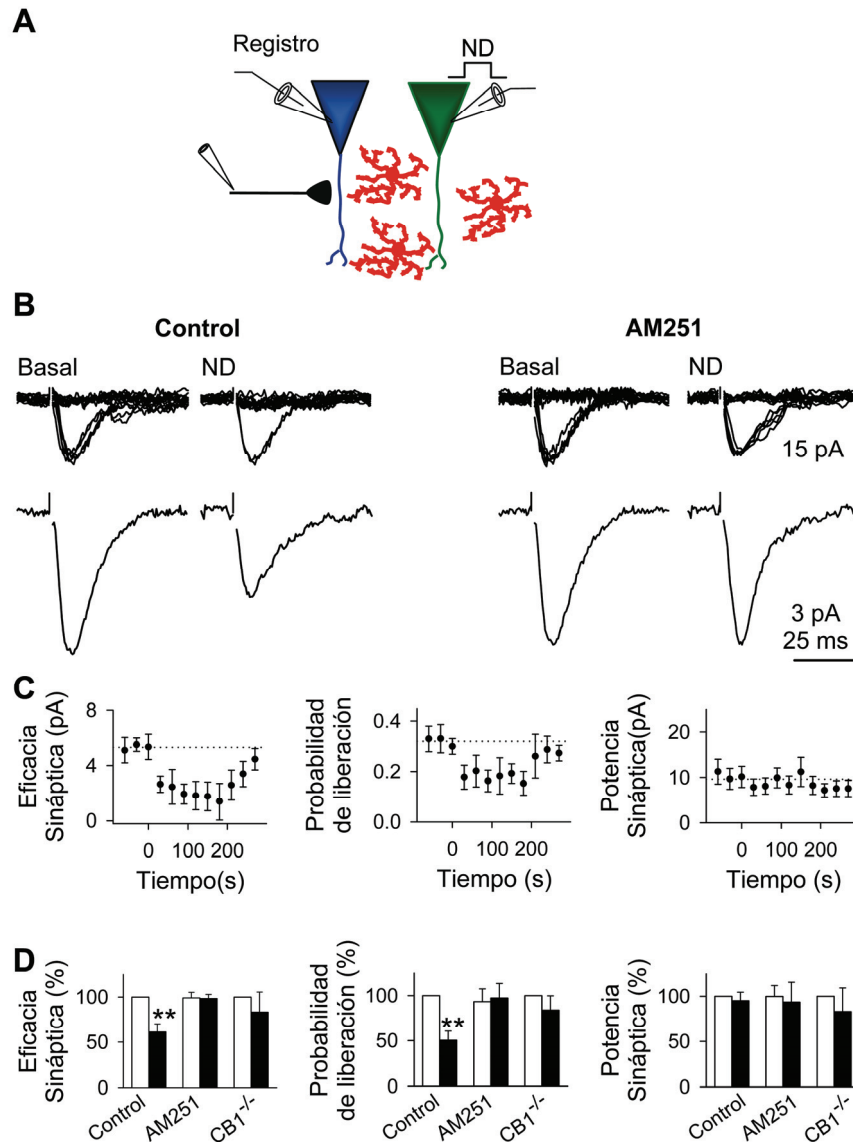
rango, 4.1 - 25.5 pA;  $n = 53$ ) y amplitud media de los EPSCs incluyendo fallos (denominada “eficacia sináptica”;  $7.7 \pm 0.9$  pA; rango, 0.9 – 18.4 pA;  $n = 53$ ), en condiciones control así como después de la ND (Figura 16, D y E).

En estas condiciones despolarizamos una neurona piramidal a 0 mV durante 5 s, mientras que se supervisaba la transmisión sináptica en una única sinapsis en la neurona adyacente. En una muestra representativa de 51 neuronas analizadas, después de la ND la transmisión sináptica fue aumentada en un 27% de los casos (14 de 51 sinapsis analizadas) que pasó de un valor medio de  $0.36 \pm 0.01$  a  $0.42 \pm 0.01$ ; ( $n = 14$ ;  $P < 0.01$ ). No se observaron cambios significativos en la potencia sináptica, de  $11.7 \pm 2.5$  pA a  $10.5 \pm 3.8$ ; ( $n = 14$ ;  $P = 0.85$ ). Lo cual resulta en un aumento transitorio de la eficacia sináptica, de  $4.7 \pm 0.3$  pA a  $8.4 \pm 0.2$  pA; ( $n = 14$ ;  $P < 0.01$ ) (Figura 16). Estos efectos fueron reproducidos por sucesivas ND (Figura 17).



**Figura 17. La potenciación sináptica transitoria (e-SP) producida por la ND fue reproducida por sucesivos estímulos.** (A y B) Probabilidad de liberación de neurotransmisor antes y después de la ND en una sinapsis representativa y el promedio de 16 (izquierda y derecha, respectivamente). Las flechas indican el principio de la ND.

En otras 14 de 51 de las sinapsis analizadas (27%), la ND provocó una disminución transitoria de la transmisión sináptica, cambiando la probabilidad de liberación de neurotransmisor de  $0.30 \pm 0.06$  a  $0.18 \pm 0.04$ ; ( $n = 14$ ;  $P < 0.05$ ) sin cambios significativos en la potencia sináptica,  $10.5 \pm 2.2$  pA a  $10.2 \pm 1.5$  pA; ( $n = 14$ ;  $P = 0.33$ ), que dio lugar a una disminución transitoria de la eficacia sináptica,  $5.2 \pm 0.7$  pA a  $2.1 \pm 0.8$  pA; ( $n = 14$ ;  $P < 0.01$ ) (Figura 18). Esta reducción transitoria de la transmisión sináptica generada por la ND es similar a la despolarización induce supresión de la excitación, DSE (del inglés depolarization-induced supresión of excitation) y ambas son bloqueadas por el antagonista de los receptores CB1, AM251



**Figura 18. Los endocannabinoides deprimen la liberación de neurotransmisor en sinapsis CA3-CA1.** (A) Esquema que representa registros de pares de neuronas y el electrodo de estimulación. ND, despolarización neuronal. (B) Respuestas generadas por estimulación mínima (EPSCs) (15 estímulos consecutivos) (parte superior) y promedio de EPSCs ( $n = 50$  estímulos) antes (basal) y después de la ND en condiciones control (izquierda) y en presencia de  $2 \mu\text{M}$  de AM251 (derecha). (C) Eficacia sináptica, probabilidad de liberación de neurotransmisor y potencia sináptica *versus* tiempo ( $n = 14$ ). Tiempo cero corresponde al inicio de la ND. (D) Análisis de los parámetros sinápticos antes (basal) y después de la ND en control ( $n = 9$ ), AM251 ( $n = 9$ ) y en rodajas procedentes de ratones transgénicos que carecen del receptor CB1 ( $n = 13$ ). \*\*  $P < 0.01$ .

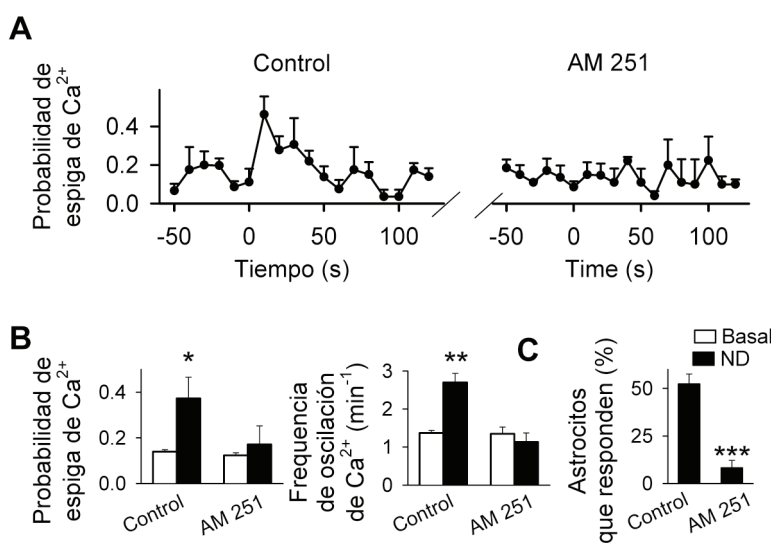
( $2\mu\text{M}$ ). Este fenómeno ha sido caracterizado en gran parte por el estudio de las sinapsis del hipocampo y del cerebelo, y se sabe que es mediado por la activación de los receptores CB1 presinápticos por endocannabinoides procedentes de neuronas postsinápticas (Chevalleyre *et al.*, 2006; Kreitzer y Regher, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Heifets y Castillo, 2009).



El siguiente objetivo que nos propusimos fue investigar si esta potenciación transitoria (e-SP) se debía a los endocannabinoides liberados por despolarización de la neurona piramidal. Así, estos cambios en la transmisión sináptica no fueron observados después de la ND en presencia del antagonista de los receptores CB1, AM251 (2 $\mu$ M; n = 6; Figura 16, C y E); ni cuando la neurona estimulada fue dializada con 40mM BAPTA (que previene la liberación postsináptica de endocannabinoides; cf. Chevaleyre *et al.*, 2006; Wilson y Nicoll, 2001; Kreitzer y Regher, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; n = 11) ni, por último, en ratones transgénicos que carecen de la expresión de receptores CB1 (CB1<sup>-/-</sup>; n = 13) (Figura 16, E). Estos resultados indican que la potenciación sináptica (e-SP) generada por la ND está mediada por endocannabinoides procedentes de la neurona piramidal postsináptica.

### 5.2. La potenciación sináptica requiere del aumento de Ca<sup>2+</sup> astrocitario.

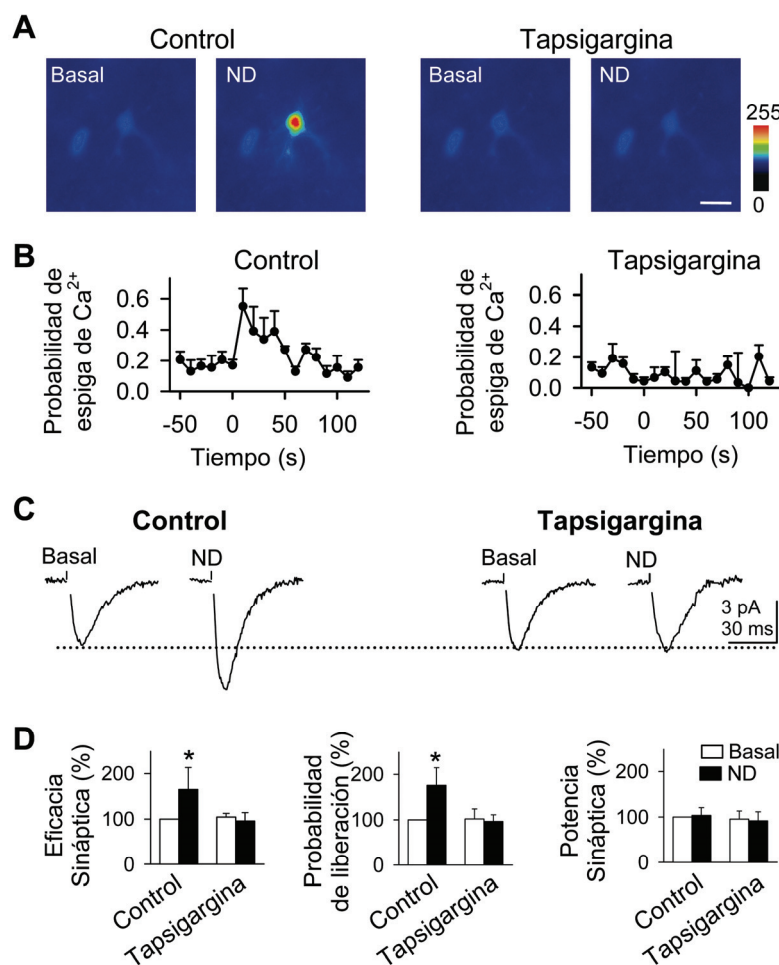
En la sección 3 se ha demostrado que los endocannabinoides liberados por las neuronas piramidales provocan aumentos de Ca<sup>2+</sup> en los astrocitos. Además, se ha demostrado que las elevaciones de Ca<sup>2+</sup> astrocitarias estimulan la liberación de glutamato, que actuando sobre los receptores metabotrópicos de glutamato presinápticos refuerzan la liberación de transmisor en una única sinapsis (Perea y Araque, 2007). Por



**Figura 19. Endocannabinoides liberados por las neuronas piramidales de CA1 elevan el Ca<sup>2+</sup> en astrocitos adyacentes.** (a) Probabilidad de espiga de Ca<sup>2+</sup> versus tiempo en control y 2  $\mu$ M de AM251 (37 astrocitos de n = 5 rodajas). Tiempo cero corresponde al inicio de la ND. (B) Probabilidad de espiga de Ca<sup>2+</sup> y frecuencia de oscilación de Ca<sup>2+</sup>, respectivamente, antes (basal) y después de la ND en control y AM251 (n = 5 rodajas). (C) Proporción de astrocitos que responden con aumentos de Ca<sup>2+</sup> a la ND en control y después de AM251 (37 astrocitos de n = 5 rodajas). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 y \*\*\* P < 0.001. Las barras del error indican SEM.



lo tanto, nos propusimos investigar si la potenciación sináptica inducida por endocannabinoides estaba mediada por la activación de los astrocitos. Con tal fin, lo primero que hicimos fue confirmar que los endocannabinoides procedentes de neuronas piramidales actuaban sobre los astrocitos adyacentes. De hecho, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria, cuantificada como la probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$ , incrementó después de la despolarización de la neurona piramidal registrada, y este efecto fue suprimido en presencia del antagonista de los receptores CB1, AM251 (Figura 19). Probamos si el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario mediado por endocannabinoides era necesario para provocar una potenciación en la transmisión sináptica. Para ello, primero utilizamos tapsigargina, que vacía los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibiendo la ATP-asa de  $\text{Ca}^{2+}$  (Araque et al., 1998, 2002) y previniendo así las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias. Después de registrar la actividad en control, las rodajas fueron incubadas con  $1\mu\text{M}$  de tapsigargina al menos 20 min. Así, se bloqueó el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos y no se observó potenciación alguna en 11 sinapsis de 5 rodajas tratadas con tapsigargina (Figura 20). En cambio, la proporción de neuronas que mostraron DSE después de la ND fueron similar en control y en presencia de tapsigargina (el 30%,  $n = 6$  sinapsis,

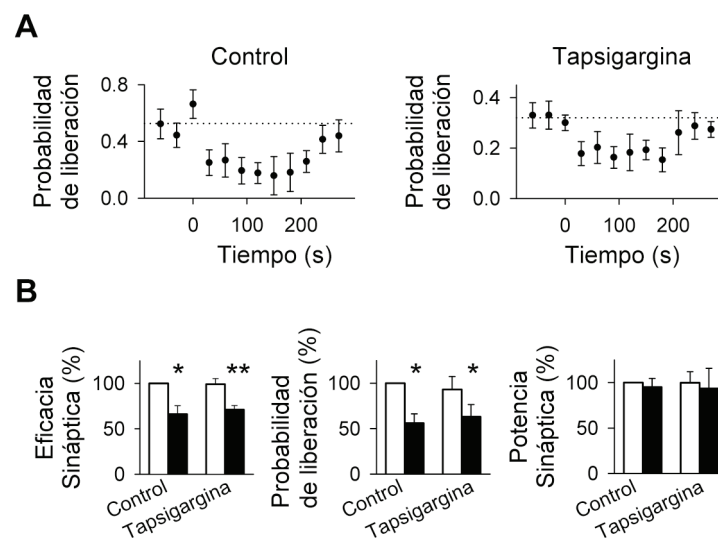


**Figura 20. La potenciación sináptica inducida por endocannabinoides requiere aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios.** (A) Imágenes en pseudocolor que representan intensidades de fluorescencia en astrocitos llenados con Fluo 4-AM antes (basal) y después de la ND en condiciones control y en presencia de tapsigargina. (B) Probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  en control y en presencia de tapsigargina (37 astrocytes,  $n = 5$  rodajas). (C) Promedio de EPSCs ( $n = 50$ ) antes (basal) y después de la ND en control y thapsigargin. (D) Análisis de los parámetros sinápticos antes (basal) y después de la ND en control y en tapsigargina ( $n = 5$ ).

Figura 21), sugiriendo que las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias son un requisito imprescindible para la potenciación sináptica inducida por endocannabinoides.

