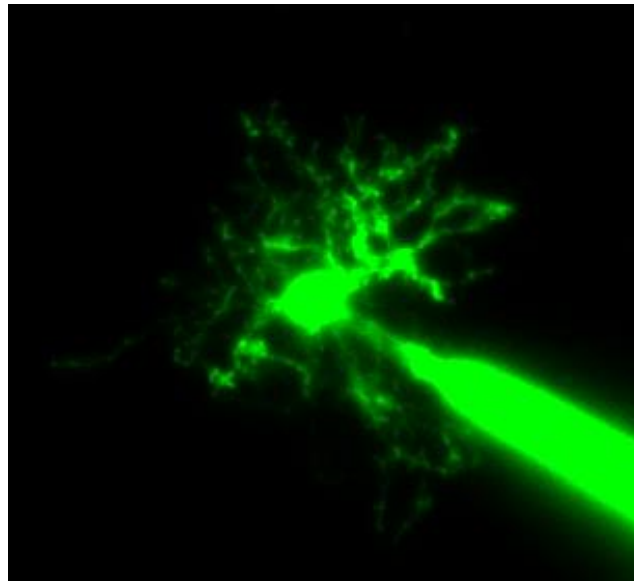


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

MODULACIÓN SINÁPTICA A CORTO Y LARGO PLAZO MEDIADA POR ASTROCITOS EN HIPOCAMPO



Tesis doctoral

Ana Covelo Fernández

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**MODULACIÓN SINÁPTICA A CORTO Y LARGO PLAZO
MEDIADA POR ASTROCITOS EN HIPOCAMPO.**

Tesis doctoral

Ana Covelo Fernández

Madrid, 2015



MINISTERIO
DE ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

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

HACE CONSTAR:

Que Dña. Ana Covelo Fernández 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 “Modulación sináptica a corto y largo plazo mediada por astrocitos en hipocampo”.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo a 3 de Junio de 2015,

Dr. Alfonso Araque

Profesor de Investigación del CSIC

ABREVIATURAS

μM: Micromolar.

MΩ: Megaohmio.

ACh: Acetilcolina.

AM: Acetoxi metiléster.

AMPA: Ácido (RS)-2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico.

AP5: Ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico.

ATP: adenosina 5'-trifosfato.

CB1: Receptores para endocannabinoides tipo 1.

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona.

DIC: Del inglés *differential interfering contrast*. Contraste de interferencia diferencial.

DN: Despolarización neuronal

DSE: Del inglés *depolarization-induced suppression of excitation*.

DSI: Del inglés *depolarization-induced suppression of inhibition*.

eCBs: Endocannabinoides.

EPSC: Del inglés *Excitatory postsynaptic current*. Corriente excitatoria postsináptica.

GABA: Ácido γ-amino-n-Butírico.

GABA_A: Receptor GABA tipo A.

GABA_B: Receptor GABA tipo B.

GDPβS: Guanosina 5'-[β-thio]difosfato.

HFS: Del inglés *high frequency stimulation*. Estimulación de alta frecuencia.

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato.

IP₃R2: Receptores de IP₃ de tipo 2.

IPSC: Del inglés *Inhibitory postsynaptic current*. Corriente inhibitoria postsináptica.

LCA: Líquido cefalorraquídeo artificial.

LTD: Del inglés *Long term depression*. Depresión a largo plazo.

LTP: Del inglés *Long term potentiation*. Potenciación a largo plazo.

mAChRs: Receptores muscarínicos colinérgicos.

mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato.

mM: Milimolar.

ms: Milisegundo.

mV: Milivoltio.

NP-EGTA: o-nitrofenil ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

pA: picoamperio.

PKC: Del inglés *Protein kinase C*. Proteína quinasa C.

FPP: Facilitación por pares de pulsos.

TBS: Del inglés *Theta Burst Stimulation*.

VGCCs: Del inglés *voltage-gated calcium channels*. Canales de calcio voltaje dependientes.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	9
1. Las células de glía y su relevancia en la función cerebral.....	11
2. La sinapsis tripartita.....	12
3. Los astrocitos son células excitables: la señal de calcio.....	13
4. El concepto de gliotransmisión.....	15
5. Comunicación bidireccional neurona-astrocito.....	17
a. Astrocitos y el sistema endocannabinoide.....	17
i. Receptores CB1.....	18
ii. Receptores CB2.....	19
iii. Receptores TRPA1.....	19
iv. Efecto de la activación del receptor CB1 sobre la transmisión sináptica.....	19
b. Astrocitos y el sistema GABAérgico.....	21
i. Receptores GABA-A.....	22
ii. Receptores GABA-B.....	22
iii. Los receptores GABAB y su función sobre la regulación de la transmisión sináptica.....	22
II. OBJETIVOS.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
1. Declaración ética.....	31
2. Preparación de rodajas de hipocampo de ratón.....	31
3. Registros electrofisiológicos.....	32
4. Estimulación sináptica mínima.....	33
5. Paradigmas de estimulación y análisis de datos.....	34
a. Estudio de la LTP mediada por endocannabinoides.....	34
i. Despolarizaciones pareadas.....	34
ii. Theta burst stimulation (TBS).....	35
iii. Corriente lenta de K ⁺ activada por Ca ²⁺ (sIAHP).....	35
b. Estudio de la liberación de gliotransmisores.....	36
i. Estimulación de alta frecuencia.....	36
ii. Despolarización neuronal (DN).....	37
iii. Tren de despolarizaciones de interneuronas.....	37
6. Monitorización de calcio en los astrocitos.....	38
7. Estimulación de astrocitos por fotólisis con luz ultravioleta.....	39
8. Drogas y reactivos.....	40
9. Análisis estadístico.....	40

IV. RESULTADOS.....	42
1. Señalización por endocannabinoides en astrocitos y plasticidad sináptica.....	43
a. El sistema endocannabinoide potencia a largo plazo la liberación de neurotransmisor en sinapsis heteroneuronales.....	43
b. La eLTP requiere elevaciones de calcio en los astrocitos.....	48
c. Señalización postsináptica: la eLTP requiere la producción de óxido nítrico en la neurona postsináptica.....	52
d. Señalización presináptica: la eLTP está mediada por la activación de mGluRs y PKC en el terminal presináptico.....	56
2. Estudio de los procesos que regulan la liberación de gliotransmisores.....	64
a. Una única sinapsis puede ser modulada por varios gliotransmisores.....	64
b. Los astrocitos modulan la transmisión sináptica tras la activación de receptores GABA _B	69
c. Los astrocitos liberan glutamato y ATP tras la activación de receptores GABA _B	73
d. La liberación de gliotransmisores depende de la frecuencia de disparo de potenciales de acción y la duración de la actividad neuronal.....	76
V. DISCUSIÓN.....	80
1. Los eCBs inducen una potenciación de la liberación de neurotransmisor en sinapsis de CA3-CA1.....	81
2. El efecto de los eCBs se encuentra restringido de manera espacial.....	82
3. La actividad de la red de astrocitos es necesaria para la inducción de la eLTP.....	83
4. La eLTP está mediada por mGluR presinápticos.....	84
5. Los astrocitos liberan glutamato y ATP/adenosina como respuesta a la actividad neuronal.....	85
6. La liberación de glutamato y ATP/adenosina depende de la duración de la actividad y del patrón de disparo neuronal.....	86
7. El concepto de sinapsis tripartita.....	88
VI. CONCLUSIONES.....	90
VII. REFERENCIAS.....	92
VIII. SEPARATAS.....	110

I. INTRODUCCIÓN

1. LAS CÉLULAS DE GLÍA Y SU RELEVANCIA EN LA FUNCIÓN CEREBRAL.

El sistema nervioso se encarga de recibir y procesar la información proveniente del medio externo y de su propia actividad de manera rápida y eficaz para lograr una adecuada interacción con el medio ambiente. El procesamiento de la información se lleva a cabo por las neuronas gracias a su característica principal: la excitabilidad eléctrica. Las neuronas presentan en su membrana celular una gran cantidad de canales iónicos activados por voltaje o ligando cuya activación permite el movimiento de iones entre el interior y el exterior celular induciendo, de este modo, cambios en el potencial de membrana. Dichos cambios de potencial de la membrana neuronal son la base de la transmisión y codificación de la información en el cerebro. Los cambios de potencial no se encuentran restringidos a una neurona, sino que pueden ser transferidos a las neuronas adyacentes en las sinapsis, de manera que la información puede viajar de una región cerebral a otra.

Además de las neuronas, el sistema nervioso está compuesto por otro tipo de células no neuronales denominado neuroglía. La neuroglía fue descrita por primera vez en 1846 por Virchow quien la caracterizó como un *aglutinante* o *pegamento* nervioso y propuso el nombre de glía (debido a que su significado en griego es aglutinante). Más tarde Golgi propondría que el papel de la glía era servir como soporte trófico para las neuronas, sin embargo esta hipótesis fue criticada por Cajal, el cual era partidario de un papel más complejo por parte de la glía. Sin embargo, el estudio de la neuroglía se vio relegado a un segundo plano hasta que en la década de 1980 se comenzó a poner de manifiesto el importante papel de estas células para el mantenimiento de la función cerebral.

Las células de glía son las células más abundantes del cerebro y comprenden varios tipos celulares que se pueden diferenciar en dos grupos: microglía y macroglía. La microglía se origina durante el desarrollo a partir de precursores mesenquimales y se trata de macrófagos con capacidad fagocítica que se encargan de la reacción inmunológica dentro del sistema nervioso central. Recientemente, la microglía se ha relacionado con la modulación de la transmisión sináptica e incluso se ha propuesto la existencia de una Sinapsis Cuatripartita (Schafer et al., 2013). La macroglía comprende un grupo heterogéneo de células de origen ectodérmico, estas células son: astrogλία, endimocitos, oligodendrocitos y células de Schwann. Mientras que oligodendrocitos y células de Schwann se encargan de crear las vainas de mielina alrededor de los axones neuronales en el sistema nervioso central en el sistema nervioso periférico, respectivamente; los endimocitos revisten los ventrículos y el canal endimario en la medula espinal creando la barrera hematoencefálica y segregando, además, el líquido cefalorraquídeo. La astrogλία, por su parte, es un grupo celular heterogéneo que

presenta diferentes características morfológicas en las distintas áreas del sistema nervioso central. Así, se pueden diferenciar las células de Müller en la retina, la glía de Bergman en el cerebelo, los astrocitos fibrosos en la sustancia blanca, los astrocitos protoplásmicos en la sustancia gris o los astrocitos perivasculares (Kettenmann & Ransom, 2005). En general la astrogliá se ha relacionado con la formación de sinapsis, la recaptación de neurotransmisores, el control del flujo sanguíneo cerebral y el balance de agua, entre otras funciones (Walz, 1989; Hatten & Mason, 1990; Vernadakis, 1996; Ullian *et al.*, 2001).

2. LA SINAPSIS TRIPARTITA.

Los astrocitos juegan un papel importante en la función neuronal y sináptica. Los astrocitos poseen una estructura celular ramificada (Figura 1) (Kosaka & Hama, 1986; Nixdorf-Bergweiler *et al.*, 1994; Bushong *et al.*, 2002) y sus ramificaciones son denominadas *procesos*. Los procesos más finos de los astrocitos se encuentran rodeando las sinapsis, de tal manera que en el *Stratum Radiatum* del hipocampo de ratas adultas, el 57% de las sinapsis están rodeadas por procesos de Astrocitos, en la corteza cerebelar la mayoría de las sinapsis están rodeadas por glía de Bergman y en el neocortex el 29% de las sinapsis se encuentran rodeadas por Astrocitos (Spacek, 1985; Ventura & Harris, 1999). Por lo tanto, los astrocitos son partes integrales de las sinapsis y se encargan de suministrar soporte trófico y metabólico y de mantener el control homeostático cerebral para asegurar una función neuronal y sináptica apropiadas a través de la regulación de los niveles extracelulares de iones y neurotransmisores (Walz, 1989; Hatten & Mason, 1990; Vernadakis, 1996; Ullian *et al.*, 2001).

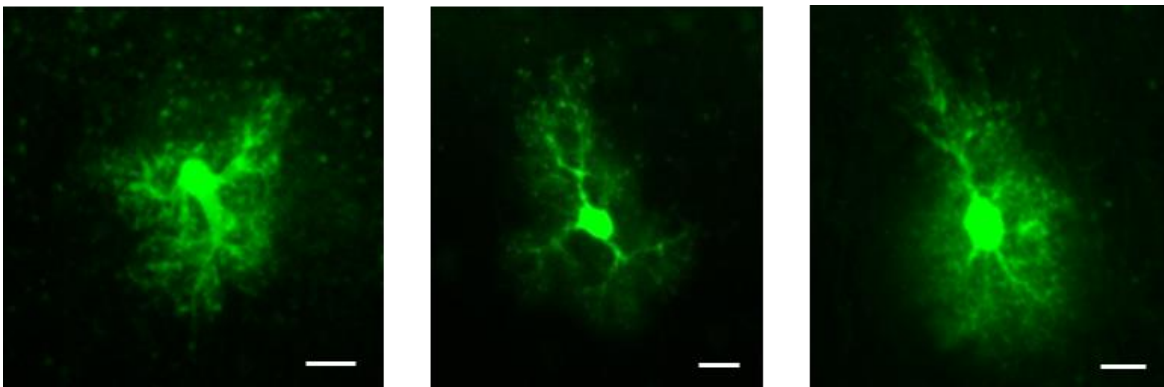


Figura 1. Astrocitos representativos localizados en el Stratum Radiatum del hipocampo. Imágenes de fluorescencia de tres astrocitos localizados en el Stratum Radiatum llenados con Alexa488. Barra de escala: 10 μ m.

Además de su función homeostática y de soporte (Walz, 1989; Hatten & Mason, 1990; Vernadakis, 1996), gran cantidad de evidencias obtenidas en las últimas dos décadas han revelado que los astrocitos pueden estar directamente implicados en la regulación de la función neuronal y sináptica respondiendo a neurotransmisores liberados por los terminales sinápticos y liberando, a su vez, sustancias neuroactivas denominadas *gliotransmisores* que pueden impactar en las neuronas y controlar la actividad sináptica (Araque *et al.*, 2001; Nedergaard *et al.*, 2003; Volterra & Meldolesi, 2005; Haydon & Carmignoto, 2006; Theodosis *et al.*, 2008; Perea *et al.*, 2009; Parpura & Zorec, 2010; Araque *et al.*, 2014; Perea *et al.*, 2014a; Covelo & Araque, 2015).

Basándose en este intercambio bidireccional de señales entre los astrocitos y los elementos sinápticos neuronales, hace quince años se acuñó el concepto de Sinapsis Tripartita (Araque *et al.*, 1999). Esta idea, que representó un concepto novedoso en la fisiología sináptica, proponía que los astrocitos son partes integrales y funcionales de las sinapsis a las que engloban y que, por lo tanto, pueden responder a neurotransmisores y modular la actividad sináptica tanto a corto como a largo plazo. Por tanto, el concepto de la Sinapsis Tripartita es una extensión del concepto clásico de la sinapsis donde únicamente se tenían en cuenta los componentes neuronales.

3. LOS ASTROCITOS SON CÉLULAS EXCITABLES: LA SEÑAL DE CALCIO.

El hecho de que los astrocitos no son excitables eléctricamente implicó que la mayoría de los estudios sobre la fisiología cerebral se centrara únicamente en la actividad neuronal. Fue a principios de la década de los 90, gracias a las mejoras de las técnicas de imagen y fluorescencia (Tsien, 1980; 1981; Grynkiewicz *et al.*, 1985; Minta *et al.*, 1989), cuando se demostró que los astrocitos sí son células excitables. Pero a diferencia de las neuronas, que basan su excitabilidad en cambios de voltaje a través de la membrana plasmática, la excitabilidad de los astrocitos depende de aumentos en los niveles de Ca^{2+} intracelular (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991).