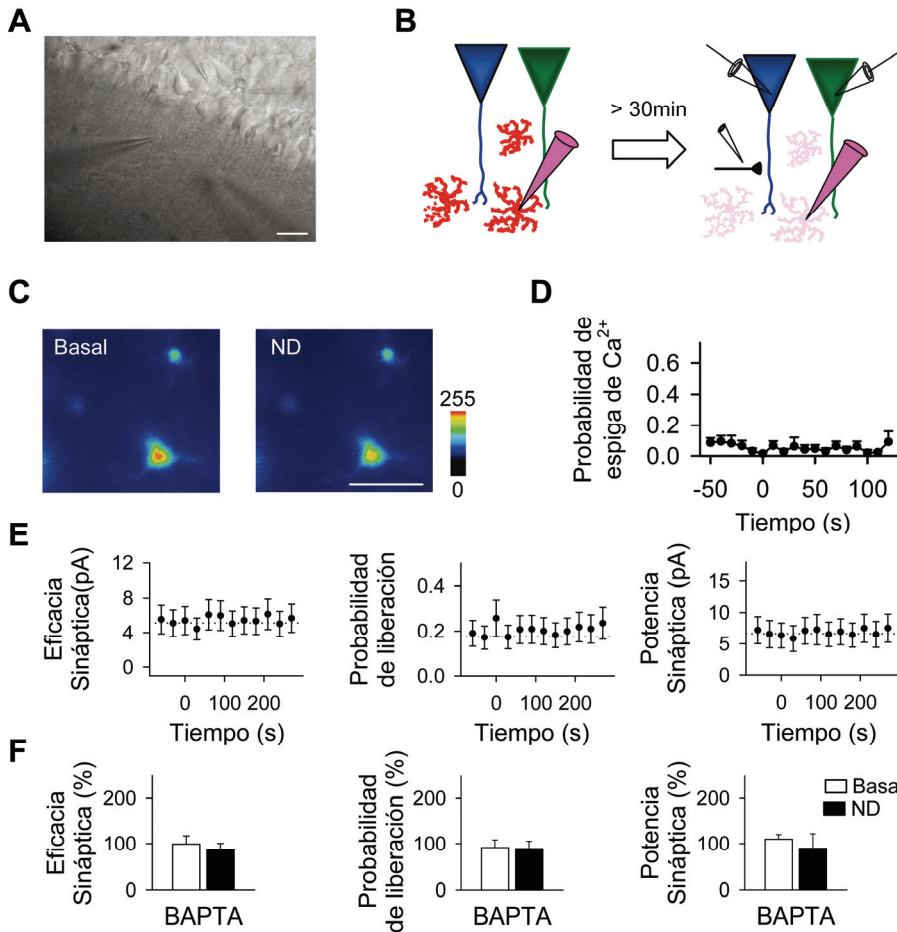
Para confirmar esta hipótesis, bloqueamos específicamente las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias mediante la inclusión de 40mM de BAPTA en la pipeta de registro de un sólo astrocito. Se ha demostrado que la diálisis de BAPTA en un sólo astrocito afecta a una gran cantidad de astrocitos adyacentes (cf. Serrano *et al.* 2006, Jourdain, *et al.*, 2007; Shigetomi *et al.*, 2008), suprimiendo así las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en un gran número de astrocitos. Después de determinar que las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por la ND fueron impedidas en un área de 150  $\mu\text{m}$  alrededor del astrocito llenado (Fig. 22, C y D), determinamos las consecuencias de la diálisis de BAPTA sobre la red astrocitaria en la transmisión sináptica inducida por endocannabinoides. En 12 sinapsis registradas bajo estas condiciones, la ND indujo DSE en 5 sinapsis (el 42%; comparada con el 27% en control), pero no pudo inducir STP en cualesquiera de ellos (el 0% contra el 27% en control).

En conclusión, estos resultados indican que las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias son necesarias para la potenciación sináptica inducida por endocannabinoides.



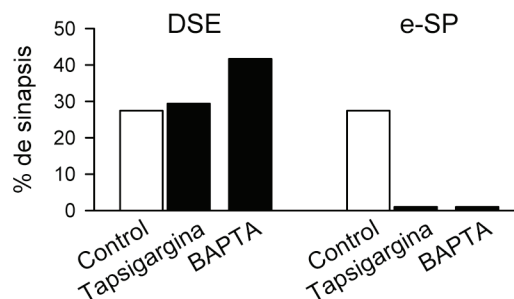
**Figura 21. Tapsigargina no afecta a la DSE** (A) Probabilidad de liberación de neurotransmisor *versus* tiempo en condiciones control y en presencia de 1  $\mu\text{M}$  tapsigargina ( $n = 6$  sinapsis). Tiempo cero corresponde al principio de la ND. (B) Cambios relativos de los parámetros sinápticos antes (basal) y después de la ND en control y tapsigargina ( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Las barras del error indican SEM.

**Figura 22. La potenciación sináptica mediada por endocannabinoides requiere de aumentos de  $Ca^{2+}$  astrocitarios** (A) Imagen de microscopía infrarroja con DIC mostrando pares registros de dos neuronas piramidales, un astrocito (parte inferior izquierda) y el electrodo de estimulación (parte inferior derecha). (B) Diagrama esquemático representando la diálisis con BAPTA en la red de astrocitos por medio de la pipeta de registro de un astrocito. (C) Imágenes en pseudocolor representando intensidades de fluorescencia antes y después de la ND



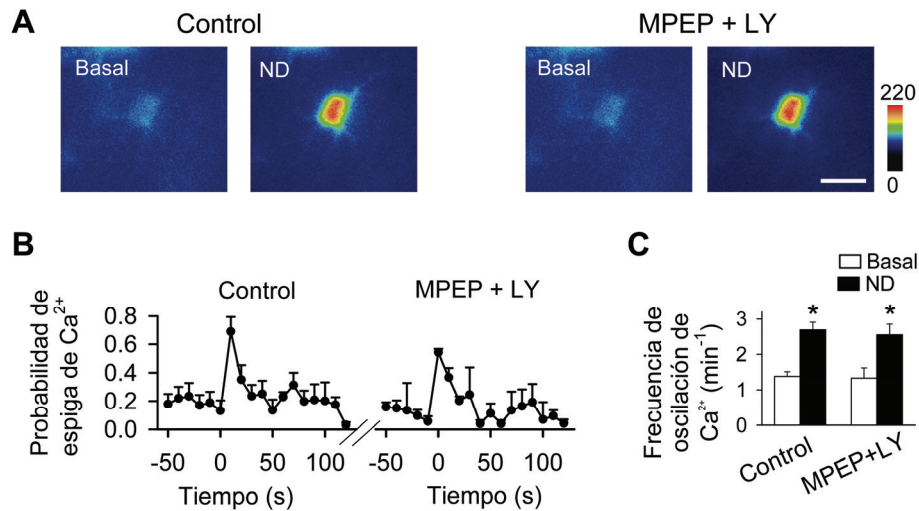
después de la ND después de haber sido llenado los astrocitos con BAPTA (D) Probabilidad espiga de  $Ca^{2+}$  después de ser llenados los astrocitos con BAPTA (84 astrocytes, n = 12 rodajas). Tiempo cero corresponde el inicio de la ND (E) Eficacia sináptica, probabilidad de liberación de neurotransmisor y potencia sináptica en rodajas en donde los astrocitos fueron llenados con BAPTA (n = 12). (F) Cambios relativos de parámetros sinápticos antes (basal) y después de la ND en rodajas donde los astrocitos fueron llenados con BAPTA (n = 12). \*P < 0.05. Las barras del error indican SEM. Barras de calibración, 20  $\mu$ m.

**Figura 23. La potenciación sináptica transitoria (e-SP) requiere del  $Ca^{2+}$  intracelular astrocitario.** Proporción de sinapsis que mostraron DSE y e-SP después de la ND en control, en presencia de tapsigargina (n = 15) y en rodajas donde los astrocitos fueron llenados con BAPTA (n = 12).



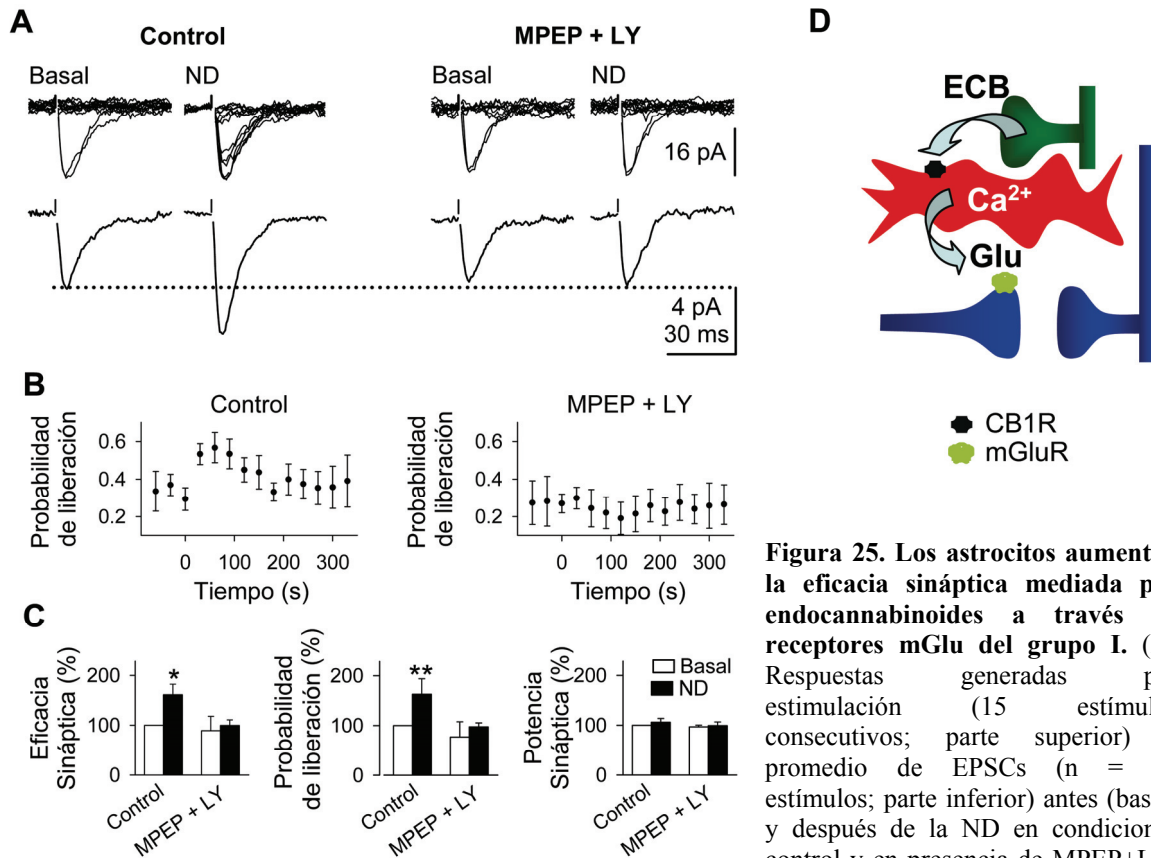
### 5.3. La potenciación sináptica inducida por endocannabinoides está mediada por los receptores mGlu de tipo I.

En la sección 4 se ha mostrado que las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos estimulan la liberación del gliotransmisor glutamato. Además, en un trabajo reciente se ha demostrado que el glutamato procedente de los astrocitos pueden reforzar la probabilidad de liberación sináptica de una única sinapsis (Perea y Araque, 2007).



**Figura 24.** Las elevaciones  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias inducidas por endocannabinoides no se afectan en presencia de los antagonistas de los receptores mGlu del grupo I. (A) Imágenes en pseudocolor que representan intensidades de fluorescencia en un astrocyto antes (basal) y después de la ND en control y en presencia de MPEP + LY367385, antagonistas de los receptores de mGlu de tipo I. Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ . (B) Probabilidad de espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  versus tiempo en control y en presencia de MPEP+ LY367385 (n = 7 rodajas). Tiempo cero corresponde al inicio de la ND. (C) Frecuencia de oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario antes (basal) y después de la ND en condiciones control y en presencia de MPEP+LY367385 (n = 7 rodajas). \*P < 0.05. Las barras del error indican SEM.

En base a estos datos, nos propusimos investigar si era el glutamato y la activación de los mGlu tipo I el responsable de la potenciación sináptica inducida por endocannabinoides. Después de obtener registros en control donde observamos una potenciación sináptica transitoria (e-SP) por la ND, perfundimos antagonistas de los receptores mGlu del grupo I (MPEP (50  $\mu\text{M}$ ), antagonista de mGluR5 y LY367385 (100  $\mu\text{M}$ ), antagonista de mGluR1). En presencia de estos antagonistas la potenciación transitoria de la probabilidad de liberación de transmisor se bloqueó sin afectar a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria (Figuras 24 y 25; Pr =  $0.21 \pm 0.09$  y  $0.21 \pm 0.09$  antes y después de la ND respectivamente; n = 6; P = 0.001).



**Figura 25. Los astrocitos aumentan la eficacia sináptica mediada por endocannabinoides a través de receptores mGlu del grupo I.** (A) Respuestas generadas por estimulación (15 estímulos consecutivos; parte superior) y promedio de EPSCs (n = 50 estímulos; parte inferior) antes (basal) y después de la ND en condiciones control y en presencia de MPEP+LY. (B) Probabilidad de liberación de

neurotransmisor *versus* tiempo en control y después de la perfusión de MPEP+ LY367385 (n = 7). (C) Cambios relativos de los parámetros sinápticos antes (basal) y después de la ND en control y MPEP+LY367385 (n = 7). \*P < 0.05, \*\* P < 0.01. Las barras de error indican SEM. (D) Diagrama esquemático representando la señalización neurona-astrocito mediada por endocannabinoides (ECB), éste es liberado por una neurona piramidal que activando receptores CB1 en los astrocitos eleva el Ca<sup>2+</sup> intracelular de los mismos. Esta elevación de Ca<sup>2+</sup> astrocitaria estimula la liberación de glutamato potenciando, mediante la activación de los receptores mGlu, la transmisión sináptica en una sinapsis vecina.

#### 5.4. La potenciación sináptica inducida por endocannabinoides es mediada por la activación de proteínas G no sensibles a toxina pertúsica.

Mientras que los receptores mGlu se unen a proteínas G<sub>q/11</sub> insensibles a toxina pertúsica (PTX) (Conn and Pinn, 1997; Miura *et al.*, 2002), los receptores de cannabinoides CB1 se unen principalmente a proteínas G<sub>i/o</sub> sensibles a PTX, (Mackie e Hille, 1992; Piomelli, 2003). Se sabe que la depresión sináptica generada por la activación de los receptores CB1 está mediada por proteínas G<sub>i/o</sub> sensibles a PTX (Chevalyere *et al.*, 2006). Además, hemos demostrado a lo largo de este trabajo que los receptores CB1 se puede también unir a las proteínas G no sensible a PTX que activan PLC movilizanddo el Ca<sup>2+</sup> de los reservorios intracelulares (Lauckner *et la.*, 2005).

Por lo tanto, la siguiente pregunta que nos propusimos fue investigar la vía intracelular implicada en la potenciación sináptica inducida por endocannabinoides (e-SP) y para ello utilizamos herramientas farmacológicas. En primer lugar caracterizamos la naturaleza de la proteína de G implicada incubando las rodajas con 7.5  $\mu\text{g/ml}$  de PTX durante 3.5-9 h. y analizamos los efectos de la ND en la transmisión sináptica. En las rodajas tratadas con PTX, el fenómeno de la DSE estaba ausente (1 de 15 sinapsis de 7 rodajas presentaron DSE), mientras que en experimentos en control paralelos se observaron DSE en 3 de 9 sinapsis de 4 rodajas registradas, confirmando que la depresión sináptica inducida por endocannabinoides esta mediada por la activación de proteínas  $G_{i/o}$ . En cambio, la potenciación sináptica transitoria generada por la ND todavía estaba presente en rodajas tratadas PTX, de hecho 5 de 14 sinapsis de 7 rodajas tratadas presentaron potenciación sináptica (36 % en rodajas tratadas con PTX y el 25% en 4 rodajas en experimentos en condiciones control realizados paralelamente) (Figura 26, A y B).

Estos resultados indican que mientras que las proteínas  $G_{i/o}$  median la DSE inducida por receptores CB1, la potenciación sináptica inducida por endocannabinoides (e-SP) está mediada por la activación de receptores mGlu de tipo I unidos a proteínas G no sensibles PTX, probablemente a través de una proteína  $G_{q/11}$ , y la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 26, B)

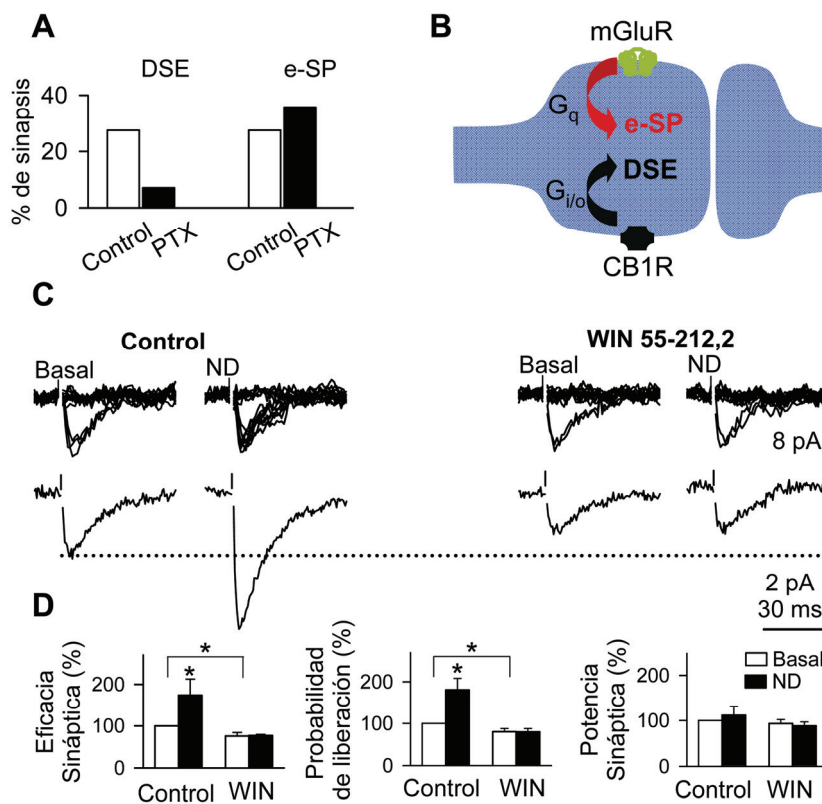
### ***5.5. La modulación sináptica inducida por endocannabinoides no depende de la expresión diferencial de receptores de CB1 sino de rutas específicas de señalización intercelular.***

Investigamos si las diferencias que encontramos en la modulación sináptica (es decir, depresión o potenciación) inducida por endocannabinoides eran debidas a la expresión diferenciada de receptores CB1 o de distintas vías de señalización intracelulares, en otras palabras, ¿podrían las sinapsis que mostraron potenciación sináptica inducida por la ND ser bloqueadas por agonistas de cannabinoides aplicados exógenamente? Para confirmar esta idea, determinamos primero que la sinapsis registrada mostraba potenciación y seguidamente bañamos las rodajas con el agonista de los receptores CB1, WIN55-212,2 (5 $\mu\text{M}$ ). En 7 de las 7 sinapsis registradas en las que se obtuvo potenciación sináptica generada por la ND en condiciones control, la



aplicación de WIN deprimió la transmisión sináptica en un  $25 \pm 6 \%$ ;  $n = 6$ ; (Figura 26, C y D), indicando que esas terminales sinápticas también expresan receptores CB1 funcionales y que depende de la vía de activación para conducir a la depresión o potenciación sináptica.