Los astrocitos expresan en su membrana gran cantidad de receptores funcionales de neurotransmisores que, tras su activación, dan lugar a elevaciones de los niveles de Ca^{2+} intracelular permitiendo que respondan a la actividad neuronal circundante (Araque *et al.*, 2001; Nedergaard *et al.*, 2003; Volterra & Meldolesi, 2005; Haydon & Carmignoto, 2006; Theodosis *et al.*, 2008; Perea *et al.*, 2009; Parpura & Zorec, 2010; Araque *et al.*, 2014; Perea *et*

al., 2014a). Las elevaciones de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático tienen importantes consecuencias fisiológicas ya que inducen la fusión de vesículas y la liberación de gliotransmisores mediante la activación del complejo SNAP-SNARE (Araque *et al.*, 2000; Zorec *et al.*, 2012). Los astrocitos utilizan el retículo endoplasmático como reservorio principal de Ca^{2+} , desde donde puede ser liberado a través de canales de Ca^{2+} activados por ligando. Éstos son los receptores de IP_3 de tipo 2 ($\text{IP}_3\text{R2}$) o los receptores de Rianodina (RyR), que son activados por IP_3 y por Ca^{2+} respectivamente (Hua *et al.*, 2004; Parpura & Zorec, 2010; Zorec *et al.*, 2012). Los receptores de membrana presentes en los astrocitos son principalmente de naturaleza metabotrópica y su activación tiene como consecuencia la producción de IP_3 . Las elevaciones de Ca^{2+} intracelular en los astrocitos se deben principalmente a la activación de receptores de $\text{IP}_3\text{R2}$, la activación de estos receptores en los astrocitos han sido relacionados con la modulación de la transmisión sináptica tanto a corto como a largo plazo (Holtzclaw *et al.*, 2002; Fiacco & McCarthy, 2004; Takata *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012).

Sin embargo, una parte de las elevaciones de Ca^{2+} intracelular en los astrocitos se debe a la activación de canales TRPA1 (del inglés *Transient Receptor Potential*). Estos canales se encuentran en la membrana citoplasmática y son responsables de la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. Según estudios recientes, los canales TRPA1 son responsables del 20% de los eventos de Ca^{2+} que se producen en los astrocitos del hipocampo y se han relacionado con formas de potenciación a largo plazo de la transmisión glutamatérgica así como la regulación de la transmisión GABAérgica (Shigetomi *et al.*, 2012; Shigetomi *et al.*, 2013).

La señal de Ca^{2+} en el astrocito ocurre en compartimentos subcelulares específicos o *microdominios* y es iniciada por neurotransmisores liberados por los terminales sinápticos (Grosche *et al.*, 1999; Perea & Araque, 2005; Di Castro *et al.*, 2011; Panatier *et al.*, 2011). Ciertos eventos de Ca^{2+} se encuentran restringidos a un microdominio y se deben principalmente a actividad neuronal espontánea. Debido a que este tipo de señal de Ca^{2+} no se expande a otras regiones del astrocito se les ha dado el nombre de *eventos locales* (Di Castro *et al.*, 2011). Desde los microdominios, la señal de Ca^{2+} puede expandirse bajo diferentes condiciones a regiones adyacentes dentro del mismo proceso, a procesos diferentes o incluso a la célula entera, un proceso mediado por la actividad sináptica dependiente de potenciales de acción (Di Castro *et al.*, 2011). Por tanto, la extensión espacial de la señal de Ca^{2+} no es un fenómeno pasivo sino que por el contrario, parece ser un proceso bien regulado que depende de la actividad neuronal y la interacción de diferentes señales sinápticas (Grosche *et al.*, 1999; Perea & Araque, 2005; Di Castro *et al.*, 2011; Panatier *et al.*, 2011).

Además, los eventos de Ca^{2+} no se encuentran restringidos a un sólo astrocito, sino que por el contrario, pueden transmitirse a los astrocitos vecinos creando de esta manera lo que se conoce como *ondas de Ca^{2+}* . Las ondas de Ca^{2+} son una forma de comunicación astrocito-astrocito y fueron descritas en cultivos de astrocitos, donde se observó que la señal de Ca^{2+} intracelular podía viajar a los astrocitos circundantes, llegando a recorrer hasta $450 \mu\text{m}^2$ sin que hubiese una disminución en la señal (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991; Newman & Zahs, 1997; Innocenti *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2005). A pesar de los estudios realizados en cultivos de astrocitos, la existencia de ondas de Ca^{2+} en rodajas de cerebro, donde el circuito neuronal se encuentra mejor conservado, o *in vivo* todavía se encuentra bajo debate. Aunque se ha probado la presencia de ondas de Ca^{2+} tanto en rodajas como *in vivo*, éstas se encuentran habitualmente asociadas a patologías (Agulhon *et al.*, 2012). Por otro lado, estudios llevados a cabo en tejido no patológico han mostrado que las ondas de Ca^{2+} podrían estar restringidas a un área menor, de manera que un pequeño número de astrocitos se verían involucrados (Schipke *et al.*, 2002; Sul *et al.*, 2004).

Por tanto, los astrocitos pueden comunicarse entre sí por medio de la señal de Ca^{2+} , de manera que la actividad sináptica de una cierta región podría generar una respuesta de Ca^{2+} que se transmita a una región más lejana y modular de esta manera la transmisión sináptica en otra región por medio de la actividad de los astrocitos.

4. EL CONCEPTO DE GLIOTRANSMISIÓN.

El concepto de Sinapsis tripartita dio lugar necesariamente al término de gliotransmisión, según el cual los astrocitos responden a la actividad neuronal con elevaciones de Ca^{2+} intracelular y liberan moléculas capaces de regular la excitabilidad neuronal, la transmisión sináptica y la plasticidad. A dichas moléculas se les dio el nombre de *gliotransmisores* dado que provienen de las células de glía y, en 2005, Volterra y Meldolesi propusieron que un gliotransmisor debía cumplir las siguientes características:

- i) Ser sintetizados y/o guardados en el interior de células gliales
- ii) Ser liberados bajo estímulos fisiológicos
- iii) Inducir una respuesta rápida en las sinapsis circundantes
- iv) Tener un papel en procesos fisiológicos

El hecho de que los astrocitos modulen la transmisión sináptica se encuentra todavía bajo debate (Fiacco *et al.*, 2007; Petravicz *et al.*, 2008; Agulhon *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013; Fujita *et al.*, 2014; Sloan & Barres, 2014), sin embargo, gran cantidad de estudios han mostrado que basan su excitabilidad en elevaciones de Ca^{2+} , que pueden ser activados por la actividad neuronal y que pueden modular la transmisión sináptica mediante la liberación de gliotransmisores, un hecho que se ha mostrado en diferentes regiones cerebrales (Haydon & Carmignoto, 2006; D'Ascenzo *et al.*, 2007; Perea & Araque, 2007; Di Castro *et al.*, 2011; Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2011; Panatier *et al.*, 2011; Takata *et al.*, 2011; Min & Nevean, 2012; Navarrete *et al.*, 2012; Perea *et al.*, 2014b). Por ejemplo, en el hipocampo los astrocitos responden con elevaciones de Ca^{2+} intracelular a glutamato, GABA, acetilcolina (ACh) y endocannabinoides (eCBs) (Kang *et al.*, 1998; Perea & Araque, 2005; Navarrete & Araque, 2008); liberando a su vez ATP, glutamato o D-serina (Serrano *et al.*, 2006; Navarrete & Araque, 2008; Henneberger *et al.*, 2010). Así mismo, las células de Schwann del sistema nervioso periférico también intervienen en la modulación de las uniones neuro-musculares (Darabid *et al.*, 2013; Darabid *et al.*, 2014), poniendo de manifiesto que el papel modulador de la neuroglía no se encuentra restringido al sistema nervioso central, sino que por el contrario, los conceptos de Sinapsis Tripartita y gliotransmisión se pueden extender incluso al sistema nervioso periférico.

Esta comunicación astrocito-neurona no se encuentra necesariamente restringida a las sinapsis activas y al astrocito que las rodea. Considerando las propiedades morfológicas y funcionales de los astrocitos, como por ejemplo la extensión espacial de la señal de Ca^{2+} (Grosche *et al.*, 1999; Perea & Araque, 2005; Di Castro *et al.*, 2011; Panatier *et al.*, 2011), la comunicación intercelular entre astrocitos (Giaume & McCarthy, 1996; Rouach *et al.*, 2008; Giaume *et al.*, 2010), y la extensa ramificación celular que permite que un solo astrocito pueda estar en contacto con miles de sinapsis (Ventura & Harris, 1999; Bushong *et al.*, 2002; Halassa *et al.*, 2007), se podrían predecir procesos regulatorios mucho más complejos llevados a cabo por los astrocitos. Por ejemplo, la estimulación de un astrocito por la actividad de ciertas sinapsis podría llevar a la regulación heteroneuronal de otra sinapsis mediante un mecanismo de señalización entre sinapsis tripartitas que podrían servir como puente de comunicación entre sinapsis lejanas, un fenómeno denominado *modulación lateral* (Figura 2) (Covelo & Araque, 2015). Más allá de la difusión pasiva de gliotransmisores, la modulación lateral se debe a las características morfológicas de los astrocitos. De hecho, el tamaño, orientación, extensión espacial de la señal de Ca^{2+} , cobertura sináptica de los astrocitos y la relación astrocito/sinapsis podrían determinar la extensión de esta señal regulatoria, y las diferencias de estos parámetros en diferentes áreas cerebrales podrían influenciar las propiedades funcionales de la modulación lateral mediada por astrocitos.