En conjunto estos resultados indican que la modulación sináptica inducida por endocannabinoides no depende de la expresión diferenciada de receptores de CB1, sino de rutas de señalización intercelular específicos.



**Figura 26. Endocannabinoides inducen DSE y e-SP** (A) La proporción de sinapsis que mostraron DSE o potenciación (e-SP) en control ( $n = 8$ ) y en rodajas tratadas con PTX ( $n = 14$ ). (B) Diagrama esquemático que representa las vías de señalización que conducen a la DSE o la e-SP. (C) Respuestas sinápticas (15 estímulos consecutivos; parte superior) y el promedio de los EPSCs ( $n = 50$  estímulos; parte inferior) antes (basal) y después de la ND en control y en presencia de WIN. (D) Cambios relativos de parámetros sinápticos antes (basal) y después de la ND en control y WIN ( $n = 7$ ). \* $P < 0.05$ . Las barras del error indican SEM

### 5.6. Endocannabinoides inducen depresión homosináptica y potenciación heterosináptica.

Se conocen que los endocannabinoides tienen efectos a corta distancia,  $<20\mu\text{m}$  (Wilson y Nicoll, 2001; Kretizer y Regher, 2002; Chevaleyre y Castillo, 2004; Chevaleyre *et al.*, 2006; Heifets y Castillo, 2009). En cambio, la señal del  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria puede tener efectos neuromoduladores relativamente “interurbanos”, ya que

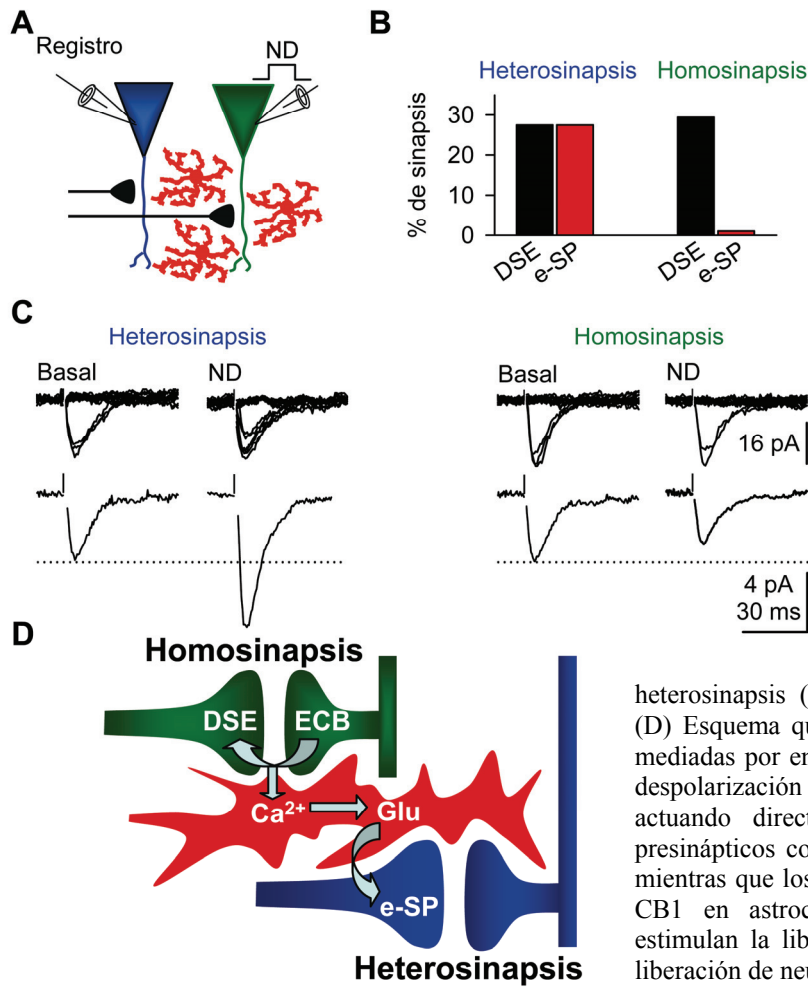
pueden liberar gliotransmisores en puntos más distales como consecuencia de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Serrano *et al.*, 2006; Perea y Araque., 2005). Por lo tanto presumimos que los endocannabinoides liberados mediante la ND deprimen la transmisión sináptica actuando directamente en los receptores CB1 en los terminales sinápticos cercanos, mientras que refuerzan sinapsis más distales mediante la activación de receptores CB1 en astrocitos, provocando el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario que estimula la liberación de gliotransmisor en puntos más distantes.

Para probar esta hipótesis analizamos los efectos simultáneos que producen los endocannabinoides en las propiedades sinápticas de la sinapsis de la neurona despolarizada (la que se despolariza experimentalmente, llamada homosinapsis) y de la neurona no estimulada (en la que solamente registramos, llamada heterosinapsis) (Figura 27). En 33 sinapsis registradas apareadas, en la neurona llamada homosinapsis se observaron 13 sinapsis con DSE (39%), pero nunca se observó potenciación en la transmisión sináptica (e-SP) (0%). Por otro lado, en la heterosinapsis, 10 sinapsis mostraron DSE (30%) y 9 presentaron potenciación (e-SP) (27%;  $n = 33$ ; Figura 27). Estos resultados indican que los endocannabinoides tienen efectos neuromoduladores opuestos, deprimiendo la transmisión sináptica actuando directamente sobre los receptores CB1 presinápticos o potenciando la transmisión sináptica actuando sobre los receptores CB1 de los astrocitos, que estimulan la liberación del transmisor glutamato.

En conclusión, estos resultados indican que los endocannabinoides presentan al menos dos tipos vías de señalización, una de corto alcance, que a través de la activación de receptores CB1 presinápticos conducen a la depresión homosináptica, y otra de largo alcance, donde mediante la estimulación de CB1 en astrocitos aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, liberando gliotransmisor glutamato que conduce a la potentiation heterosináptica (e-SP). Esta señalización por endocannabinoides que produce potenciación heterosináptica mediada por astrocitos puede proporcionar un mecanismo compensatorio para el control homeostático de las entradas sinápticas. De hecho, las sinapsis altamente activas estimulan la liberación de endocannabinoides que conducen a la depresión homosináptica, reduciendo así la fuerza sináptica relativa de dichas sinapsis (Figura 27, D). En paralelo, los astrocitos activados por endocannabinoides conducen a la potenciación heterosináptica, aumentando la fuerza relativa de sinapsis vecinas menos activas. Estos resultados muestran que los astrocitos refuerzan la eficacia



sináptica en el hipocampo, indicando que son parte integral del sistema de señalización por endocannabinoides.



**Figura 27. Los endocannabinoides inducen depresión homosináptica y potenciación heterosináptica.** (A) Esquema de las condiciones experimentales. Homosinapsis corresponde a la sinapsis registrada sobre la neurona despolarizada. Heterosinapsis corresponde a la sinapsis vecina registrada sobre la neurona sin estimular. (B) Proporción de las sinapsis (tanto hetero como homo) que mostraron DSE y e-SP después de la ND (n = 33 sinapsis apareadas). (C) Respuestas sinápticas (15 estímulos consecutivos; parte superior) y el promedio de los EPSCs (n = 50 estímulos; parte inferior) antes (basal) y después de la ND en heterosinapsis (izquierda) y homosinapsis (derecha). (D) Esquema que representa las vías de señalización mediadas por endocannabinoides (ECB) liberados por despolarización de una neurona piramidal que actuando directamente sobre los receptores CB1 presinápticos conducen a la DSE en la homosinapsis mientras que los ECB que actúan sobre los receptores CB1 en astrocitos elevan el Ca<sup>2+</sup> intracelular y estimulan la liberación de glutamato, potenciando la liberación de neurotransmisor en la heterosinapsis.

## **V. DISCUSIÓN**

La existencia de una comunicación recíproca entre astrocitos y neuronas revela el importante papel que juegan los astrocitos en la fisiología del Sistema Nervioso (SN). Los resultados que aquí se presentan muestran que los astrocitos, más allá de ser meros espectadores, son elementos activos, dotados de propiedades complejas.

Así, se ha demostrado que los astrocitos de hipocampo expresan receptores funcionales de cannabinoides CB1, que tras la activación con ligandos tanto endógenos como exógenos aumentan sus niveles de  $Ca^{2+}$ , movilizándolo desde los reservorios intracelulares a través de un mecanismo insensible a PTX y mediado por PLC. Además, los receptores CB1 presentes en astrocitos se pueden activar por endocannabinoides liberados por las neuronas piramidales, aumentando sus niveles de  $Ca^{2+}$  y estimulando la liberación de glutamato, que apunta de nuevo a las neuronas, provocando corrientes lentas de entrada, mediadas por receptores de NMDA, en neuronas piramidales adyacentes. Por lo tanto, la respuesta de los astrocitos a endocannabinoides liberados endógenamente implica la existencia de una nueva vía de comunicación entre neuronas y astrocitos.

La expresión de receptores CB1 en diversas poblaciones neuronales en diversas áreas del cerebro está bien documentada (ver revisiones Freund *et al.*, 2003; Piomelli, 2003). Estudios ultraestructurales han detectado la localización de receptores CB1 en los astrocitos del núcleo caudado putamen (Rodríguez *et al.*, 2001), en el asta dorsal de la médula espinal (Salio *et al.*, 2002) y en cultivos de células gliales (Molina-Holgado *et al.*, 2003; Stella, 2004; Walter y Stella, 2003), sin embargo, es controvertido si los astrocitos *in situ* expresan receptores funcionales de CB1. En este trabajo, proporcionamos evidencias que indican que los astrocitos *in situ* expresan receptores funcionales de CB1, pudiendo desempeñar un papel relevante en la señalización intercelular en el SN.

Numerosos estudios se han centrado en los mecanismos de transducción de la señal por endocannabinoides, y todos ellos indican que los receptores CB1 pertenecen a la superfamilia de proteínas G (Matsuda, 1990), uniéndose preferentemente a proteínas  $G_{i/o}$  sensibles a PTX, que conducen, entre otros efectos, a una inhibición de la adenilato ciclasa, a una estimulación de la vía de las quinasas, a una regulación negativa de canales de calcio de tipo N y P/Q, y positiva de corrientes rectificadores de potasio

(Mackie e Hille, 1992; Piomelli, 2003). También activan fosfolipasa C (PLC) de una manera sensible a PTX mediada por las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_{i/o}$  (Filipeanu *et al.*, 1997; Lograno y Romano, 2004; Netzeband, 1999; Sugiura, 1997). En cambio, no se había descrito una cascada de señalización intracelular con aumentos intracelulares de  $Ca^{2+}$ , pero en los últimos años, se ha demostrado que WIN, agonista sintético de los receptores de cannabinoides, en células HEK293 transfectadas, pueden unirse a otra proteína G insensible a PTX, como es la proteína  $G_{q/11}$ , de una manera agonista-específica para activar PLC (Lauckner *et al.*, 2005), sugiriendo una promiscuidad de las proteínas G (Llano *et al.*, 1991; Stella, 2004). Nuestros resultados indican que la activación de los receptores CB1 por cannabinoides, tanto exógenos como generados endógenamente, conduce a la movilización de  $Ca^{2+}$  por la activación de PLC de una manera insensible a PTX, indicando que los receptores CB1 se pueden unir a proteínas  $G_{q/11}$ .

Esta señal inducida por endocannabinoides aumenta el  $Ca^{2+}$  astrocitario pudiendo señalar de nuevo a las neuronas a través de la liberación de glutamato, activando receptores de NMDA en neuronas piramidales. Estas corrientes y su dependencia de la señal de  $Ca^{2+}$  astrocitaria, descritas originalmente en preparaciones de astrocitos en cultivo (Araque *et al.*, 1998a), han sido observadas también en neuronas talámicas, donde podrían estar relacionadas con procesos de maduración de la red neuronal (Parri *et al.*, 2001) y en neuronas piramidales de CA1, donde se ha sugerido que la aparición de estas corrientes podrían estar relacionada con mecanismos de sincronización de la actividad neuronal (Angulo *et al.*, 2004; Fellin *et al.*, 2004). Aunque no hemos investigado el significado funcional de estas corrientes, el hecho de que estén mediadas por receptores de NMDA sugiere que, además de la sincronización neuronal sugerida por otros autores (Angulo *et al.*, 2004; Fellin *et al.*, 2004), podrían producirse fenómenos de detección de coincidencia entre la comunicación astrocito-neurona y la actividad sináptica en la neurona postsináptica. Además, estos resultados sugieren la existencia de nuevas rutas intercelulares de comunicación mediadas por endocannabinoides-glutamato donde los astrocitos sirven como puente y/o diana para la comunicación interneuronal.

Por otra parte, la actual demostración de que los astrocitos *in situ* expresan receptores de cannabinoides CB1 y su participación en la señalización mediada por glutamato, permite pensar en la posibilidad de que los astrocitos, por medio de la

---

activación directa de los receptores CB1, estén implicados en los efectos mediados por cannabinoides, como por ejemplo, en plasticidad sináptica a corto y a largo plazo, en la actividad locomotora, propiedades anticonvulsiantes, así como en metaplasticidad sináptica en diversas áreas del cerebro (Alger, 2002; Chevaleyre *et al.*, 2006; Kreitzer y Regehr, 2002; Walter y Stella, 2003), y en los efectos psicotrópicos de los cannabinoides como droga de abuso (Maldonado *et al.*, 2006).

Mientras que la implicación de los receptores CB1 en la depresión sináptica está bien documentada en distintas áreas cerebrales (Chevaleyre *et al.*, 2006; Heifets y Castillo, 2009; Kreitzer y Regehr, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2001), ésta es la primera observación en el hipocampo de que los endocannabinoides pueden conducir a la potenciación sináptica a nivel de una única sinapsis. Dicha potenciación es un fenómeno indirecto mediado a través de la estimulación de la liberación de glutamato por astrocitos. Análogamente, un efecto indirecto de los endocannabinoides sobre la transmisión sináptica mediado a través de un segundo neuromodulador ha sido recientemente descrito en la sinapsis mixta de la célula de Mauthner de peces osteictios, donde la activación de receptores presinápticos CB1 en terminales dopaminérgicas estimula la liberación de dopamina y la consiguiente modulación de la transmisión sináptica eléctrica y química (Cachope *et al.*, 2007). Si la plasticidad sináptica inducida por endocannabinoides de manera indirecta a través de la estimulación de un segundo neuromodulador es un fenómeno general en el SN, representa una posibilidad excitante que requiere de futuros estudios (Cachope *et al.*, Kyriakatos y El Manira, 2007; Heifets y Castillo, 2009).

Los resultados que aquí se presentan, indican que los astrocitos ejercen un efecto modulador sutil sobre la actividad de sinapsis únicas que fue pasada por alto al analizar los efectos sobre la neurotransmisión en gran escala. Efectivamente, el hecho de que las homosinapsis mostraran solamente DSE sugiere que la depresión sináptica inducida por endocannabinoides, mediada por la activación directa de los receptores presinápticos CB1, sea el mecanismo que prevalece a la potenciación sináptica inducida por astrocitos. Por lo tanto, no es tan sorprendente que la potenciación sináptica inducida por endocannabinoides estuviese enmascarada cuando se analiza la transmisión sináptica generada por el estímulo masivo de axones o cuando se aplican agonistas exógenos. Por lo tanto, estos resultados confirman nuestra hipótesis sobre el delicado papel regulador de los astrocitos en la neurotransmisión, pudiéndose quedar

enmascarado por mecanismos moduladores más fuertes, pero que puede ser revelado analizando la transmisión sináptica más finamente. Hemos demostrado que la modulación sináptica inducida por endocannabinoides (es decir, potenciación o depresión) depende de rutas específicas intercelulares, esto es, mientras que los endocannabinoides que actúan sobre los receptores CB1 presinápticos conducen a la depresión homosináptica, la potenciación heterosináptica resulta de la activación de los receptores CB1 en astrocitos. Estos resultados también indican que la regulación sináptica espacial inducida por endocannabinoides está bien definida. Los endocannabinoides representan una señal de corto alcance que conduce a la depresión sináptica, pero estimulando los astrocitos pueden también activar una señal de largo alcance que conduce a la potenciación sináptica de sinapsis más lejanas. Dado que los astrocitos median la potenciación sináptica inducida por endocannabinoides, proporcionan un mecanismo compensatorio para la homeostasis de entradas sinápticas con distintas eficacias. De hecho, las entradas sinápticas altamente activas pueden estimular la liberación de endocannabinoides que conducen a la depresión homosináptica, reduciendo la fuerza sináptica relativa de las sinapsis activas. En paralelo, los astrocitos activados por esos endocannabinoides pueden conducir a la potenciación heterosináptica, aumentando la eficacia relativa de sinapsis vecinas menos activas. Los actuales resultados indican que los astrocitos son una parte integral de señalización intercelular por endocannabinoides.

Asimismo, nuestros resultados apoyan la idea de que los astrocitos son capaces de modular las propiedades de transmisión de información de una única sinapsis (Perea y Araque, 2007). En este estudio se estimuló selectivamente un único astrocito de forma experimental e incrementó de forma transitoria la probabilidad de liberación de neurotransmisor en una sinapsis. Sin embargo la relevancia fisiológica no ha sido demostrada. Esta es la primera observación de que los astrocitos son capaces de modular las propiedades de transmisión de información mediante un estímulo fisiológico, como es la despolarización neuronal.

Por otro lado, los experimentos diseñados para observar los efectos de la señal de  $Ca^{2+}$  astrocitaria en la excitabilidad neuronal o en la transmisión sináptica mostraron que no todos los astrocitos respondieron a la ND (50%) y que solamente un subconjunto de las sinapsis (alrededor 30%) experimentó una potenciación sináptica mediada por endocannabinoides. Las condiciones experimentales pudieron explicar por qué no

obteníamos respuestas en el 100% de los casos, así es por la limitación de la resolución óptica, no podríamos excluir que el árbol dendrítico de la neurona estuviese lejos del 50% restante de los astrocitos o que los astrocitos que no se afectaron no estuviesen en suficiente proximidad a la sinapsis registrada. Alternativamente, es factible que en algunos casos la sinapsis registrada no estuviese conectada funcionalmente con los astrocitos registrados. Si esta ausencia de la conectividad es debido a bases funcionales o estructurales es desconocido, pero es interesante observar que solamente un subconjunto de las sinapsis excitatorias en el hipocampo (otra vez el alrededor 40%) es cubierto por procesos astrocitarios (Ventura y Harris, 1999), lo que conduce a pensar que no todas las sinapsis son funcionalmente tripartitas. Además, el hecho que las elevaciones de  $Ca^{2+}$  generadas con ATP, lo cual genera elevaciones de  $Ca^{2+}$  en un gran número de astrocitos, la potenciación transitoria también se observa solamente en el 40% de los casos (Perea y Araque, 2007). Si éste es el caso, sería interesante probar si las sinapsis tripartitas son unidades funcionales estables o dinámicas. La última idea toma más fuerza por la observación de cambios estructurales coordinados en procesos astrocitarios y en las espinas sinápticas que ocurren en el hipocampo (Haber, 2006). La plasticidad en el establecimiento de sinapsis tripartitas puede tener gran impacto en el funcionamiento de la red neurona-glia. En todo caso, el hecho de que solamente un subconjunto de sinapsis sea modulada con eficacia por los astrocitos indica que la neuromodulación no resulta de un derramamiento de gliotransmisor, sino que sugiere la existencia de una señalización específica entre astrocitos y neuronas, probablemente como una forma de comunicación punto a punto.

En vista de la importancia de la señalización intercelular mediada por endocannabinoides en numerosos procesos del SN, tales como percepción del dolor o el aprendizaje y la memoria, los actuales resultados indican que los astrocitos están implicados activamente en fenómenos relevantes de la fisiología del cerebro.

Más de un siglo después del trabajo original de Cajal (Ramón y Cajal, 1899) sobre la significación fisiológica de la neuroglía, empezamos a reconocer el importante papel de los astrocitos en la fisiología neuronal y a vislumbrar la verdadera dimensión de la intervención de estas células en el funcionamiento del SN.

## **VI. CONCLUSIONES**



1. Los astrocitos localizados en el *stratum radiatum* de la región CA1 de hipocampo de ratón expresan receptores funcionales de CB1, cuya activación por cannabinoides genera aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.
2. Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos generados tras activación de receptores CB1 por cannabinoides aplicados exógenamente o por endocannabinoides liberados por neuronas piramidales están mediados por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares resultante de la activación de proteínas G y PLC.
3. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria generada por endocannabinoides induce la liberación de glutamato por astrocitos y la generación de corrientes lentas de entrada (SICs) en neuronas piramidales de CA1.
4. Los endocannabinoides potencian la liberación de neurotransmisor en sinapsis excitadoras únicas de hipocampo.
5. Los endocannabinoides inducen depresión sináptica en homosinapsis.
6. Los endocannabinoides potencian la transmisión sináptica excitadora en heterosinapsis a través de la estimulación de la liberación de glutamato por astrocitos tras la activación de sus receptores CB1.
7. Existe una nueva vía de señalización mediada por la acción concertada de endocannabinoides y glutamato, donde los astrocitos sirven de puente para una comunicación no sináptica entre neuronas.
8. Los astrocitos, estimulados por endocannabinoides, modulan la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica, indicando que los astrocitos participan activamente en la fisiología del Sistema Nervioso.

## **VII. REFERENCIAS**

- Adams, I.B., Martin, B.R. (1996). Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. *11*, 1585-614.
- Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J.F., Carmona, M.A., Soriano, E. (2002). Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J. Neurosci*. *22*, 9430-9444
- Alger, B.E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog. Neurobiol*. *68*, 247-286.
- Angulo, M.C., Kozlov, A.S., Charpak, S., Audinat, E. (2004). Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci*. *24*, 6920-6927.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G. (2001). Dynamic signaling between neurons and glia. *Annu. Rev. Physiol*. *63*, 795-813.
- Araque, A., Martin, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., Buño, W. (2002). Synaptically released acetylcholine evokes  $Ca^{2+}$  elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci*. *22*, 2443-2450.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G. (1998a). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci*. *10*, 2129-2142.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. *22*, 208-215.
- Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V., Haydon, P.G. (1998b). Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci*. *18*, 6822-6829.
- Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., Malenka, R.C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science* *295*, 2282-2285.
- Beierlein, M., Regehr, W.G. (2006) Brief bursts of parallel fiber activity trigger calcium signals in bergmann glia. *J Neurosci*. *26*, 6958-69567.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D. (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* *277*, 1094-1097.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. *277*, 1094-1097.
- Bergles, D.E., Jahr, C.E. (1997). Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* *19*, 1297-1308.

Bergles, D.E., Roberts, J.D., Somogyi, P., Jahr, C.E. (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 40, 187-191.

Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281-285.

Blázquez, C., Sánchez, C., Daza, A., Galve-Roperh, I., Guzmán, M. (1999) The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem.* 72, 1759-1768.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinase by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312, 637-641.

Bouchard, J.F., Lepicier, P., Lamontagne, D. (2003) Contribution of endocannabinoides in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci.* 16, 1859-70, 2003

Bowser, D.N., Khakh, B.S. (2004) ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *J. Neurosci.* 24, 8606-8620.

Brockhaus, J., Deitmer, J.W. (2002). Long-lasting modulation of synaptic input to Purkinje neurons by Bergmann glia stimulation in rat brain slices. *J. Physiol. (Lond)* 545, 581-593.

Cachope, R., Mackie, K., Triller, A., O'Brien, J., Pereda, A.E. (2007) Potentiation of electrical and chemical synaptic transmission mediated by endocannabinoids. *Neuron* 56, 1034-1047

Catsicas, M., Mobbs, P. (2001). GABA<sub>B</sub> receptors regulate chick retinal calcium waves. *J. Neurosci.* 21, 897-910.

Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R., Sanderson, M.J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6, 983-992.

Chevaleyre, V., Castillo, P.E. (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38, 461-472.

Chevaleyre, V., Takahashi, K.A., Castillo, P.E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 37-76.

Conn, P.J., Pin, J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37, 205-237.

Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247, 470-73.

Cotrina, M.L., Lin, J.H., Lopez-Garcia, J.C., Naus, C.C., Nedergaard, M. (2000). ATP mediated glia signaling. *J. Neurosci.* 20, 2835–2844.

Cotrina, M.L., Nedergaard, M. (2005). Intracellular calcium control mechanisms in glia, in: H. Kettenman, B. Ransom (Eds.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, pp. 229–239.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 384, 83-87.

Daaka, Y., Friedman, H., Klein, T.W., (1996). Cannabinoid receptor proteins are increased in Jurkat, human T-cell line after mitogen activation. *J Pharmacol Exp Ther* 276, 776–783.

Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34, 605-613,

Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Rev. Drug Discov.* 3, 771-784.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 372, 686-691.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 10819–10824.

Dobrunz, L.E., Stevens, C.F. (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18, 995-1008.

Dombeck, D.A. *et al.* (2007) Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron* 56, 43-57.

Duffy, S., MacVicar, B.A. (1995). Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J. Neurosci.* 15, 5535–5550.

Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729-743.

Fiacco, T.A., McCarthy, K.D. (2004). Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 24, 722-732.

Filipeanu, C.M., de Zeeuw, D., Nelemans, S.A. (1997). Delta9-tetrahydrocannabinol activates  $[Ca^{2+}]_i$  increases partly sensitive to capacitative store refilling. *Eur. J. Pharmacol.* 336, R1-R3.

Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in

synaptic signalling. *Physiol. Rev.* 83, 1017-1066.

Gaoni, Y., Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashisch. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646-1647.

Gómez del Pulgar, T., de Ceballos, M.L., Guzmán, M., Velasco, G. (2002). Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase B pathway. *J Biol Chem* 277, 36527–36533.

Grosche, J., Matyash, V., Moller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., Kettenmann, H. (1999). Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat. Neurosci.* 2, 139-143.

Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C., Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci.* 19, 520-528.

Guzman, M., Sanchez, C., Galve-Roperh, I. (2001) Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 19-22.

Heifets BD, Castillo PE (2009) Endocannabinoid Signaling and Long-Term Synaptic Plasticity *Annu. Rev. Physiol.* 71, 283–306

Hajos N, Ledent C, Freund T.F. (2004). Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* 106, 1–4.

Harris-White, M.E., Zanolini, S.A., Frautschy, S.A., Charles, A.C. (1998) Spiral intercellular calcium waves in hippocampal slice cultures. *J. Neurophysiol.* 79, 1045–1052.

Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185-193.

Haydon, P.G., Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol. Rev.* 86, 1009-1031.

Hillard, C. J., Edgmond, W. S., Jarrahian, A., Campbell, W.B. (1997). Accumulation of N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.* 69, 631-638.

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C. Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R. (1998). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54, 161–202.

Innocenti, B., Parpura, V., Haydon, P.G. (2000). Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci.* 20, 1800–1808.

- Isaac, J.T., Hjelmstad, G.O., Nicoll, R.A., Malenka, R.C. (1996). Long-term potentiation at single fiber inputs to hippocampal CA1 pyramidal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 8710-8715.
- Isokawa, M., Alger, B.E. (2006) Ryanodine receptor regulates endogenous cannabinoid mobilization in the hippocampus. *J Neurophysiol.* *95*, 3001-3011.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci.* *10*, 331-339.
- Jung, M., Calassi, R., Rinaldi-Carmona, M., Chardenot, P., Le Fur, G., Soubrie, P., Oury-Donat, F. (1997). Characterization of CB1 receptors on rat neuronal cell cultures: binding and functional studies using the selective receptor antagonist SR 141716A. *J eurochem* *68*, 402–409.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* *1*, 683-692.
- Kettenmann, H., Ransom, B.R. (2005). *Neuroglia*. 2nd Ed. Oxford University Press, New York.
- Kettenmann, H., Steinhäuser, C. (2005). Receptors for Neurotransmitters and Hormones, in: H. Kettenman, B. Ransom (Eds.), *Neuroglia*, (Oxford University Press, New York), pp. 131–145.
- Kreitzer, A.C., Carter, A.G., Regehr, W.G. (2002). Inhibition of interneuron firing extends the spread of endocannabinoid signaling in the cerebellum. *Neuron* *34*, 787-796.
- Kreitzer, A.C., Regehr, W. G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* *29*, 717-727.
- Kreitzer, A.C., Regehr, W.G. (2002). Retrograde signaling by endocannabinoids. *Curr. Opin. Neurobiol.* *12*, 324-330.
- Kyriakatos A, El Manira A. (2007) Long-term plasticity of the spinal locomotor circuitry mediated by endocannabinoid and nitric oxide signaling. *J. Neurosci.* *27*, 12664–12674
- Kulik, A., Haentzsch, A., Luckermann, M., Reichelt, W., Ballanyi, K. (1999). Neuron-glia signaling via  $\alpha 1$  adrenoceptor-mediated  $Ca^{2+}$  release in Bergmann glial cells *in situ*. *J. Neurosci.* *19*, 8401–8408.
- Lauckner, J.E., Hille, B., Mackie, K. (2005). The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to  $G_{q/11}$  G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 19144-19149.
- Lepicier, P., Bouchard, J.F., Lagneux, C., Lamontagne, D. (2003) Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br J Pharmacol* *139*, 805-815.

- Llano, I., Leresche, N., Marty, A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6, 565-574.
- Lograno, M.D., Romano, M.R. (2004). Cannabinoid agonists induce contractile responses through  $G_{i/o}$ -dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 494, 55-62.
- Mackie, K., Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 3825-3829.
- Maldonado, R., Valverde, O., Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29, 225-232.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.
- McKinney, M.K., Cravatt, B.F. (2005) Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 411-32.
- Miura, M., Watanabe, M., Offermanns, S., Simon, M.I., Kano, M. (2002) Group I metabotropic glutamate receptor signaling via  $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$  secures the induction of long-term potentiation in the hippocampal area CA1. *J Neurosci.* 22, 8379-8390.
- Moldrich, G., Wenger, T. (2000). Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides K*, 1735–1742.
- Molina-Holgado, F., Pinteaux, E., Moore, J.D., Molina-Holgado, E., Guaza, C., Gibson, R.M., Rothwell, N.J. (2003). Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J. Neurosci.* 23, 6470-6474.
- Mothes, J.P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., Baux, G. (2005). Glutamate receptor activation triggers a calciumdependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter d-serine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 5606–5611.
- Munro, S., Thomas, K., Abu-Shaar, M.L. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.
- Nedergaard, M., Ransom, B., Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26, 523-530.
- Nett, W.J., Oloff, S.H., McCarthy, K.D. (2002). Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J. Neurophysiol.* 87, 528-537.
- Netzeband, J.G., Conroy, S.M., Parsons, K.L., Gruol, D.L. (1999). Cannabinoids enhance NMDA-elicited  $Ca^{2+}$  signals in cerebellar granule neurons in culture. *J. Neurosci.* 19, 8765-8777.



- Newman, E.A. (2003). Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J. Neurosci.* *23*, 1659-1666.
- Newman, E.A., Zahs, K.R. (1997) Calcium waves in retinal glial cells. *Science* *275*, 844–847.
- Nicholls, J.G., Martin, A.R., Wallace, B.G., Fuchs, P.A. (2001). *From Neuron to Brain*. 4<sup>th</sup> Ed. (Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.).
- Noe, SN., Newton, C., Widen, R., Friedman, H., Klein, TW. (2000). Anti-CD40, anti-CD3, and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes. *J Neuroimmunol* *110*,161–167.
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., and Kano, M. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* *29*, 729–738.
- Orkand, R.K., Nicholls, J.G., Kuffler, S.W. (1966). Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia, *J. Neurophysiol.* *29*, 788–806.
- Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Breuer, A., Mechoulam, R., Shohami, E. (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* *413*, 527–531.
- Parri, H.R., Gould, T.M., Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat. Neurosci.* *4*, 803-812.
- Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez R., Sul, J.Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., Haydon, P.G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* *310*, 113-116.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., Carmignoto, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* *17*, 7817-7830.
- Perea, G., Araque, A. (2002). Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *J. Physiol. (Paris)* *96*, 199-207.
- Perea, G., Araque, A. (2005a). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* *25*, 2192-2203.
- Perea, G., Araque, A. (2005b). Glial calcium signaling and neuron–glia communication. *Cell Calcium* *38*, 375–382.
- Perea, G., Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. *317*, 1083-1086.
- Pertwee, R. G. (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* *74*, 129-80,

- Pertwee, R. G. (1998) Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors. *Biochem.Soc.Trans.* 26, 267-72,
- Peters, O., Schipke, C.G., Hashimoto, Y., Kettenmann, H. (2003). Different mechanisms promote astrocyte  $Ca^{2+}$  waves and spreading depression in the mouse neocortex. *J. Neurosci.* 23, 9888–9896.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 873-884.
- Porter, J.T., McCarthy, K.D. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* 16, 5073- 5081.
- Porter, J.T., McCarthy, K.D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.* 51, 439-455.
- Ramón y Cajal, S. (1899). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados.* Tomo I. N. Moya, Madrid.
- Ramos Atance, J.A., Fernandez Ruiz, J. (2000) Uso de los cannabinoides a través de la historia. *Adicciones. Monografía Cannabis 12*, 19-30.
- Robitaille, R. (1998). Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21, 847-855.
- Rodriguez, J.J., Mackie, K., Pickel, V.M. (2001). Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J. Neurosci.* 21, 823-833.
- Salio, C., Doly, S., Fischer, J., Franzoni, M.F., Conrath, M. (2002). Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci. lett.* 329, 13-16.
- Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Rueda, D., Guzmán, M. (1998). Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol* 54, 834–843.
- Schipke, C.G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F., Kettenmann, H. (2002). Astrocyte  $Ca^{2+}$  waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J.* 16, 255–257.
- Schummers, J. Yu, H., Sur, M. (2008) Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 320, 1638-1643.
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.C., Robitaille, R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J. Neurosci.* 26, 5370-5382.
- Shelton, M.K., McCarthy, K.D. (1999). Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia* 26, 1-11.