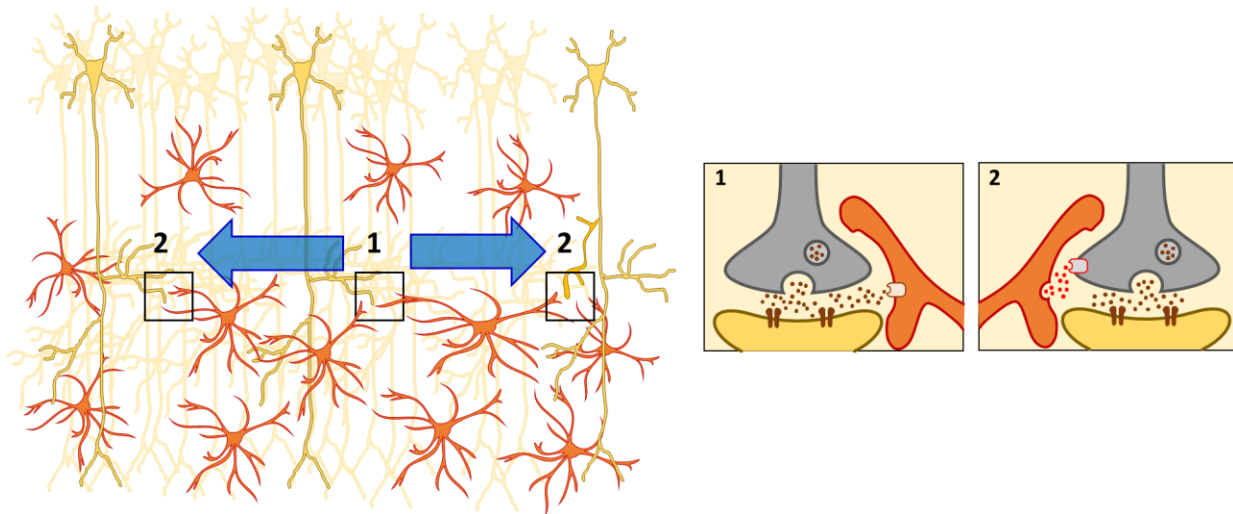


Figura 2. Modulación lateral mediada por astrocitos. Los neurotransmisores liberados por una sinapsis (1) estimulan la señal de Ca^{2+} en los astrocitos adyacentes (en rojo). La señal de Ca^{2+} se extiende a través de la red de astrocitos e induce la liberación de gliotransmisores en sinapsis lejanas (2). Figura obtenida de Covelo & Araque, 2015.

5. COMUNICACIÓN BIDIRECCIONAL NEURONA-ASTROCITO:

Como se ha mencionado anteriormente, los astrocitos poseen en su membrana una gran cantidad de receptores funcionales que les permiten responder a la actividad neuronal con elevaciones de Ca^{2+} y liberar gliotransmisores que modulen la transmisión sináptica (Araque et al., 2001; Nedergaard et al., 2003; Volterra & Meldolesi, 2005; Haydon & Carmignoto, 2006; Theodosis et al., 2008; Perea et al., 2009; Parpura & Zorec, 2010; Araque et al., 2014; Perea et al., 2014a). Este hecho muestra que la relación existente entre astrocitos y neuronas va más allá de un papel de soporte metabólico y la recaptación de neurotransmisores, sino que por el contrario, existe una comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas.

ASTROCITOS Y EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE:

La planta *Cannabis sativa* se ha utilizado durante siglos como agente psicotrópico debido a los compuestos psicoactivos presentes en su resina. Su componente psicoactivo principal es el (-)-trans- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) (Gaoni & Mechoulam, 1964) y desde su descubrimiento se han aislado compuestos relacionados, a los cuales se les ha denominado cannabinoides. A estos compuestos se les atribuyen numerosos efectos como pueden ser

euforia, aumento de apetito, disminución de náuseas y deterioro de la coordinación motora (Adams & Martin, 1996). El hallazgo del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) dio paso al descubrimiento de sus ligandos endógenos (entre ellos la *Anandamida* o el *2-Araquidonoilglicerol*), los cuales recibieron el nombre de *endocannabinoides* (eCBs) (Devane *et al.*, 1992; Howlett *et al.*, 2002).

En el sistema nervioso central, los eCBs son sintetizados y liberados principalmente por las neuronas. Debido a su naturaleza lipofílica, los eCBs no son almacenados en el interior de vesículas sinápticas, sino que sus precursores se encuentran en la membrana plasmática en forma de fosfolípidos (Piomelli, 2003). Su síntesis se produce mediante hidrólisis de estos fosfolípidos de membrana cuando se activan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC, del inglés *Voltage-Gated Calcium Channels*) y aumentan los niveles de Ca^{2+} intracelular. Una vez liberados, los eCBs son rápidamente recaptados por transportadores de alta afinidad presentes tanto en neuronas como en las células de glía (Beltramo *et al.*, 1997; Hillard *et al.*, 1997; Piomelli, 2003; Hajos *et al.*, 2004) y degradados en el interior celular por enzimas específicas (Hillard *et al.*, 1995; Cravatt *et al.*, 1996; Dinh *et al.*, 2002; McKinney & Cravatt, 2005).

Existen dos tipos de receptores de cannabinoides, denominados CB1 y CB2. Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas G y se caracterizan por presentar siete dominios transmembrana (Matsuda *et al.*, 1990). Además de los receptores CB1 y CB2 los receptores de potencial transitorio de vaniloides de tipo 1 (TRPV1, del inglés *Transient Receptor Potential, subfamily V, type 1*) también son activados por cannabinoides (Castillo *et al.*, 2012).

Receptores CB1:

Los receptores CB1 se expresan abundantemente en hipocampo, corteza, ganglios basales y cerebelo donde desempeñan funciones neuromodulatorias relevantes en la fisiología cerebral (Freund *et al.*, 2003; Chevaleyre *et al.*, 2006; Heifets & Castillo, 2009; Rodríguez *et al.*, 2011). En menor grado de expresión, se encuentra también en hipotálamo y médula espinal.

El receptor CB1 se expresa principalmente en neuronas en los terminales presinápticos donde se encuentra asociado a proteínas $G_{i/o}$, por lo que han sido generalmente relacionados con la inhibición de la liberación de algunos neurotransmisores como GABA, dopamina, noradrenalina, glutamato y serotonina (Ishac *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 1999; Wilson & Nicoll, 2001; Chevaleyre *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2007). Además, en corteza somatosensorial los eCBs liberados por las interneuronas pueden activar auto-receptores CB1 en el terminal postsináptico y activar canales rectificadores de potasio ligados a proteínas G

(GIRK del inglés *G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels*) dando como resultado la hiperpolarización del potencial de membrana y la inhibición de la frecuencia de disparo neuronal (Bacci *et al.*, 2004; Marinelli *et al.*, 2008).

Aunque en menor medida, los receptores CB1 se expresan en astrocitos en rodajas de hipocampo de ratón, donde se ha propuesto que se encuentran ligados a proteínas G_{q/11} y su activación es responsable de la movilización de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático y la liberación de gliotransmisores (Navarrete & Araque, 2008).

Receptores CB2:

Los receptores CB2, al igual que los receptores CB1, actúan mediante la activación de proteínas G_{i/o}. Éstos receptores se encuentran expresados principalmente en el sistema inmune en células mieloides, macrófagos y monocitos de bazo, en leucocitos de sangre circulante (Pertwee, 1997; 1998; Howlett *et al.*, 2002) y en distintos tejidos como bazo, timo, amígdalas, medula ósea, páncreas y corazón (Bouchard *et al.*, 2003; Lepicier *et al.*, 2003).