- Shen, M., Thayer, S.A. (1998) Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Mol Pharmacol* 54, 459-462.
- Shigetomi, E., Bowser, D.N., Sofroniew, M.V., Khakh, B.S. Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 25, 6659-6663
- Sontheimer, H. (1994). Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* 11, 156-172.
- Stella, N. (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 48, 267-277.
- Stevens, C.F., Wang, Y. (1995). Facilitation and depression at single central synapses. *Neuron* 14, 795-802.
- Sugiura, T., Kodaka, T., Kondo, S., Nakane, S., Kondo, H., Waku, K., Ishima, Y., Watanabe, K., Yamamoto, I. (1997). Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca<sup>2+</sup> transient in NG108-15 cells. *J. Biochem.* 122, 890-895.
- Sul, J.Y., Orosz, G., Givens, R.S., Haydon, P.G. (2004). Astrocytic connectivity in the hippocampus. *Neuron Glia Biology* 1, 3-11.
- Szabo, B., Muller, T., Koch, H. (1999) Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem* 73, 1084-1089.
- Veis, A., Wei, K., Sfeir, C., George, A., Malone, J. (1998) Properties of the (DSS)<sub>n</sub> triplet repeat domain of rat dentin phosphophoryn *Eur J Oral Sci.* 1, 234-8.
- Ventura, R., Harris, K.M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes, *J. Neurosci.* 19, 6897-6906.
- Verkhratsky, A., Orkand, R.K., Kettenmann, H. (1998). Glial calcium: homeostasis and signalling function. *Physiol. Rev.* 78, 99-141.
- Virchow, R. (1846) Ü ver das granulierte ansehen der wandugen der gerhirnventrikel. *Allg. Z. Phychiatr.* 3, 242.
- Volterra, A., Bezzi, P. (2002). The Tripartite Synapse: Glia In Synaptic Transmission eds. Volterra, A., Magistretti, P.J., and Haydon, P.G. (Oxford University Press, New York), pp. 164-184.
- Volterra, A., Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626-640.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Möller, T., Stella, N. (2002). Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem* 277, 20869-20876
- Walter, L., Stella, N. (2003). Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia* 44, 85-90.

Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T., Nedergaard, M. (2006). Astrocytic  $Ca^{2+}$  signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* 9, 816 – 823.

Wilson, R.I., Nicoll, R.A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588-592.

Wilson, R.I., Nicoll, R.A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678-682.

Zhang, J., Wang, H., Ye, C., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z., Wu, C., Poo, M., Duan, S. (2003). ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40, 971-982.

Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., Bonner, T.I. (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5780-5785.

**VIII. SEPARATA**

# Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication

Marta Navarrete<sup>1</sup> and Alfonso Araque<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 28002, Spain

\*Correspondence: [araque@cajal.csic.es](mailto:araque@cajal.csic.es)

DOI 10.1016/j.neuron.2008.01.029

## SUMMARY

Cannabinoid receptors play key roles in brain function, and cannabinoid effects in brain physiology and drug-related behavior are thought to be mediated by receptors present in neurons. Neuron-astrocyte communication relies on the expression by astrocytes of neurotransmitter receptors. Yet, the expression of cannabinoid receptors by astrocytes in situ and their involvement in the neuron-astrocyte communication remain largely unknown. We show that hippocampal astrocytes express CB1 receptors that upon activation lead to phospholipase C-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from internal stores. These receptors are activated by endocannabinoids released by neurons, increasing astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  levels, which stimulate glutamate release that activates NMDA receptors in pyramidal neurons. These results demonstrate the existence of endocannabinoid-mediated neuron-astrocyte communication, revealing that astrocytes are targets of cannabinoids and might therefore participate in the physiology of cannabinoid-related addiction. They also reveal the existence of an endocannabinoid-glutamate signaling pathway where astrocytes serve as a bridge for nonsynaptic interneuronal communication.

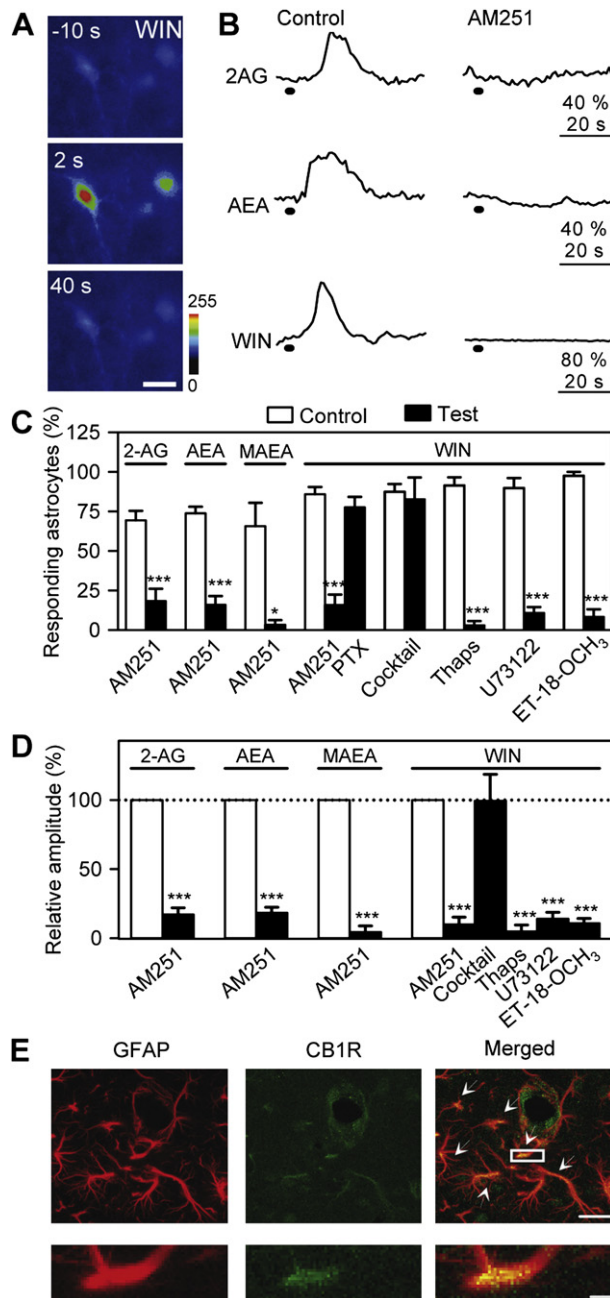
## INTRODUCTION

Recent evidence has demonstrated the existence of bidirectional communication between astrocytes and neurons (Araque et al., 2001; Haydon and Carmignoto, 2006; Nedergaard et al., 2003; Volterra and Bezzi, 2002). Astrocytes respond with intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations to neurotransmitters released by synaptic terminals (Perea and Araque, 2005; Porter and McCarthy, 1996) and, in turn, modulate neuronal excitability and synaptic transmission by releasing neuroactive substances called gliotransmitters (Araque et al., 1999; Beattie et al., 2002; Perea and Araque, 2007; Volterra and Bezzi, 2002). Neuron-to-astrocyte communication is based on the expression by astrocytes of different neurotransmitter receptors that, in many cases, are coupled to second messenger pathways that upon activation lead to mobilization of  $\text{Ca}^{2+}$  from the intracellular stores. The presence of cannabinoid receptors in astrocytes is controversial

(for a review see Stella, 2004). While some studies did not detect cannabinoid effects on astrocytes, cannabinoid receptors have been ultrastructurally localized in astrocytes of the caudate putamen nucleus (Rodríguez et al., 2001) and the dorsal horn of the spinal cord (Salio et al., 2002), and several studies have shown their presence in cultured glial cells (Molina-Holgado et al., 2003; Stella, 2004; Walter and Stella, 2003). Consequently, the expression of functional cannabinoid receptors by astrocytes in situ remains poorly defined, and their involvement in the neuron-astrocyte communication is unknown.

The endocannabinoid system is an important intercellular signaling system involved in a wide variety of physiological processes. It consists of cannabinoid receptors, endogenous transmitters (called endocannabinoids), and the enzymatic machinery for their synthesis, release, and degradation. Two types of cannabinoid receptors, termed CB1Rs and CB2Rs, have been characterized, and the existence of additional receptors has been suggested (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). While CB2Rs are mainly expressed by cells of the immune system, CB1Rs are highly expressed in many brain regions, where they play relevant neuromodulatory roles in brain physiology (Chevalleyre et al., 2006; Freund et al., 2003; Rodríguez et al., 2001). CB1Rs mediate retrograde inhibition of transmitter release, control neuronal excitability, and regulate short- and long-term synaptic plasticity (Alger, 2002; Chevalleyre et al., 2006; Freund et al., 2003; Kreitzer and Regehr, 2002; Wilson and Nicoll, 2002). Furthermore, these receptors are responsible for most of the psychotropic and behavioral effects of cannabinoids (Maldonado et al., 2006; Di Marzo et al., 2004). Cannabinoid effects in brain physiology are thought to be mediated by CB1Rs exclusively present in neurons. Indeed, numerous studies have focused on the CB1 expression by different subpopulations of neurons in different brain areas, but the possible functional expression of cannabinoid receptors by astrocytes in situ has been largely disregarded.

The identification of all of the cellular mechanisms involved in cannabinoid signaling is essential for a full understanding of its cellular bases and physiological consequences. Therefore, we used electrophysiological and  $\text{Ca}^{2+}$  imaging techniques in mice brain slices to investigate the functional expression of cannabinoid receptors by hippocampal astrocytes and their participation in the neuron-astrocyte communication. We found that hippocampal astrocytes express functional CB1Rs, which upon activation lead to phospholipase C-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from internal stores. These receptors can be activated by endocannabinoids released from pyramidal neurons, increasing the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  levels and stimulating the release of glutamate,



**Figure 1. Cannabinoid Receptor Activation Increases Ca<sup>2+</sup> Levels in Astrocytes**

(A) Pseudocolor images representing fluorescence intensities of a fluo-4-filled hippocampal astrocyte of CA1 stratum radiatum 10 s before and 2 and 40 s after local application of WIN delivered by pressure pulse from a micropipette. Scale bar, 15  $\mu$ m.

(B) Astrocytic Ca<sup>2+</sup> levels evoked by local application (horizontal bars) of 2AG, AEA, and WIN in control and 2  $\mu$ M AM251.

(C and D) Proportion of responding astrocytes and relative fluorescence changes induced by CB1R agonists in control (white bars) and test conditions (black bars). The cocktail contained TTX and glutamatergic, GABAergic, cholinergic, and purinergic receptor antagonists (see Results). Each bar,  $\geq 30$  astrocytes from  $n \geq 4$  slices. Error bars indicate SEM. Significant differences were established at \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

which signals back to neurons activating NMDARs, evoking slow inward current in pyramidal neurons.

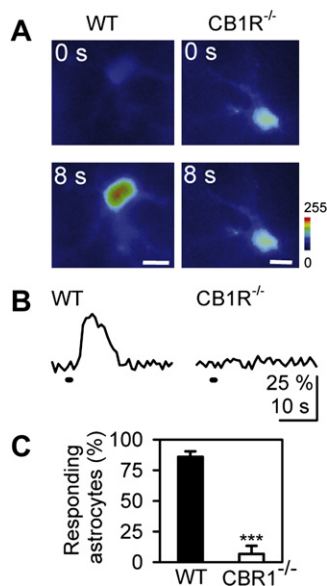
## RESULTS

### Hippocampal Astrocytes Express Functional Endocannabinoid Receptors that Mediate Intracellular Calcium Elevations

To investigate whether hippocampal astrocytes express functional endocannabinoid receptors, we recorded the intracellular Ca<sup>2+</sup> levels of astrocytes located in the stratum radiatum of the CA1 region and analyzed the responses to local application of endogenous as well as synthetic agonists of these receptors. Local application of 2-arachidonylglycerol (2AG), arachidonyl-ethanolamide (AEA), (R)-(+)-methanandamide (MAEA), or (R)-(+)-WIN 55,212-2 (WIN) by pressure pulses through a micropipette increased the intracellular Ca<sup>2+</sup> levels in 125 out of 169 astrocytes (from a representative sample of  $n = 21$  slices; Figures 1A–1C). The number of responding astrocytes and the relative fluorescence change evoked by the agonists were inhibited by the selective antagonist of CB1Rs, AM251 (2  $\mu$ M; Figures 1B–1D and Figure S1A available online), indicating that the observed Ca<sup>2+</sup> elevations were mediated by CB1R activation.

Astrocytic responses could be indirectly evoked by CB1R agonists because CB1Rs are largely present in glutamatergic and GABAergic synaptic terminals where they can inhibit synaptic transmitter release (Alger, 2002; Chevaleyre et al., 2006; Freund et al., 2003; Llano et al., 1991; Rodriguez et al., 2001). Therefore, we analyzed the astrocytic responses to the local application of the CB1R agonist WIN before and after blocking glutamatergic, GABAergic, cholinergic, and purinergic receptors with a cocktail containing CNQX (20  $\mu$ M; for AMPA and kainate glutamate receptors), AP5 (50  $\mu$ M; for NMDA glutamate receptors), MPEP (50  $\mu$ M; for metabotropic glutamate receptors mGluR5), LY367385 (100  $\mu$ M; for metabotropic glutamate receptors mGluR1), picrotoxin (50  $\mu$ M; for GABA<sub>A</sub> receptors), saclofen (100  $\mu$ M; for GABA<sub>B</sub> receptors), atropine (50  $\mu$ M; for muscarinic cholinergic receptors), CPT (10  $\mu$ M; for A1 adenosine receptors), and suramin (100  $\mu$ M; for P2 purinergic receptors). The cocktail also contained TTX (1  $\mu$ M) to prevent action potential-mediated neurotransmitter release. The proportion of responding astrocytes and the amplitude of the WIN-evoked Ca<sup>2+</sup> elevations were not significantly affected by the cocktail of receptor antagonists, suggesting that the observed responses were directly mediated by CB1R activation in astrocytes. Furthermore, Ca<sup>2+</sup> elevations in response to WIN were absent in 27 out of 30 astrocytes tested in five hippocampal slices from transgenic mice lacking CB1R expression (Zimmer et al., 1999) (Figure 2). These astrocytes were able to respond with Ca<sup>2+</sup> elevations to ATP application, indicating that transmitter receptor-mediated Ca<sup>2+</sup>

(E) Immunocytochemical localization of GFAP and CB1R in stratum radiatum hippocampal astrocytes. Top images show staining for GFAP and CB1R and their colocalization (left to right). The astrocytic process marked with a box in the merged image was magnified (bottom images). Images were obtained by laser-scanning confocal microscopy constructed from a stack of four successive images (1  $\mu$ m deep). Scale bars, 20 and 3  $\mu$ m (top and bottom, respectively).



**Figure 2. Astrocyte Ca<sup>2+</sup> Levels Are Unaffected by Cannabinoids in CB1R<sup>-/-</sup> Mice**

(A) Pseudocolor images representing fluorescence intensities of fluo-4-filled astrocytes in hippocampal slices from wild-type and CB1R<sup>-/-</sup> mice before and 8 s after local application of WIN. Scale bars, 7  $\mu$ m.

(B) Astrocyte Ca<sup>2+</sup> levels evoked by local application of WIN (horizontal bars), in wild-type and CB1R<sup>-/-</sup> mice.

(C) Proportion of responding astrocytes to WIN application in wild-type and CB1R<sup>-/-</sup> mice. Each bar,  $\geq 30$  astrocytes from  $n \geq 8$  slices. Error bars indicate SEM. Significant differences were established at \*\*\* $p < 0.001$ .

mobilization was not impaired in astrocytes from CB1<sup>-/-</sup> mutant mice (22 out of 23 astrocytes; data not shown). This result confirms that CB1Rs were responsible for the observed astrocytic Ca<sup>2+</sup> elevations.

Astrocytes express a wide variety of receptors for many neurotransmitters, and some of them are coupled to different G proteins (Porter and McCarthy, 1997). CB1Rs are mainly coupled to pertussis toxin (PTX)-sensitive G<sub>i/o</sub> proteins that regulate cAMP levels. In addition, a recent report indicates that these receptors can also be coupled to G<sub>q/11</sub> proteins that activate PLC (Lauckner et al., 2005). We used pharmacological tools to investigate the intracellular signaling pathway involved in the CB1R-mediated astrocytic responses. First, we investigated the nature of the G protein involved by incubating the slices with 7.5  $\mu$ g/ml PTX for 4–8 hr and analyzing the astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal. To assess the effectiveness of PTX treatment, we first applied GABA, which evokes Ca<sup>2+</sup> elevations mediated by GABA<sub>B</sub> receptors (Kang et al., 1998; Serrano et al., 2006), which are known to be coupled to G<sub>i/o</sub> proteins (Catsicas and Mobbs, 2001). GABA-evoked Ca<sup>2+</sup> elevations regularly observed in control slices (21 out of 38 astrocytes from seven slices) were absent in 24 out of 29 astrocytes from four slices pretreated with PTX (data not shown). In contrast, in those PTX-treated slices, the proportion of astrocytes that responded with Ca<sup>2+</sup> elevations to local application of WIN was similar to control slices (Figure 1C), indicating that CB1R-induced astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal was not mediated by PTX-sensitive G proteins.

Next, we analyzed the participation of the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by perfusing the slices with thapsigargin, which depletes them by inhibiting the Ca<sup>2+</sup> ATPase (Araque et al., 1998). After control recordings, the slices were perfused with 1  $\mu$ M thapsigargin for 30–45 min. The WIN-evoked astrocytic Ca<sup>2+</sup> elevations were diminished by thapsigargin (Figure 1C), indicating that they require the presence of intact intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. The PLC antagonists U73122 (4  $\mu$ M) and ET-18-OCH3 (15  $\mu$ M) also decreased the WIN-evoked Ca<sup>2+</sup> elevations (Figure 1D), indicating that Ca<sup>2+</sup> elevations evoked by cannabinoids in astrocytes are mediated by CB1Rs that activate PLC, probably through a G<sub>q/11</sub> protein, and mobilize Ca<sup>2+</sup> from internal stores.