Receptores TRPV1:

Los receptores TRPV1 se expresan principalmente en las neuronas sensoriales periféricas, donde su activación regula la transmisión sináptica asociada con el dolor (Caterina & Julius, 2001). Se expresan también en el sistema nervioso central donde regulan la transmisión sináptica (Roberts *et al.*, 2004; Cristino *et al.*, 2006; Cristino *et al.*, 2008; Puente *et al.*, 2011). De hecho, se han descrito formas de LTD mediadas por la activación de TRPV1 a través de eCBs en el *nucleus accumbens*, en el giro dentado del hipocampo, así como en la *stria terminalis*, (Chavez *et al.*, 2010; Grueter *et al.*, 2010; Puente *et al.*, 2011).

Efecto de la activación del receptor CB1 sobre la transmisión sináptica:

El sistema endocannabinoide es un importante sistema de señalización intracelular involucrado en gran cantidad de procesos fisiológicos. Los eCBs y el receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) juegan un importante papel como neuromoduladores en la función cerebral y son responsables de la mayoría de los efectos de los cannabinoides sobre el comportamiento (Chevalleyre & Castillo, 2004; Chevalleyre *et al.*, 2006; Hashimoto-dani *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2012). Los eCBs son generalmente liberados por el terminal postsináptico y difunden de manera retrógrada hasta el terminal presináptico donde activan receptores CB1 (Ohno-Shosaku

et al., 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevaleyre & Castillo, 2004; Safo & Regehr, 2005; Peterfi *et al.*, 2012). Los eCBs han sido relacionados generalmente con fenómenos de inhibición de la liberación de neurotransmisor por lo que su papel más conocido es la depresión de la transmisión sináptica. La despolarización neuronal induce la liberación de eCBs en el terminal postsináptico, los cuales inducen una depresión transitoria conocida como DSI (del inglés *Depolarization-induced Suppression of Inhibition*), en el caso de las sinapsis inhibitorias, o DSE (del inglés *Depolarization-induced Suppression of Excitation*) en el caso de las sinapsis excitatorias (Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Piomelli, 2003; Chevaleyre & Castillo, 2004; Chevaleyre *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios más recientes realizados en la carpa dorada, en medula espinal de lampreas y en hipocampo de roedores han mostrado que la activación de receptores CB1 puede aumentar la neurotransmisión de manera transitoria (Cachope *et al.*, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Song *et al.*, 2012). Además, hasta el momento, el único papel conocido del sistema endocannabinoide sobre la plasticidad sináptica es exclusivamente inducir depresión a largo plazo (LTD) (Chevaleyre & Castillo, 2004; Safo & Regehr, 2005; Peterfi *et al.*, 2012) y su papel en formas de potenciación sináptica a largo plazo (LTP) no ha sido estudiado.

Recientemente, se ha mostrado que la señalización por eCBs es una forma de comunicación neurona-astrocito, de manera que los astrocitos pueden responder a los eCBs liberados por las neuronas con elevaciones de los niveles de Ca^{2+} intracelular dando lugar a la liberación de glutamato (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Min & Nevian, 2012). En el hipocampo, este glutamato liberado por los astrocitos tras la activación de receptores CB1, activa receptores NMDA extrasinápticos en neuronas piramidales adyacentes y modifica su excitabilidad, revelando que los astrocitos sirven como un puente de comunicación no sináptica entre neuronas (Navarrete & Araque, 2008).

A pesar de que la inhibición de la liberación de neurotransmisor desde los terminales presinápticos es el efecto canónico de la señalización por eCBs sobre la transmisión sináptica y la plasticidad (Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Piomelli, 2003; Chevaleyre & Castillo, 2004; Chevaleyre *et al.*, 2006), las consecuencias de los eCBs sobre la regulación sináptica son más complejas de lo que originalmente se pensaba dado el papel que juegan los astrocitos (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Min & Nevian, 2012; Navarrete *et al.*, 2014). De hecho, los eCBs liberados por una neurona piramidal deprimen la neurotransmisión en sinapsis adyacentes mediante la activación directa de receptores CB1 en el terminal presináptico, pero debido a que los eCBs llevan a cabo sus efectos a cortas distancias (< 20 μ m) (Wilson & Nicoll, 2001; Piomelli, 2003; Chevaleyre & Castillo, 2004; Chevaleyre *et al.*, 2006), ésta depresión sináptica se encuentra localizada en un área restringida cercana a la

fuentes de eCBs (Navarrete & Araque, 2010). Además, los eCBs activan receptores CB1 en los astrocitos cercanos e inician la señal de Ca^{2+} intracelular en los astrocitos (Navarrete & Araque, 2008; 2010). La señal de Ca^{2+} puede expandirse a otros procesos celulares o quizás también a otras células, induciendo así la liberación de glutamato en regiones relativamente distantes donde activa receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 1 (mGluR_1) (Figura 2). La liberación de glutamato iniciada por la señalización por eCBs sobre los astrocitos conlleva un aumento transitorio de la neurotransmisión en sinapsis relativamente lejanas que no han sufrido el efecto directo de la inhibición (Navarrete & Araque, 2010). Por tanto, los eCBs representan una señal de *corto alcance* que induce una depresión de las sinapsis cercanas a su fuente de liberación (Wilson & Nicoll, 2001; Piomelli, 2003; Chevaleyre & Castillo, 2004; Chevaleyre *et al.*, 2006; Navarrete & Araque, 2010), pero, mediante la estimulación de la red de astrocitos, pueden también generar una señal de *largo alcance* que involucra la señal de Ca^{2+} intracelular en los astrocitos y la liberación de glutamato induciendo de manera indirecta la potenciación de sinapsis relativamente más lejanas (Navarrete & Araque, 2010).

De manera similar, descubrimientos recientes han mostrado que los astrocitos estimulados por eCBs también pueden participar en una forma de plasticidad sináptica en el neocórtex denominada en inglés *spike timing-dependent depression* (tLTD) (Min & Nevian, 2012). Esta forma de plasticidad sináptica inducida por eCBs en corteza de barriles depende de la activación de receptores CB1 y receptores NMDA presinápticos (Sjostrom *et al.*, 2003; Bender *et al.*, 2006; Nevian & Sakmann, 2006; Corlew *et al.*, 2007; Rodríguez-Moreno & Paulsen, 2008; Banerjee *et al.*, 2014). Min y Nevian (2012) demostraron que durante el protocolo de estimulación que induce la tLTD los astrocitos elevan su Ca^{2+} intracelular en respuesta a la activación de receptores CB1. De la misma manera que en el hipocampo, esta señal induce la liberación de glutamato. Sin embargo, mientras que en el hipocampo el glutamato liberado por los astrocitos activa receptores presinápticos mGluR_1 e induce una potenciación sináptica (Navarrete & Araque, 2010), en el neocórtex este glutamato activa receptores NMDA dando lugar a una depresión de la transmisión sináptica cortical a largo plazo (Min & Nevian, 2012).

ASTROCITOS Y EL SISTEMA GABAÉRGICO:

El ácido γ -aminobutírico (GABA) juega un papel fundamental en la función cerebral siendo el neurotransmisor inhibitorio más abundante del sistema nervioso central. El GABA es sintetizado a partir de glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD, del inglés *glutamic acid decarboxylase*) (Roberts & Frankel, 1950) y almacenado dentro de vesículas en los terminales presinápticos. Una vez liberado, el GABA es recaptado por el terminal presináptico o por las células de glía donde se metabolizará a glutamina por medio de la enzima

GABA-transaminasa (GABA-T) (Bessman *et al.*, 1953; Hertz, 2013)

Se conocen dos tipos de receptores de GABA: GABA_A y GABA_B. La activación de ambos receptores en el terminal postsináptico da lugar a las denominadas corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs, del inglés *Inhibitory Postsynaptic Currents*).

Receptores GABA_A:

Se trata de canales ionotrópicos activados por ligando que presentan preferencia por el ión cloro, por lo que su activación resulta en un aumento de la conductancia de la membrana plasmática que generalmente induce una hiperpolarización del potencial de membrana en el terminal postsináptico (Sivilotti & Nistri, 1991). Dada su naturaleza ionotrópica (Sivilotti & Nistri, 1991), la activación de receptores GABA_A da lugar a respuestas inhibitorias rápidas y, por tanto, son los responsables del componente rápido del IPSC.

Receptores GABA_B:

Al contrario que los GABA_A, los receptores GABA_B son receptores metabotrópicos ligados a proteínas G_{i/o} (Ulrich & Bettler, 2007; Chalifoux & Carter, 2011), por lo que son de respuesta lenta y median el componente lento del IPSC. Su activación en el terminal postsináptico genera corrientes inhibitorias debido a un aumento en la conductancia en el ión potasio (Luscher *et al.*, 1997; Wagner & Dekin, 1997; Bowery *et al.*, 2002).

Los receptores GABA_B se han descrito en neuronas tanto en el terminal postsináptico como en el presináptico (Olsen & DeLorey, 1999). Así mismo, los astrocitos responden a GABA liberado por las neuronas inhibitorias con aumentos de Ca²⁺ mediados por la activación de receptores de GABA_B, indicando que los astrocitos también presentan receptores de GABA funcionales (Kang *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2006; Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2011).

Los receptores GABA_B y su función sobre la regulación de la transmisión sináptica:

Además de participar en el IPSC, los receptores GABA_B presentes en el terminal presináptico juegan un papel regulatorio sobre la liberación de GABA debido a que su activación bloquea canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VGCC, del inglés *Voltage-Gated Calcium Channels*) e inhibe la liberación de neurotransmisor (Lambert & Wilson, 1996; Bussières & El Manira, 1999; Chalifoux & Carter, 2011). Las interneuronas GABAérgicas

controlan la excitabilidad neuronal y mantienen un balance excitación/inhibición apropiados (Isaacson & Scanziani, 2011). Sin embargo, el papel de las interneuronas sobre la fisiología cerebral va más allá de la inhibición neuronal, también coordina y sincroniza la actividad de las redes neuronales mediante la generación de ritmos de actividad específicos (Klausberger *et al.*, 2003; Buzsaki & Draguhn, 2004; Bartos *et al.*, 2007; Cardin *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 2012). Los astrocitos presentan receptores GABA_B funcionales capaces de responder con elevaciones de Ca²⁺ intracelular a GABA liberado por las neuronas inhibitoras y, en respuesta, liberan gliotransmisores (Fraser *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2006; Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2011; Losi *et al.*, 2014). De esta manera, la actividad de las interneuronas GABAérgicas inicia la señal de Ca²⁺ en los astrocitos locales e induce la liberación de gliotransmisores. Sin embargo, todavía no se ha llegado a un consenso sobre cuál es el gliotransmisor liberado tras la activación de los receptores de GABA_B.

Kang *et al.* (1998), mostraron que las elevaciones de los niveles de Ca²⁺ citoplasmático inducidas a través de la activación de receptores GABA_B están relacionadas con un aumento de la transmisión sináptica GABAérgica en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo. Este aumento de la transmisión sináptica inhibitoria está mediada por la liberación de glutamato desde los astrocitos que impacta en las interneuronas y activa receptores de kainato (receptores ionotrópicos de glutamato) (Kang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2004). De este modo, la señal de Ca²⁺ en los astrocitos mediada por la activación de receptores GABA_B induce la liberación de glutamato y un aumento de la probabilidad de liberación del neurotransmisor GABA sobre las neuronas piramidales de CA1. Por tanto, la señal de Ca²⁺ en los astrocitos iniciada por la activación de receptores GABA_B induce un aumento de la inhibición en el hipocampo.

Por otro lado, los astrocitos activados por GABA pueden también liberar ATP, que media la depresión heteroneuronal de la transmisión excitatoria en el hipocampo (Zhang *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006). Éste fenómeno consiste en la depresión de la transmisión sináptica de sinapsis inactivas inducida por una estimulación de alta frecuencia de diferentes sinapsis dentro de la misma neurona, y se ha propuesto que su función podría ser servir como mecanismo de contraste entre las entradas sinápticas estimuladas y las no estimuladas (Lynch *et al.*, 1977). Por ejemplo, en el hipocampo, una estimulación tetánica en un conjunto de Colaterales de Schaffer induce la depresión de las sinapsis no estimuladas en la misma neurona piramidal de CA1. Se ha propuesto que la depresión heterosináptica se debe a mecanismos de señalización complejos que involucran la actividad concertada de astrocitos y neuronas. Durante la estimulación de las Colaterales de Schaffer, el glutamato liberado por los terminales sinápticos no sólo activa la neurona piramidal, sino que también activa

interneuronas inhibitoras GABAérgicas (Zhang *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2006). La liberación del neurotransmisor GABA activa receptores GABA_B en los astrocitos, los cuales estimulan la señal de Ca²⁺ intracelular y la liberación del gliotransmisor ATP, el cual, tras ser transformado a adenosina por ectonucleotidasas extracelulares, activa receptores de adenosina (A₁) y da lugar a una depresión de la transmisión sináptica en sinapsis adyacentes que no habían sido estimuladas (Zhang *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2006).

II. OBJETIVOS

Los endocannabinoides (eCBs) desempeñan un papel fundamental en la función cerebral y han sido generalmente relacionados con mecanismos de depresión sináptica tanto a corto como a largo plazo (Wilson & Nicoll, 2001; Piomelli, 2003; Chevalleyre & Castillo, 2004; Chevalleyre *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2007). Mientras los eCBs liberados por las neuronas median sus efectos a distancias cortas (< 20 μm) (Wilson & Nicoll, 2001; Piomelli, 2003; Chevalleyre & Castillo, 2004; Chevalleyre *et al.*, 2006), sus posibles efectos a larga distancia sobre la plasticidad sináptica a través de la estimulación de la red de astrocitos se desconocen.

La demostración de que los astrocitos de hipocampo expresan receptores CB1 funcionales capaces de inducir aumentos de los niveles de Ca^{2+} y la liberación de glutamato (Navarrete & Araque, 2008), sugiere que los astrocitos están directamente involucrados en la señalización intercelular mediada por eCBs, así como en sus consecuencias funcionales sobre la transmisión sináptica. De hecho, estudios recientes han mostrado que la señalización neurona-astrocito mediada por eCBs conlleva la regulación sináptica en sinapsis de hipocampo y corteza (Navarrete & Araque, 2010; Min & Nevian, 2012). Además, los receptores CB1 presentes en los astrocitos median una LTD inducida por cannabinoides exógenos que produce una disfunción de la memoria de trabajo espacial (Han *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconocen las consecuencias y mecanismos moleculares subyacentes a la señalización por eCBs sobre la potenciación sináptica a largo plazo mediante la estimulación de astrocitos.

Por ello el primer objetivo propuesto es **el estudio del efecto de la señalización por endocannabinoides sobre la plasticidad sináptica a través de la activación de astrocitos.**

El segundo objetivo es **identificar los mecanismos de señalización subyacentes a la regulación de la plasticidad sináptica mediada por astrocitos.**

La modulación de la transmisión sináptica mediada por astrocitos mediante la liberación de gliotransmisores ha sido descrita en numerosas regiones cerebrales, y resulta un fenómeno novedoso y de potencial relevancia funcional (Perea & Araque, 2010; Min *et al.*, 2012; Araque *et al.*, 2014; Perea *et al.*, 2014a). La liberación de glutamato, D-serina, ATP y adenosina por los astrocitos ha sido demostrada tanto en rodajas de cerebro de ratón y rata como *in vivo* tras la activación de receptores de neurotransmisores presentes en los astrocitos (Pascual *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007; Perea & Araque, 2007; Henneberger *et al.*, 2010; Navarrete & Araque, 2010; Takata *et al.*, 2011; Min & Nevian, 2012; Navarrete *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce si un único astrocito libera distintos tipos de gliotransmisores o, por el contrario, existen subpoblaciones de astrocitos especializados en la síntesis y liberación de

gliotransmisores específicos.

Por tanto, el tercer objetivo propuesto es **el estudio de los procesos celulares responsables de la liberación de distintos gliotransmisores por los astrocitos.**

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DECLARACIÓN ÉTICA.

Todos los procedimientos para el manejo y sacrificio de los animales siguieron las Guías de la Comisión Europea (2010/63/EU) y del Comité de cuidado y uso de animales de la Universidad de Minnesota (IACUC). Los protocolos fueron supervisados por los veterinarios oficiales del Instituto Cajal y la Universidad de Minnesota.