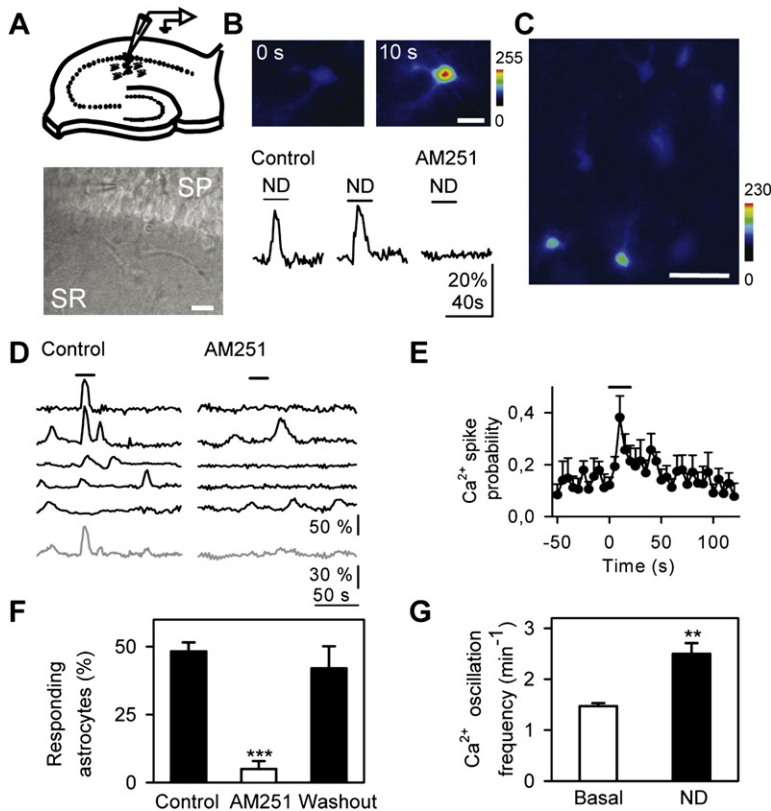
Besides the functional expression of CB1Rs in astrocytes, to obtain morphological evidence of CB1R presence in astrocytes, we performed immunocytochemical analysis using antibodies against CB1Rs and GFAP (a specific marker of astrocytes). CB1R signal could be observed in astrocytic processes identified by their GFAP staining in stratum radiatum hippocampal astrocytes (Figure 1E).

### Astrocytes Respond with Intracellular Calcium Elevations to Neuronal Depolarization

Hippocampal pyramidal neurons are known to be a source of endocannabinoids that can be released under different experimental conditions, such as neuronal depolarization or postsynaptic metabotropic glutamate receptor activation (Alger, 2002; Chevaleyre et al., 2006; Kreitzer and Regehr, 2002). We therefore investigated whether the CB1R-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> signal in astrocytes can be endogenously evoked by endocannabinoids released from CA1 pyramidal neurons. We electrophysiologically recorded CA1 pyramidal neurons, monitored Ca<sup>2+</sup> levels in adjacent astrocytes (within a 150  $\mu$ m wide region perpendicular to the stratum pyramidale), and depolarized the neuron to 0 mV to stimulate endocannabinoid release (Chevaleyre and Castillo, 2003; Kreitzer and Regehr, 2001; Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson and Nicoll, 2001).

In relatively quiescent astrocytes, neuronal depolarization (ND) evoked a slow, transient Ca<sup>2+</sup> elevation in adjacent astrocytes (17 out of 31 astrocytes from four slices; see Movie S1). These astrocytic responses could be reliably evoked by successive neuronal stimuli and were reversibly abolished by 2  $\mu$ M AM251 ( $n = 13$ ; Figure 3B). Most hippocampal astrocytes display spontaneous Ca<sup>2+</sup> oscillations that can be modulated by different neurotransmitters (Nett et al., 2002; Perea and Araque, 2005). We therefore analyzed the effects of neuronal depolarization (ND) on the Ca<sup>2+</sup> signal of several astrocytes in the field of view (from 8 to 14 astrocytes), quantifying two parameters, i.e., the probability of occurrence of a Ca<sup>2+</sup> elevation (Ca<sup>2+</sup> spike) and the mean frequency oscillation 50 s before (basal) and after the onset of the ND (Figures 3C–3G). In 11 hippocampal slices, 49%  $\pm$  4% of the astrocytes increased their Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency after neuronal depolarization (Figures 3F and 3G), while the relative mean amplitudes of the Ca<sup>2+</sup> elevations were unchanged (mean amplitude of the Ca<sup>2+</sup> signal during ND was 86.1%  $\pm$  13.1% relative to corresponding basal amplitudes). Furthermore, the Ca<sup>2+</sup> spike probability was transiently increased by ND ( $n = 7$ ; Figure 3E). These effects could be consistently evoked by successive neuronal stimuli (Figure 4A) and depended on the





**Figure 3. Neuronal Depolarization Increases Ca<sup>2+</sup> Signal in Hippocampal Astrocytes**

(A) Schematic drawing and infrared differential interference contrast image showing the stratum radiatum (SR) and the recorded neuron in the stratum pyramidale (SP). Scale bar, 20  $\mu$ m.

(B) (Top) Pseudocolor images representing astrocyte fluorescence intensities before and after neuronal depolarization (ND); (bottom) astrocyte Ca<sup>2+</sup> levels evoked by ND (horizontal bars) in control and AM251. Scale bar, 15  $\mu$ m.

(C) Pseudocolor image of a representative field of view showing eight hippocampal astrocytes in the stratum radiatum. Scale bar, 40  $\mu$ m.

(D) Ca<sup>2+</sup> levels from five astrocytes in a field of view and corresponding average traces (gray) in control and AM251. Horizontal bars indicate ND.

(E) Astrocyte Ca<sup>2+</sup> spike probability versus time ( $n = 7$  slices). Time 0 corresponds to the beginning of the ND.

(F) Relative number of astrocytes that increased their Ca<sup>2+</sup> oscillation by ND in control, AM251, and after washout ( $n = 37$  astrocytes from four slices).

(G) Mean Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency before (basal) and after ND. Error bars indicate SEM. Significant differences were established at \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

depolarizing pulse duration (Figures S1B and S1C). Taken together, these results indicate that neuronal depolarization modulates the Ca<sup>2+</sup> signal of adjacent astrocytes, evoking intracellular Ca<sup>2+</sup> elevations in relatively silent astrocytes, increasing the oscillation frequency of oscillating astrocytes, and increasing the probability of occurrence of Ca<sup>2+</sup> elevations.

Interestingly, while most astrocytes showed Ca<sup>2+</sup> elevations upon exogenous local stimulation with cannabinoids (85.8%  $\pm$  4.5% of 42 astrocytes from six slices, see Figure 1), astrocytic Ca<sup>2+</sup> signal modulation by ND was observed in a subset of astrocytes (49.2%  $\pm$  4.0% of 105 astrocytes from 11 slices). However, astrocytes consistently responded or not to the successive stimulation of a given neuron, i.e., astrocytes responding to the first ND also responded to the second ND, while nonresponding astrocytes to the first stimulus did not respond to the second ND either (Figure 4B). Furthermore, nonresponding astrocytes to ND were able to respond with Ca<sup>2+</sup> elevations upon exogenous stimulation with WIN (16 out of 18 astrocytes from four slices; data not shown). These results indicate that astrocytic responses did not result from a wide spillover of endocannabinoids and suggest the existence of intercellular signaling endocannabinoid pathways between neurons and astrocytes.

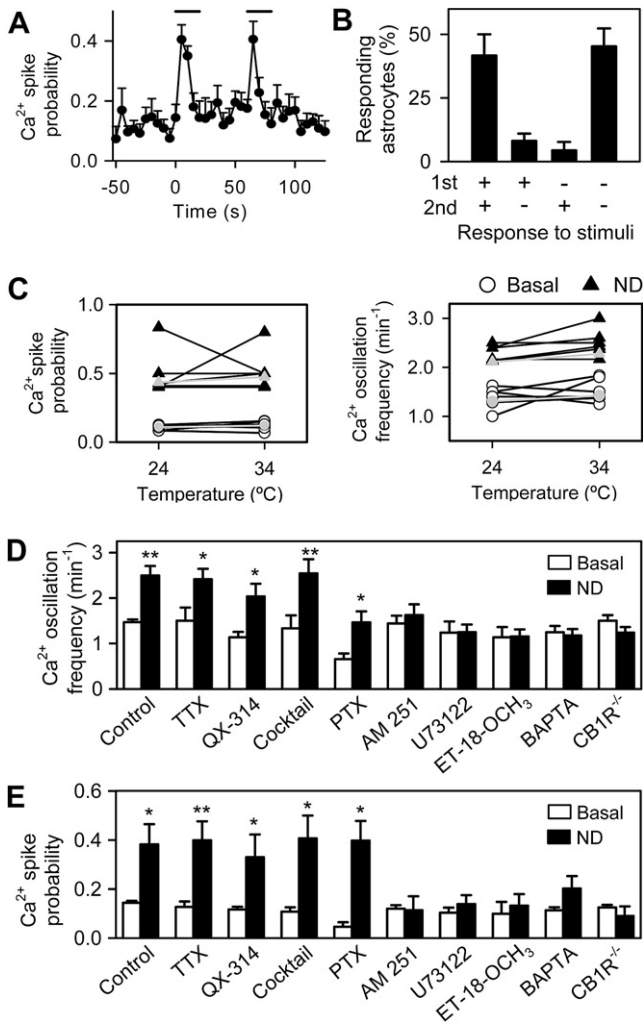
Because endocannabinoid signaling might be affected by temperature (Kreitzer et al., 2002), we investigated whether astrocytic responses to endocannabinoids were also present at more physiological temperature (34°C). The increase of the Ca<sup>2+</sup> spike probability and the Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency evoked

by ND, as well as the proportion of responding astrocytes (55%  $\pm$  3% at 24°C and 57%  $\pm$  6% at 34°C), were not significantly different at 24°C and 34°C ( $n = 48$  astrocytes from six slices) (Figure 4C), indicating that endocannabinoid-mediated neuron-astrocyte signaling occurs under physiological conditions.

### Endocannabinoids Released by Pyramidal Neurons Evoke Astrocyte Calcium Elevations

To investigate the cellular mechanisms involved in the ND-evoked astrocytic Ca<sup>2+</sup> elevation, we compared the astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal parameters (i.e., Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency and probability of Ca<sup>2+</sup> elevation) before and after different pharmacological treatments (Figures 4D and 4E). The ND-evoked increase of the astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal was not prevented in the presence of TTX or after dialyzing the stimulating neuron with QX-314, which intracellularly blocks voltage-gated Na<sup>+</sup> currents, suggesting that the observed effects of ND were not due to action potential-mediated neural network activation. Consistent with results obtained by local application of CB1R agonists, ND-evoked increases in both Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency and Ca<sup>2+</sup> elevation probability were unaffected in the presence of the cocktail of neurotransmitter receptor antagonists, but they were abolished by the CB1R antagonist AM251 (2  $\mu$ M). In agreement with these results, modulation of the astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal by ND was not observed in slices from CB1R<sup>-/-</sup> transgenic mice ( $n = 34$  astrocytes from five slices; Figures 4D and 4E), indicating that the increase of the astrocyte Ca<sup>2+</sup> oscillations evoked by ND was selectively mediated by CB1R activation.

To investigate the intracellular signaling pathway involved, we incubated the slices with 7.5  $\mu$ g/ml PTX. After assessing the effectiveness of PTX treatment by confirming the absence of astrocyte



**Figure 4. Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  Elevations Evoked by Neuronal Depolarization Are Mediated by CB1R Activation**

(A) Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability evoked by successive ND (horizontal bars) ( $n = 37$  astrocytes from four slices).

(B) Proportion of astrocytes that responded to two successive ND. Note that almost all of the astrocytes either responded (+) or not (-) to the first and second stimuli ( $n = 123$  astrocytes from ten slices).

(C) Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability and  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency before (basal; open symbols) and after neuronal depolarization (ND; filled symbols) at  $24^\circ\text{C}$  and  $34^\circ\text{C}$  (48 astrocytes from six slices). Gray symbols indicate mean values.

(D and E) Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency and  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability, respectively, before (basal; white bars) and after neuronal depolarization (ND; black bars) in control and test conditions ( $n \geq 5$  slices for each bar). Error bars indicate SEM. Significant differences were established at  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ .

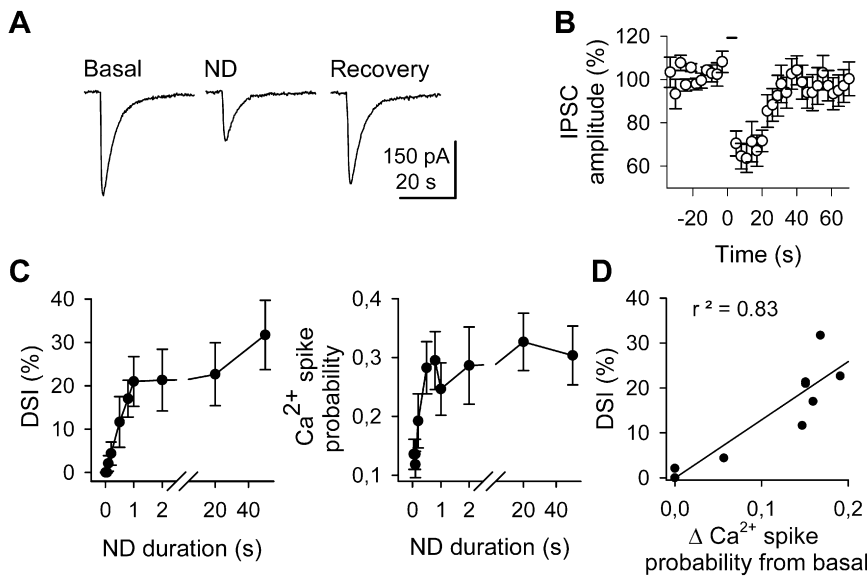
$\text{Ca}^{2+}$  elevations in response to ionophoretical application of GABA (31 out of 36 astrocytes from five slices did not respond to GABA; data not shown), we tested the effects of ND on the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. Although a slight reduction of the basal oscillation frequency was observed in PTX-treated slices (probably due to the deleterious effects of PTX on cellular viability), both

the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency and the  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability were significantly increased after neuronal depolarization (Figures 4D and 4E). In contrast, the PLC antagonists U73122 ( $4 \mu\text{M}$ ) and ET-18-OCH<sub>3</sub> ( $15 \mu\text{M}$ ) abolished the astrocytic response to ND. Taken together, these results indicate that the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked in astrocytes by ND are mediated by CB1R activation that stimulates PLC.

We then investigated whether the ND-induced increase of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal was mediated by endocannabinoids released from pyramidal neurons. Neuronal depolarization stimulates the release of endocannabinoids, which transiently reduces inhibitory transmitter release by activation of presynaptic CB1Rs, a process known as depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) (for review see Alger 2002; Freund et al., 2003; Chevaleyre et al., 2006). Using DSI as bioassay for endocannabinoid release, we compared the effects of ND on the DSI in neurons and the  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability in astrocytes by simultaneously recording inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) from pyramidal neurons and astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  levels (Figures 5A and 5B). Increasing the duration of the ND induced a gradual increase of both the proportion of DSI and the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability (Figures 5C and 5D). Both parameters showed a high degree of correlation ( $r^2 = 0.83$ ). These results suggest that astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal results from endocannabinoids released from pyramidal neurons and indicate that endocannabinoids are similarly effective in inducing neuronal and astrocytic effects.

Because endocannabinoid release by neuronal depolarization requires the increase of neuronal intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Chevaleyre and Castillo, 2003; Kreitzer and Regehr, 2001; Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson and Nicoll, 2001), to further test the idea that astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were induced by endocannabinoids released by neurons, we selectively manipulated the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in the pyramidal neuron. First, we performed paired whole-cell recordings from two adjacent pyramidal neurons (Figures 6A and 6B). One recording pipette included the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA ( $20 \text{ mM}$ ) to prevent  $\text{Ca}^{2+}$  rises in one pyramidal neuron, while the other neuron, filled with standard intracellular solution, was used as a control. While depolarization of the control neuron increased both the  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability and the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency in astrocytes, depolarization of the BAPTA-filled neuron did not affect the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal (Figure 6B). Second, in another set of experiments, the recorded neuron was loaded through the recording pipette with the  $\text{Ca}^{2+}$ -cage NP-EGTA to selectively increase its  $\text{Ca}^{2+}$  levels after UV-flash photolysis stimulation. These experiments were performed in the presence of TTX to prevent action potential-evoked neurotransmitter release. UV-flash stimulation elevated neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  and increased the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability (Figures 6C–6F). In the absence of NP-EGTA-loaded neurons, UV-flashes did not modify astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  levels (Figure 6F), indicating that the effects were not due to direct photostimulation of astrocytes.

Taken together, these results indicate that  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in pyramidal neurons are necessary and sufficient to induce  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes and further support the idea that the CB1R-mediated astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  responses to ND were evoked by endocannabinoids released from pyramidal neurons.



**Figure 5. Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  Elevations and Endocannabinoid-Mediated DSI Depended on ND Duration**

(A) IPSCs before (basal), 3 s after ND, and 20 s later (recovery).

(B) Mean relative IPSC amplitudes ( $n = 6$  neurons). Zero time corresponds to ND (for 5 s; horizontal bar).

(C) Simultaneously recorded DSI and astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability evoked at different ND duration ( $n \geq 5$  for each point). Error bars indicate SEM.

(D) Corresponding plot of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability change from basal versus DSI. Points were fitted to a linear regression (straight line;  $r^2 = 0.83$ ).