2. PREPARACIÓN DE RODAJAS DE HIPOCAMPO DE RATÓN.

Las rodajas de hipocampo se obtuvieron de ratones C57BL/6 de entre 12 y 21 días de edad. En algunos casos se utilizaron también ratones transgénicos *knockout* para los receptores CB1 o IP₃R2 donados generosamente por los Doctores A. Zimmer y J. Chen, respectivamente (Zimmer *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005). Los animales fueron decapitados y el cerebro fue expuesto por craneotomía. El cerebro se extrajo rápidamente y se colocó en una cámara de corte con líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) previamente enfriado en hielo y burbujeado con carbógeno (95% O₂/5% CO₂). Se hicieron rodajas transversales de 350 µm con la ayuda de un vibrátomo Leica VT1200S (Leica, Alemania) y se incubaron a temperatura ambiente (20 – 25 °C) burbujeando permanentemente con carbógeno durante al menos 30 minutos en LCA antes de ser utilizadas. A continuación, las rodajas se transfirieron a una cámara de registro de inmersión con un volumen de 1.5 - 2 ml donde se perfundieron a una velocidad de 2 ml/min con LCA burbujeado con carbógeno. Las células se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50WI (Olympus Optical, Japón) equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC), objetivos de 10 y 40x de inmersión en agua y una cámara CCD Hamamatsu C4742-95 (Hamamatsu photonics, Japón) sensible a la luz infrarroja.

El LCA contenía (en mM): NaCl 124, KCl 3, KH₂PO 1.25, MgSO₄ 2, NaHCO₃ 26, CaCl₂ 2 y glucosa 10 y se burbujeó continuamente con carbógeno (95% O₂/5% CO₂) para mantener el pH (7.3 - 7.4). En algunos casos el pH del LCA se ajustó añadiendo NaCl (1M) tras su preparación.

Para investigar la LTP mediada por eCBs se añadió al LCA Picrotoxina (50 µM), un bloqueante del canal asociado a los receptores GABA_A (receptor ionotrópico involucrado en la transmisión sináptica inhibitoria), y CGP55845 5 µM, antagonista de los receptores GABA_B (receptor metabotrópico involucrado en la transmisión inhibitoria por segundos mensajeros). De esta manera se aislaron y registraron las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs, del

inglés *Excitatory Postsynaptic Currents*).

3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Se realizaron registros electrofisiológicos de neuronas piramidales de CA1 e interneuronas del *Stratum Radiatum* usando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell* y en la modalidad de fijación de voltaje. Las pipetas de registro se fabricaron a partir de capilares de borosilicato con filamento interno (OD-ID: 1.5-0.86 mm; Sutter Instrument Co., EE.UU.). Los capilares de registro tenían una resistencia de 3 - 10 M Ω y se llenaron con la solución intracelular que contenía (en mM): K-Gluconato 135, KCl 10, HEPES-K 10, MgCl 1, ATP-Na²⁺ 2 (el pH fue ajustado a 7.3 - 7.4 añadiendo KOH; la osmolaridad fue de 280 - 290 mOsm/l).

Los registros de membrana se obtuvieron con amplificadores PC-ONE (Dagan Instruments, EE.UU.). Las capacitancias rápida y lenta de la membrana celular fueron neutralizadas y la resistencia en serie fue compensada (alrededor de 70%). El potencial de membrana de las células se mantuvo a -70 mV. Las resistencias en serie y de acceso fueron monitorizadas a lo largo de los experimentos aplicando un pulso de voltaje de -5 mV durante 5 ms. Los experimentos se consideraron estables cuando las resistencias en serie y de acceso, el potencial de membrana en reposo y el artefacto de estimulación no cambiaban más de un 20% a lo largo del experimento. Las células que no cumplían estos criterios fueron descartadas. Las señales fueron filtradas a 1 KHz y transferidas con una frecuencia de muestreo de 10 KHz a un ordenador con procesador Pentium IV a través de una tarjeta de conversión analógico-digital DigiData 1440 (Axon Instruments, EE.UU.). Las señales obtenidas fueron filtradas con un HumBug (Quest Scientific Instruments Inc., Canadá) para eliminar el ruido eléctrico proveniente de la corriente alterna (50 - 60 Hz). Para la generación de estímulos, adquisición y almacenamiento de datos se empleó el programa pCLAMP 10.2 (Axon Instruments, EE.UU.).

En algunos experimentos se registraron astrocitos empleando capilares de 4-9 M Ω de resistencia y llenados con una solución intracelular que contenía (en mM): KMeSO₄ 100, KCl 50, HEPES-K 10, ATP-Na²⁺ 2 (el pH se ajustó a 7.3 - 7.4 con KOH; la osmolaridad fue de 280 - 290 mOsm/l).

Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (20 – 25 °C) a no ser que se

especifique lo contrario. Los experimentos a 30 – 35 °C se realizaron haciendo pasar el LCA por un calentador (Warner Instruments Co., EE.UU.) colocado antes de la cámara de registro. Con estos experimentos no se obtuvieron resultados diferentes a los realizados a temperatura ambiente (Figura 8).

4. ESTIMULACIÓN SINÁPTICA MÍNIMA.

La estimulación de las Colaterales de Schaffer se realizó mediante estimulación bipolar utilizando dos electrodos de plata clorurados (Ag/AgCl) incluidos de manera independiente en un capilar septado (TST 150-6, World Precision Instruments Inc., EE.UU.) con un diámetro en la punta del electrodo de aproximadamente 5 μm . Los capilares se llenaron con solución extracelular y se conectaron a un estimulador (S-900, DAGAN Corporation, EE.UU.) y a una unidad de aislamiento del estímulo (S-910, DAGAN Corporation, EE.UU.) y se colocaron en el *Stratum Radiatum* del hipocampo para estimular las Colaterales de Schaffer. La intensidad del estímulo (0.1 - 10 mA) se ajustó para conseguir las condiciones en las que se estimulaban una o muy pocas fibras presinápticas (Raastad, 1995; Isaac *et al.*, 1996; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Navarrete *et al.*, 2012). Los registros que no mostraban estabilidad en las corrientes basales fueron descartados.

Se aplicaron pares de pulsos de 2 ms de duración cada uno separados por un intervalo de 50 ms, estos pulsos se aplicaron continuamente a lo largo de los experimentos a una frecuencia de 0.33 Hz. Los parámetros sinápticos analizados fueron:

- **Probabilidad de liberación:** relación entre el número de aciertos con respecto al número total de estímulos.
- **Eficacia sináptica:** amplitud promedio de todas las respuestas incluyendo fallos.
- **Potencia sináptica:** amplitud promedio de los aciertos.
- **Facilitación por pares de pulsos (FPP = 2º EPSC/1º EPSC).**

La amplitud del EPSC fue determinada como el máximo de corriente (entre 2 - 10 ms después del estímulo) menos el promedio de la corriente basal (20 - 30 ms antes del estímulo). La corriente se consideró un acierto (éxito en la liberación de neurotransmisor desde el terminal presináptico) cuando la amplitud era mayor que 3 veces la desviación estándar de la corriente basal. La ausencia de EPSC fue considerada como un fallo en la liberación de

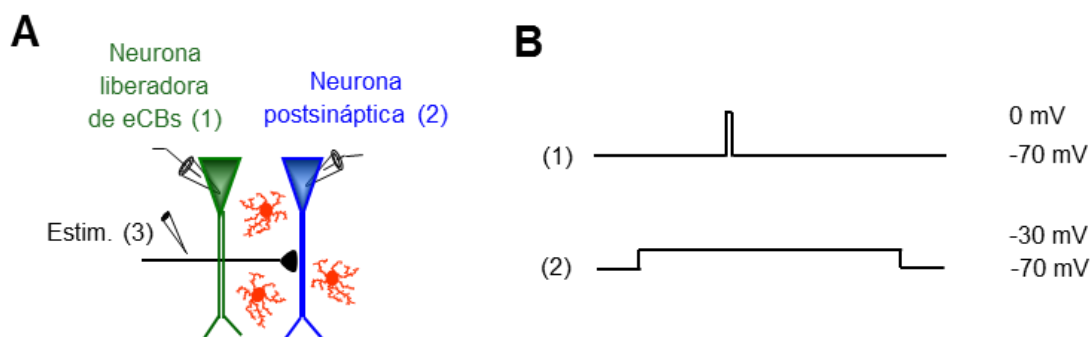
neurotransmisor en el terminal presináptico (Raastad, 1995; Isaac *et al.*, 1996; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Navarrete *et al.*, 2012). La clasificación de aciertos y fallos se realizó visualmente siguiendo este criterio.