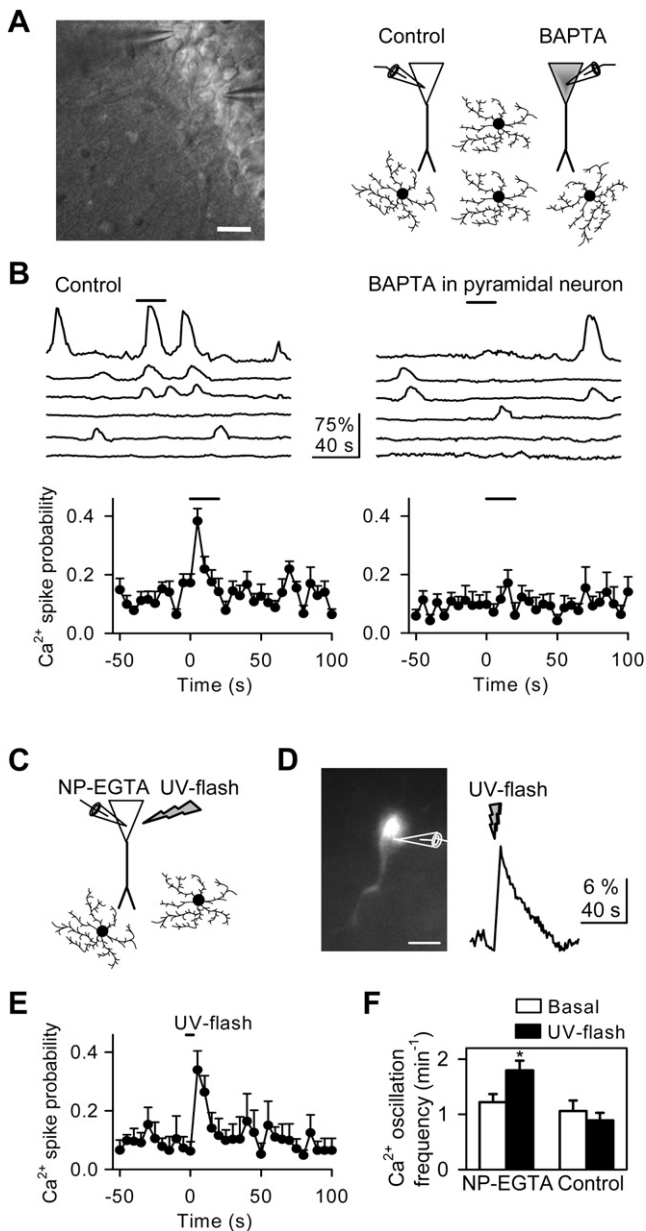
### CB1R-Mediated Calcium Elevations in Astrocytes Evoke Glutamate-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons

We next investigated the physiological consequences of the endocannabinoid-mediated astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevations on neuronal excitability. Recent reports indicate that exogenous experimental stimuli (extracellular application of ATP or the mGluR agonist DHPG, astrocytic depolarization, or photorelease of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  from  $\text{Ca}^{2+}$ -caged compounds) that elevate intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in astrocytes induce glutamate-mediated slow inward currents (SICs) in adjacent neurons (Angulo et al., 2004; Araque et al., 1998; Fellin et al., 2004; Perea and Araque, 2005). We then asked whether endocannabinoids released by pyramidal neurons may serve as endogenous signals that, by elevating the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$ , stimulate the release of glutamate from astrocytes. We simultaneously recorded whole-cell currents from two nearby pyramidal neurons as well as the  $\text{Ca}^{2+}$  levels from adjacent astrocytes, in the presence of the cocktail containing neurotransmitter receptor antagonists (except AP5) and TTX and in the absence of extracellular  $\text{Mg}^{2+}$  to maximize NMDAR activation. Because the observation of SICs during neuronal depolarization was prevented in the stimulating neuron, currents were analyzed in the nonstimulated neuron. Under these conditions, pyramidal neurons displayed a basal frequency of SICs of  $1.3 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$  (mean SIC amplitude:  $34 \pm 4 \text{ pA}$ ;  $n = 36$ ; cf. Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Perea and Araque, 2005). Depolarization of one pyramidal neuron (to 0 mV for 20 s) increased the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency in astrocytes and concomitantly increased the frequency of SICs in the adjacent neuron (Figure 7). SICs were totally abolished by 50  $\mu\text{M}$  AP5, confirming that they were due to NMDAR activation (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Perea and Araque, 2005), while the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency increase was unaffected. In contrast, the ND-evoked frequency increase of both  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and SICs were prevented by 2  $\mu\text{M}$  AM251, which did not significantly modify their basal frequency. In the presence of extracellular  $\text{Mg}^{2+}$ , the frequency of SICs, detected as AP5-sensitive outward currents at

depolarized membrane potentials ( $>30 \text{ mV}$ ), was also increased after ND (from  $1.4 \pm 0.4$  to  $3.1 \pm 0.6$ ;  $n = 4$ ; Figure 7E), indicating that this phenomenon also occurs under normal extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations. Altogether, these results indicate that CB1R-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes are required for the SIC frequency increase induced by neuronal depolarization.

Therefore, we hypothesized that these effects were due to stimulation of endocannabinoid release by neuronal depolarization. To test this hypothesis, we included BAPTA in one of the recording pipettes to prevent  $\text{Ca}^{2+}$  rises and endocannabinoid release from one neuron, while the other neuron remained as a control. Depolarization of the control neuron increased the frequency of both astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and SICs in the adjacent neuron. In contrast, depolarization of the BAPTA-filled neuron did not significantly modify the basal frequency of both parameters (Figure 7D).

To test whether endocannabinoid-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes are necessary to stimulate glutamate release and increase the frequency of SICs, we analyzed the effects of depleting the internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores with thapsigargin. We first tested whether ND-evoked endocannabinoid release still occurred after 30 min incubation with 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin by recording IPSCs to monitor the amount of DSI, as indicative of endocannabinoid release. DSI could be observed in thapsigargin (although with a relatively smaller amplitude than in control; cf. Isokawa and Alger, 2006), indicating that ND-evoked endocannabinoid release was not prevented by thapsigargin (Figure 8A). Then, in parallel experiments, we simultaneously recorded whole-cell currents from two pyramidal neurons and  $\text{Ca}^{2+}$  signals from astrocytes. The ND-evoked increase of both astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability and frequency of SICs observed in control conditions, were abolished after incubation with thapsigargin (Figures 8B and 8C). These results indicate that endocannabinoid release from neurons requires astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations to stimulate glutamate release from astrocytes and increase the frequency of SICs in pyramidal neurons.



**Figure 6. Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  Elevations Are Mediated by Endocannabinoids Released from Pyramidal Neurons**

(A) Infrared differential interference contrast image and schematic drawing showing simultaneous recording from two pyramidal neurons. One recording pipette included 40 mM BAPTA to prevent  $\text{Ca}^{2+}$  rises in one pyramidal neuron, while the other neuron was filled with standard intracellular solution (Control). Scale bar, 25  $\mu\text{m}$ .

(B) Representative traces of  $\text{Ca}^{2+}$  levels from six astrocytes in a typical field of view (top) and astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability (bottom) before and after depolarization (horizontal bars) of control and BAPTA-filled neurons (left and right, respectively) ( $n = 9$  slices).

(C) Schematic drawing.

(D) (Left) Image showing fluorescence intensities of NP-EGTA and fluo-4-filled neuron in stratum pyramidale. Scale bar, 15  $\mu\text{m}$ . (Right) Neuron  $\text{Ca}^{2+}$  levels evoked by UV-flash stimulation in the soma.

(E) Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability versus time ( $n = 6$  slices). Zero time corresponds to the beginning of UV-flash stimulation (horizontal bar).

Taken together, these results indicate that depolarization of neurons stimulates the release of endocannabinoids, which activate CB1Rs in astrocytes, elevating their intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and inducing the release of glutamate, which in turn serves as a feedback signal activating NMDARs in neurons.

## DISCUSSION

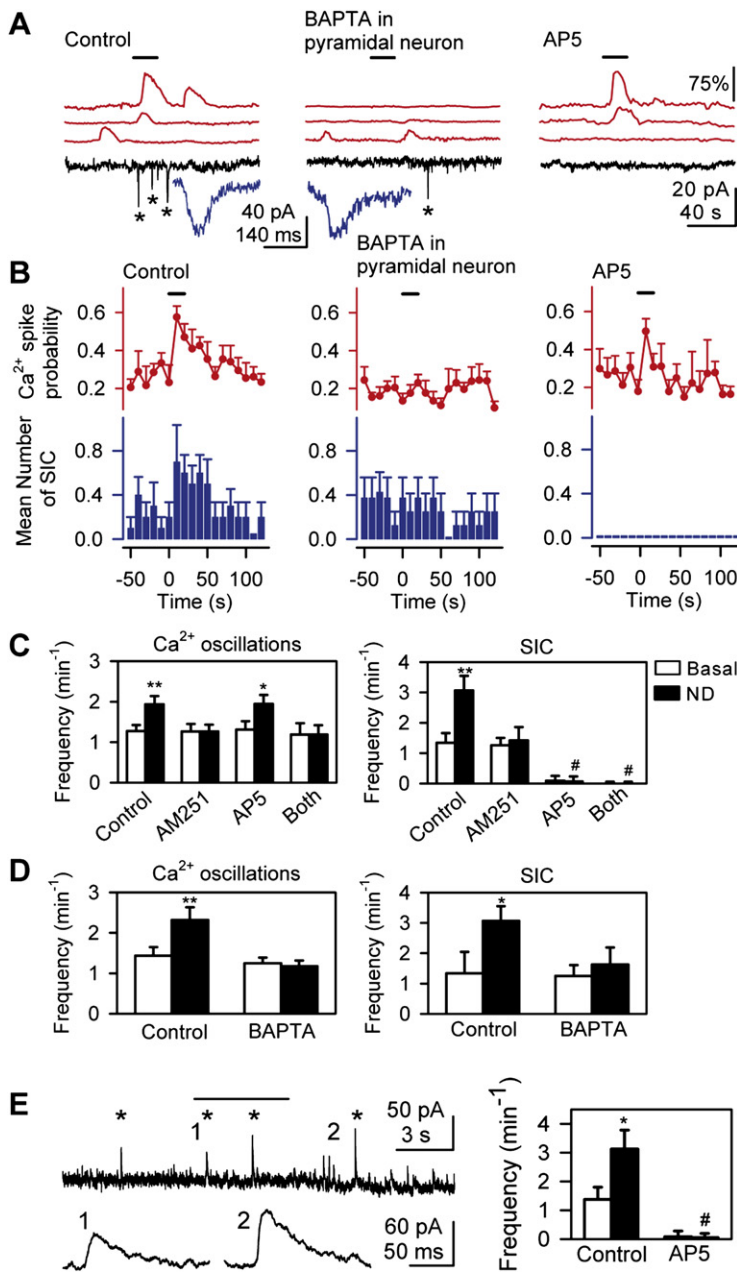
The expression of CB1Rs by different neuronal populations is well documented (for reviews see Freund et al., 2003; Piomelli, 2003). However, their expression by astrocytes both in culture and in situ is controversial (e.g., see Stella, 2004). The reported experimental discrepancies may arise from the well-known phenotypic changes of astrocytes in different culture conditions. Nevertheless, although ultrastructural studies detected CB1Rs in astrocytes of specific brain areas (Rodriguez et al., 2001; Salio et al., 2002) and several studies showed CB1Rs in cultured glial cells (Molina-Holgado et al., 2003; Stella, 2004; Walter and Stella, 2003), their functional expression by astrocytes in situ remained unclear. Here we show that hippocampal astrocytes in situ express functional CB1Rs that can play a relevant role in intercellular signaling in the nervous system.

CB1Rs belong to the G protein-coupled seven-transmembrane receptor (GPCR) superfamily (Matsuda et al., 1990). They are preferentially coupled to PTX-sensitive  $\text{G}_{i/o}$  proteins (Mackie and Hille, 1992; Piomelli, 2003), and they can activate PLC in a PTX-sensitive manner mediated by the  $\text{G}_{i/o}$   $\beta\gamma$  subunits (Filipeanu et al., 1997; Lograno and Romano, 2004; Netzeband et al., 1999; Sugiura et al., 1997). Furthermore, Lauckner et al. (2005) have reported that CB1Rs can also be coupled to  $\text{G}_{q/11}$  proteins in an agonist-specific manner, because WIN, but no other agonists, activated  $\text{G}_{q/11}$  and PLC in HEK293 transfected cells and cultured neurons, challenging the classical idea that GPCRs specifically interact with certain types of G proteins. These authors hypothesized that CB1 interaction with  $\text{G}_{q/11}$  proteins may occur under different conditions, such as during agonist-dependent conformation stabilization of receptors, at elevated receptor occupancy, or when the ratio between  $\text{G}_{q/11}$  and  $\text{G}_{i/o}$  proteins is high. If such is the case, present results suggest that interaction of CB1Rs with  $\text{G}_{q/11}$  proteins may be more favored in astrocytes than in neurons. Moreover, the present demonstration that CB1R activation by endocannabinoids leads to  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization through activation of PLC in a PTX-insensitive manner indicates that CB1Rs can be naturally coupled to  $\text{G}_{q/11}$  proteins and suggests that the promiscuity of GPCRs and G proteins may be a general phenomenon with physiological bases and consequences.

Several studies have shown the prominent role of CB1Rs triggering different intracellular signaling cascades other than intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations (see Chevaleyre and Castillo, 2003; Freund et al., 2003; Kreitzer and Regehr, 2002). Furthermore, CB1Rs can evoke  $\text{Ca}^{2+}$  rises by either activation of  $\text{G}_{i/o}$   $\beta\gamma$  proteins (Filipeanu et al., 1997; Lograno and Romano, 2004; Netzeband et al., 1999; Sugiura et al., 1997), L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel

(F) Mean  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency before (basal) and after UV-flash stimulation of control or NP-EGTA-filled neurons. Error bars indicate SEM. Significant differences were established at  $*p < 0.05$ .





**Figure 7. Endocannabinoid-Induced Astrocyte Ca<sup>2+</sup> Elevations Evoke NMDAR-Mediated SICs in Pyramidal Neurons**

(A) Intracellular Ca<sup>2+</sup> levels from three astrocytes (red traces) and whole-cell currents from adjacent neurons (black and blue traces). The experimental arrangement is as in Figure 6A, i.e., in paired recordings, one neuron was filled with BAPTA, while the other neuron was filled with standard solution (Control). Horizontal bars indicate neuronal depolarization. Recordings were obtained during depolarization of the control neuron (Control), the BAPTA-filled neuron, and the control neuron in the presence of AP5. Asterisks indicate slow inward currents (SICs). Two SICs have been expanded (blue traces).

(B) Astrocyte Ca<sup>2+</sup> spike probability (red) and mean number of neuronal SICs (blue) before and after neuronal depolarization (horizontal bars) of the control neuron (left), the BAPTA-filled neuron (center), and the control neuron in AP5 (right) (18 paired recorded neurons from n = 9 slices).

(C) Frequency of astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations and SICs 50 s before (basal; white bars) and after neuronal depolarization (ND; black bars) of control neurons in control solution and in the presence of AM251, AP5, or both antagonists (n ≥ 5 slices for each bar).

(D) Frequency of astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations and SICs 50 s before (basal; white bars) and after ND (black bars) of control and BAPTA-filled neurons (n = 8 slices).

(E) Whole-cell currents from a pyramidal neuron recorded at +30 mV in the presence of TTX and extracellular Mg<sup>2+</sup>. SICs detected as outward currents are marked by asterisks, and two SICs have been expanded (lower traces). Frequency of SICs 50 s before (basal; white bars) and after neuronal depolarization (ND; black bars) in control solution and in the presence of AP5 (n = 4 slices for each bar). Error bars indicate SEM. Significant differences were established at \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and #p < 0.001.

these processes is an exciting hypothesis that deserves investigation.

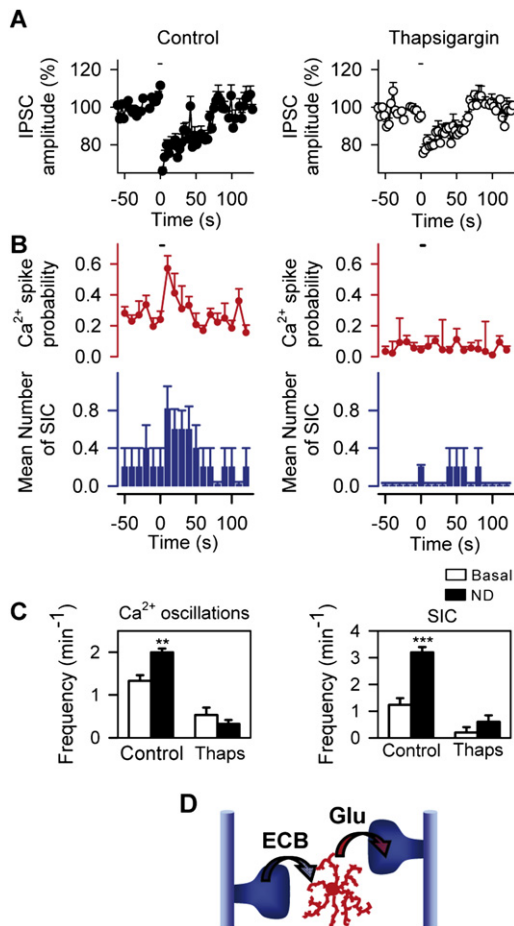
Because astrocyte-evoked SICs may influence neuronal excitability and synchronization (Angulo et al., 2004; Araque et al., 1998; Fellin et al., 2004), the endocannabinoid-induced astrocyte-mediated SICs may have a relevant physiological significance on neuronal activity. The fact that SICs are mediated by NMDA receptors, which require the depolarization of the postsynaptic neuron to open under physiological conditions, suggests that this astrocyte-neuron signaling needs the coincidence of neuronal and astrocytic activity.

modulation (Rubovitch et al., 2002), or agonist-specific activation of G<sub>q/11</sub> proteins (Lauckner et al., 2005). Here we have shown that CB1R activation causes astrocyte Ca<sup>2+</sup> elevations that evoke glutamate-mediated astrocyte-neuron signaling, revealing a physiological role for this CB1R-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling.

Endocannabinoid signaling plays important roles in synaptic function (Alger, 2002; Chevaleyre et al., 2006; Kreitzer and Regehr, 2002; Walter and Stella, 2003). Considering recent data demonstrating the relevance of neuron-astrocyte communication in brain physiology (Araque et al., 2001; Haydon, 2001; Haydon and Carmignoto, 2006; Nedergaard et al., 2003; Perea and Araque, 2007; Volterra and Meldolesi, 2005), whether endocannabinoid signaling between neurons and astrocytes is involved in

CB1Rs are known to mediate cannabinoid effects in drug-related behavior (Maldonado et al., 2006). These effects are thought to be mediated by the direct control of neural network activity. However, present evidence raise the possibility that direct activation of CB1Rs in astrocytes may be a primary cause involved in the cannabinoid effects. Hence, the fact that astrocytes express functional CB1Rs must be considered when interpreting the cellular basis of the behavioral effects of cannabinoids.

In conclusion, we provide evidence indicating that astrocytes express CB1Rs that upon activation by endocannabinoids released from pyramidal neurons lead to PLC-dependent Ca<sup>2+</sup> mobilization from internal stores. This endocannabinoid-induced



**Figure 8. Endocannabinoid-Induced Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  Elevations Are Necessary to Evoke SICs in Pyramidal Neurons**

(A) IPSC amplitude before and after 5 s ND in control (left) and 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin ( $n = 4$ ). Zero time corresponds to ND (horizontal bar).

(B) Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  spike probability (red) and mean number of neuronal SICs (blue) before and after neuronal depolarization (horizontal bars) in control (left) and 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin (ten paired recorded neurons from  $n = 5$  slices).

(C) Frequency of astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and SICs 50 s before (basal; white bars) and after ND (black bars) in control and thapsigargin ( $n = 5$  slices). Error bars indicate SEM. Significant differences were established at  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$ .

(D) Schematic drawing representing the endocannabinoid-mediated neuron-to-astrocyte signaling and the subsequent glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signaling.

astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal may signal back to neurons through the release of glutamate that activates NMDARs in pyramidal neurons. These results indicate that neurons and astrocytes communicate via endocannabinoid signaling and suggest the existence of intercellular communication pathways mediated by endocannabinoid-glutamate signaling where astrocytes serve as a bridge for interneuronal communication.

Present results reveal that astrocytes are cellular targets of cannabinoids, identifying these cells as cellular elements possibly involved in the physiology of cannabinoid addiction as well as potential targets for the treatment of cannabinoid-related drug abuse. Furthermore, considering the importance of the endo-

cannabinoid-mediated intercellular signaling in numerous processes of the nervous system, such as pain perception or learning and memory, present findings indicate that astrocytes may be actively involved in relevant phenomena of brain physiology.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Hippocampal Slice Preparation

Acute hippocampal slices were obtained as previously described (Araque et al., 2002; Perea and Araque, 2005). All the procedures for handling and sacrificing animals followed the European Commission guidelines (86/609/CEE) and were supervised by the Instituto Cajal veterinary officer. CD1 and C57BL/6 mice (12–17 days old) were anesthetized and then decapitated. The brain was rapidly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF). Brain slices (350–400  $\mu\text{m}$  thick) were cut with a Vibratome (Pelco 101, Series 1000, St Louis, MO) and incubated during >1 hr at room temperature (21°C–24°C) in ACSF. The ACSF contained (in mM) NaCl 124, KCl 2.69,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{MgSO}_4$  2,  $\text{NaHCO}_3$  26,  $\text{CaCl}_2$  2, and glucose 10 and was gassed with 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  (pH = 7.3). Slices were then transferred to an immersion recording chamber and superfused with gassed ACSF. In experiments designed to optimize NMDAR activation, the extracellular  $\text{Mg}^{2+}$  was equimolarly substituted by  $\text{Ca}^{2+}$ , and 10  $\mu\text{M}$  glycine was added. Cells were visualized under an Olympus BX50WI microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipped with infrared and differential interference contrast imaging devices and with a 40 $\times$  water-immersion objective. In some cases, slices from CB1 receptor knockout mice, generously donated by Dr. A. Zimmer, were used (Zimmer et al., 1999).

### Electrophysiology

Electrophysiological recordings of CA1 hippocampal pyramidal neurons and astrocytes were made using the whole-cell patch-clamp technique. Patch electrodes were fabricated from borosilicate glass capillaries and had resistances of 6–10 M $\Omega$  when filled with the internal solution that contained (in mM) KMeSO $_4$  100, KCl 50, HEPES 10, ATP- $\text{Na}_2$  4 (pH = 7.3). Recordings were obtained with PC-ONE amplifiers (Dagan Instruments, Minneapolis, MN). Fast and slow whole-cell capacitances were neutralized, series resistance was compensated (about 70%), and the membrane potential was held at  $-60$  mV, unless stated otherwise. Signals were fed to a Pentium-based PC through a DigiData 1320 interface board (Axon Instruments). pCLAMP 8 software (Axon Instruments) was used for stimulus generation, data display, acquisition, and storage. In some experiments, we performed paired whole-cell recordings from two CA1 pyramidal neurons (distance of the somas <100  $\mu\text{m}$ ). Astrocytes were identified according to morphological and electrophysiological criteria (e.g., Araque et al., 2002; Bergles et al., 2000; Bezzi et al., 1998; Pasti et al., 1997; Perea and Araque, 2005) (Figure S2). ND experiments started <30 min after entering whole-cell configuration. To test the ND effects on the SIC frequency, the number of SICs recorded from each neuron during 50 s periods before (basal) and after the onset of the ND were compared. To illustrate the time course of the effects of ND on the appearance of SICs in Figure 7B, the number of SICs were grouped in 5 s bins, and the mean number of SICs for each bin was calculated by averaging the values obtained from 16 paired recorded neurons from eight slices. Experiments were performed at room temperature (22°C–24°C), unless stated otherwise. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical differences were established by the Student's  $t$  test.

Synaptic currents recorded from pyramidal neurons were evoked using bipolar nichrome wire electrodes (80  $\mu\text{m}$  diameter) that were connected to a stimulator through isolation units (Grass S88, Quincy, MA) and placed in the stratum radiatum near the border of the CA1 pyramidal neurons. IPSCs were isolated in the presence of 20  $\mu\text{M}$  CNQX and 50  $\mu\text{M}$  AP5. Continuous stimuli were delivered at 0.3 Hz. DSI was quantified from the mean amplitude of three IPSCs after ND relative to the mean amplitude of 20 IPSCs before ND (basal). Only slices in which the recorded neuron showed DSI after 5 s ND were considered.

### Calcium Imaging

$\text{Ca}^{2+}$  levels in astrocytes located in the stratum radiatum of the CA1 region of the hippocampus were monitored by fluorescence microscopy using the  $\text{Ca}^{2+}$

indicator fluo-4 (Molecular Probes, Eugene, OR). Slices were incubated with fluo-4-AM (2–5  $\mu$ l of 2 mM dye were dropped over the hippocampus, attaining a final concentration of 2–10  $\mu$ M and 0.01% of pluronic) for 20–30 min at room temperature. Under these conditions, most of the cells loaded were astrocytes (Araque et al., 2002; Kang et al., 1998; Nett et al., 2002; Parri et al., 2001; Perea and Araque, 2005), as confirmed in some cases by their electrophysiological properties (see Figure S2). In some cases, Ca<sup>2+</sup> levels in single astrocytes were monitored by including fluo-4 in the recording pipette (Figures S2B and S2C). Astrocytes were imaged using a CCD camera (Retiga EX; Qimaging, Canada) attached to the Olympus microscope. Cells were illuminated during 200–500 ms with a xenon lamp at 490 nm using a monochromator Polychrome II (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Germany), and images were acquired every 0.5–2 s. The monochromator Polychrome II and the CCD camera were controlled and synchronized by the IP Lab software (BD Biosciences, MD) that was also used for quantitative epifluorescence measurements. Ca<sup>2+</sup> variations recorded at the soma of the cells were estimated as changes of the fluorescence signal over baseline ( $\Delta F/F_0$ ), and regions of interest were considered to respond to the stimulation when  $\Delta F/F_0$  increased three times the standard deviation of the baseline for at least two consecutive images and with a delay  $\leq$  15 s after the stimulation.

The astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal was quantified from the probability of occurrence of a Ca<sup>2+</sup> spike and the Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency. The Ca<sup>2+</sup> spike probability was calculated from the number of Ca<sup>2+</sup> elevations grouped in 5 s bins recorded from 6 to 14 astrocytes in the field of view. The time of occurrence was considered to be the onset of the Ca<sup>2+</sup> spike. The Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency was obtained from the number of Ca<sup>2+</sup> spikes occurring in 6 to 14 astrocytes in the field of view during 50 s periods before (basal) and after the onset of the neuronal depolarization. To test the effects of ND on Ca<sup>2+</sup> spike probability under different conditions, the respective mean basal (50 s before ND) and maximum Ca<sup>2+</sup> spike probability (i.e., 5–10 s after ND) from different slices were averaged and compared. Mean values were obtained from at least four slices in each condition.

#### UV-Flash Photolysis

In photostimulation experiments, pyramidal neurons were recorded with patch pipettes filled with the internal solution containing 50  $\mu$ M fluo-4 and 5 mM NP-EGTA. For Ca<sup>2+</sup> uncaging, train pulses (1 ms duration, 6–15 mW) of UV light (340–380 nm) were delivered at 2 Hz during 5 s to the soma (optical window of 15–25  $\mu$ m diameter) using a flash photolysis system (Rapp OptoElectronic, Hamburg, Germany).

#### Immunocytochemistry

Anesthetized mice were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB for 3 hr. Coronal slices (35  $\mu$ m thick) were cut with a vibratome and processed to visualize the expression of CB1Rs and GFAP on astrocytes. Slices were preincubated in 0.25% Triton X-100 with 3% normal goat serum in PB during 2 hr, then were transferred to a new solution including both rabbit polyclonal CB1R (dilution 1:250; Affinity Bioreagents) and mouse monoclonal anti-GFAP-Cy3 conjugate antibody. Sections were incubated for 24 hr at 4°C, rinsed in 0.1 M PB, and transferred to a solution containing the secondary antibody, Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000; Molecular Probes). After washing, slices were mounted in glycerol (50% in PB) and examined using laser-scanning confocal microscopy. Control experiments for immunocytochemistry were performed in the absence of primary antibody for CB1Rs, and no significant staining was detected under these control conditions.

#### Drugs

N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM-251), arachidonylethanolamide (AEA), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5), 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride (MPEP), 2-arachidonylethanolamide (2AG), (S)-(+)- $\alpha$ -amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY), (RS)-3-amino-2-(4-chlorophenyl)propylsulfonic acid (saclofen), and (R)-(+)-methanandamide (MAEA) were purchased from Tocris Cookson (Bristol,

UK). Tetrodotoxin (TTX) was acquired from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Fluo-4-AM (Molecular Probes, Eugene, OR). All other drugs were from Sigma.

WIN, 2AG, AEA, and MAEA were delivered by 2–5 s duration pressure pulses (PMI-100 DAGAN, Minneapolis, MN) using a pulled capillary filled with WIN (30–300  $\mu$ M), 2AG (100  $\mu$ M), AEA (300  $\mu$ M), and MAEA (300  $\mu$ M), dissolved in ACSF. Based on quantification of the Alexa 594 fluorescence, we calculated the pressure-ejected volume as  $\sim$ 33 pl, and we estimated a  $\sim$ 67% dilution of the pipette solution in 100  $\mu$ m<sup>3</sup>, which resulted in a final agonist concentration within the usual range of action (e.g., WIN concentration around the recorded cell was  $\sim$ 1–10  $\mu$ M). GABA (700 mM) was ionophoretically delivered. Ionophoretical and pressure pulse experiments were performed in 1  $\mu$ M TTX.

#### SUPPLEMENTAL DATA

The Supplemental Data for this article can be found online at <http://www.neuron.org/cgi/content/full/57/6/883/DC1/>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Perea for her valuable assistance; W. Buño, C. Guaza, E.D. Martín, and M. Fuenzalida for critical comments on the manuscript; J. García-Marqués, A. Muñoz, and L. Mestre for their help with immunocytochemistry; and A. Zimmer for the generous gift of the CB1R knockout mice. This work was supported by grants from MEC (BFU2004-00448; BFU2007-64764), Comunidad de Madrid - CSIC (200620M083), Spain, and European Union (HEALTH-F2-2007-202167). M.N. is a FPI-MEC predoctoral fellow.

Received: July 2, 2007

Revised: November 19, 2007

Accepted: January 10, 2008

Published: March 26, 2008

#### REFERENCES

- Alger, B.E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog. Neurobiol.* 68, 247–286.
- Angulo, M.C., Kozlov, A.S., Charpak, S., and Audinat, E. (2004). Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci.* 24, 6920–6927.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2129–2142.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.
- Araque, A., Carmignoto, G., and Haydon, P.G. (2001). Dynamic signaling between neurons and glia. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 795–813.
- Araque, A., Martín, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., and Buño, W. (2002). Synaptically released acetylcholine evokes Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 22, 2443–2450.
- Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., and Malenka, R.C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science* 295, 2282–2285.
- Bergles, D.E., Roberts, J.D., Somogyi, P., and Jahr, C.E. (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 40, 187–191.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzi, B.L., Pozzan, T., and Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281–285.
- Catsicas, M., and Mobbs, P. (2001). GABA<sub>B</sub> receptors regulate chick retinal calcium waves. *J. Neurosci.* 21, 897–910.
- Chevalyere, V., and Castillo, P.E. (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38, 461–472.



- Chevalyere, V., Takahashi, K.A., and Castillo, P.E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 37–76.
- Di Marzo, V., Bifulco, M., and De Petrocellis, L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 771–784.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743.
- Filipeanu, C.M., de Zeeuw, D., and Nelemans, S.A. (1997). Delta9-tetrahydrocannabinol activates  $[Ca^{2+}]_i$  increases partly sensitive to capacitative store refilling. *Eur. J. Pharmacol.* 336, R1–R3.
- Freund, T.F., Katona, I., and Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signalling. *Physiol. Rev.* 83, 1017–1066.
- Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185–193.
- Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol. Rev.* 86, 1009–1031.
- Isokawa, M., and Alger, B.E. (2006). Ryanodine receptor regulates endogenous cannabinoid mobilization in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 95, 3001–3011.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 1, 683–692.
- Kreitzer, A.C., and Regehr, W.G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29, 717–727.
- Kreitzer, A.C., and Regehr, W.G. (2002). Retrograde signaling by endocannabinoids. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 324–330.
- Kreitzer, A.C., Carter, A.G., and Regehr, W.G. (2002). Inhibition of interneuron firing extends the spread of endocannabinoid signaling in the cerebellum. *Neuron* 34, 787–796.
- Lauckner, J.E., Hille, B., and Mackie, K. (2005). The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 19144–19149.
- Llano, I., Leresche, N., and Marty, A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6, 565–574.
- Lograno, M.D., and Romano, M.R. (2004). Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 494, 55–62.
- Mackie, K., and Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3825–3829.
- Maldonado, R., Valverde, O., and Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29, 225–232.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564.
- Molina-Holgado, F., Pinteaux, E., Moore, J.D., Molina-Holgado, E., Guaza, C., Gibson, R.M., and Rothwell, N.J. (2003). Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J. Neurosci.* 23, 6470–6474.
- Munro, S., Thomas, K., and Abu-Shaar, M.L. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.
- Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26, 523–530.
- Nett, W.J., Oloff, S.H., and McCarthy, K.D. (2002). Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J. Neurophysiol.* 87, 528–537.
- Netzeband, J.G., Conroy, S.M., Parsons, K.L., and Gruol, D.L. (1999). Cannabinoids enhance NMDA-elicited  $Ca^{2+}$  signals in cerebellar granule neurons in culture. *J. Neurosci.* 19, 8765–8777.
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., and Kano, M. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29, 729–738.
- Parri, H.R., Gould, T.M., and Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic  $Ca^{2+}$  oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat. Neurosci.* 4, 803–812.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 17, 7817–7830.
- Perea, G., and Araque, A. (2005). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* 25, 2192–2203.
- Perea, G., and Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317, 1083–1086.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 873–884.
- Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* 16, 5073–5081.
- Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.* 51, 439–455.
- Rodriguez, J.J., Mackie, K., and Pickel, V.M. (2001). Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J. Neurosci.* 21, 823–833.
- Rubovitch, V., Gafni, M., and Sarne, Y. (2002). The cannabinoid agonist DALN positively modulates L-type voltage-dependent calcium-channels in N18TG2 neuroblastoma cells. *Brain Res.* 101, 93–102.
- Salio, C., Doly, S., Fischer, J., Franzoni, M.F., and Conrath, M. (2002). Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 329, 13–16.
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.C., and Robitaille, R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J. Neurosci.* 26, 5370–5382.
- Stella, N. (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 48, 267–277.
- Sugiura, T., Kodaka, T., Kondo, S., Nakane, S., Kondo, H., Waku, K., Ishima, Y., Watanabe, K., and Yamamoto, I. (1997). Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a  $Ca^{2+}$  transient in NG108–15 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 890–895.
- Volterra, A., and Bezzi, P. (2002). The Tripartite Synapse: Glia. In *Synaptic Transmission*, A. Volterra, P.J. Magistretti, and P.G. Haydon, eds. (New York: Oxford University Press), pp. 164–184.
- Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640.
- Walter, L., and Stella, N. (2003). Endothelin-1 increases 2-arachidonoylglycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia* 44, 85–90.
- Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588–592.
- Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678–682.
- Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., and Bonner, T.I. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5780–5785.





CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS  
Instituto de Neurobiología "Ramón y Cajal"