5. PARADIGMAS DE ESTIMULACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.

ESTUDIO DE LA LTP MEDIADA POR ENDOCANNABINOIDES (eLTP):

En este trabajo las sinapsis no fueron seleccionadas en función de si eran susceptibles o no a la modulación de la transmisión sináptica y los datos corresponden al promedio de todas las sinapsis registradas en cada condición. Se aplicaron los siguientes paradigmas de estimulación:

- **Despolarizaciones pareadas:** la llamada *neurona postsináptica* se despolarizó a -30 mV durante 3 minutos para imitar actividad postsináptica. Tras el primer minuto de la despolarización a -30 mV, se aplicó un paradigma de *despolarización neuronal (DN)* sobre la llamada *neurona liberadora de eCBs* que consistió en despolarizar dicha neurona a 0 mV durante 5 segundos para inducir la liberación de eCBs (Figura 3) (Kreitzer & Regehr, 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevaleyre & Castillo, 2004; Navarrete & Araque, 2008; 2010). La estimulación de las Colaterales de Schaffer se interrumpió durante el paradigma de despolarizaciones pareadas y se continuó tras éste.



- **Theta burst stimulation (TBS):** el paradigma de estimulación constó de 4 trenes a 5 Hz de 4 estímulos (a 40 Hz) aplicados 10 veces cada 10 segundos aplicado con una pipeta de estimulación independiente a la utilizada para estimular las corrientes sinápticas en las Colaterales de Schaffer. La independencia de las vías estimuladas con la estimulación de la sinapsis única y con el paradigma de TBS se confirmó estimulando ambas fibras con un intervalo de 50 ms. En estas condiciones se comprobó la ausencia de facilitación por pares de pulsos en los EPSCs correspondientes. El paradigma de TBS se aplicó por debajo del umbral de inducción de potenciales de acción para despolarizar la neurona postsináptica de manera sináptica, para ello el registro de la neurona se cambió del modo de fijación de voltaje al modo de fijación de corriente durante toda la estimulación (Figura 4). El paradigma de TBS se aplicó solo y 20 minutos después se repitió pareándolo con la liberación de eCBS (50 segundos tras el comienzo de dicho paradigma, la neurona liberadora de eCBS fue despolarizada a 0 mV durante 5 segundos (Kreitzer & Regehr, 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevaleyre & Castillo, 2004; Navarrete & Araque, 2008; 2010)).

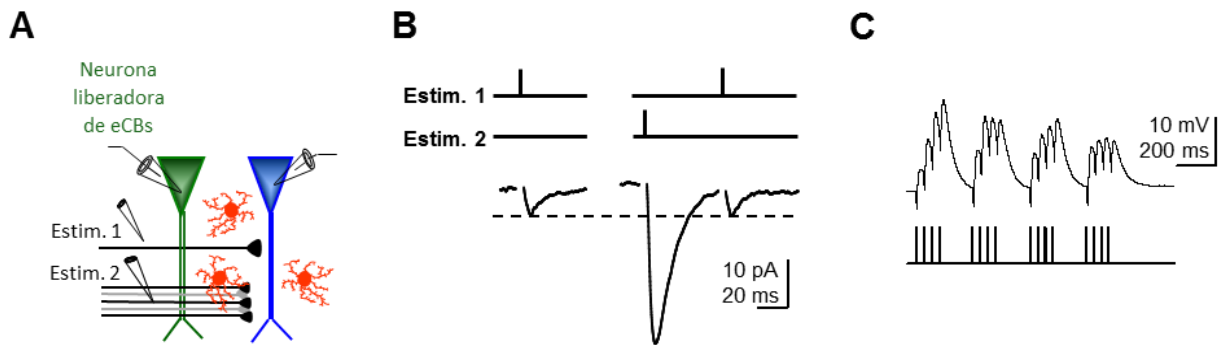


Figura 4. Paradigma de Theta Burst Stimulation (TBS). **A)** Esquema del diseño experimental mostrando el registro simultáneo de las dos neuronas piramidales y las pipetas de estimulación mínima (1) y de aplicación del paradigma de TBS (2). **B)** Arriba, esquema donde se representa el paradigma de estimulación con el que se comprobó que las vías estimuladas con ambos estimuladores eran independientes. Abajo, trazos representativos obtenidos con dicho paradigma. **C)** Arriba, trazos representativos obtenidos con el paradigma de TBS y abajo el paradigma de estimulación.

- **Corriente lenta de K^+ activada por Ca^{2+} (sl_{AHP}):** se indujo mediante pulsos despolarizantes de 200 ms de duración (de -60 mV a 20 mV). La magnitud de la corriente se cuantificó como el área bajo el trazo de corriente medido entre 60 y 100 ms tras el final del pulso (Martin *et al.*, 2001).

Los cambios en la plasticidad sináptica fueron determinados promediando las corrientes sinápticas obtenidas de 180 estímulos antes y 60 minutos después del estímulo (i.e., despolarización de la neurona liberadora de eCBs, aplicación del paradigma de TBS o foto-estimulación de astrocitos). Para ilustrar el curso temporal de la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica, los parámetros sinápticos fueron agrupados en conjuntos de 3 minutos (60 estímulos).

ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE GLIOTRANSMISORES:

Al igual que el apartado anterior, el diseño experimental se basó en la estimulación de sinapsis únicas (Raastad, 1995; Isaac *et al.*, 1996; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Navarrete *et al.*, 2012). Sin embargo, en este caso el objetivo era estudiar la posible liberación de diferentes gliotransmisores capaces de modular una única sinapsis, por lo que las sinapsis no moduladas por astrocitos no eran de nuestro interés y, por tanto, se excluyeron de los promedios.

Para investigar la capacidad de los astrocitos de liberar varios gliotransmisores se utilizaron los siguientes protocolos:

- **Estimulación de alta frecuencia (HFS, del inglés High Frequency Stimulation):** se trató de una estimulación tetánica para la cual se administraron 3 trenes de 100 Hz de 1 segundo de duración aplicados cada 30 segundos en vías de las Colaterales de Schaffer independientes a las estimuladas con la estimulación mínima. Al igual que para el paradigma de TBS, la independencia de las vías se confirmó estimulado ambas con un intervalo de 50 ms para comprobar que no hubiera facilitación por pares de pulsos en los EPSCs resultantes (Figura 4B). Para determinar los cambios sinápticos tras la aplicación del paradigma de HFS se compararon las respuestas sinápticas obtenidas durante los 5 minutos previos al estímulo con las respuestas sinápticas obtenidas durante los 2 minutos de mayor efecto del gliotransmisor sobre la transmisión sináptica, en una ventana temporal de 5 minutos tras el estímulo. Para determinar el patrón de disparo de las interneuronas como respuesta al paradigma de estimulación de HFS se registraron interneuronas del *Stratum Radiatum* en la modalidad de *cell attached* y se midieron la frecuencia de disparo de potenciales de acción y el intervalo entre espigas (ISI, del inglés *Interspike interval*). Para determinar el ISI se empleó la siguiente relación: $ISI = ISI_n / ISI_0$, donde ISI_0 es el intervalo entre la primera y la segunda espiga; y donde ISI_n es el intervalo entre cada espiga.

- **Despolarización neuronal (DN):** consistió en la despolarización a 0 mV durante 5 segundos de una neurona piramidal de CA1 para inducir la liberación de eCBs (Kreitzer & Regehr, 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevaleyre & Castillo, 2004; Navarrete & Araque, 2008; 2010). Tras la DN los cambios sinápticos se determinaron comparando las respuestas sinápticas registradas durante 3 minutos antes de aplicar el estímulo con las respuestas obtenidas durante el minuto de máximo efecto sobre la transmisión sináptica, en una ventana temporal de 2 minutos tras aplicar el estímulo.
- **Tren de despolarizaciones de interneuronas:** se registraron interneuronas en el *Stratum Radiatum* del hipocampo. Durante el tren de despolarizaciones las interneuronas se registraron en el modo de fijación de corriente y se hicieron disparar potenciales de acción mediante pulsos despolarizantes aplicados a 1, 10, 20, 30 o 50 Hz durante 90 segundos. Para determinar la frecuencia deseada, las interneuronas fueron despolarizadas durante 13 ms y repolarizadas de manera que disparasen un único potencial de acción durante cada despolarización (Figura 5). Los experimentos a 20 Hz se realizaron también despolarizando las interneuronas durante 100 ms, 1, 30 o 60 segundos. Durante toda la duración del tren de despolarizaciones la transmisión sináptica fue monitorizada en la neurona piramidal a 0.33 Hz. Para determinar los cambios sinápticos cuando se aplicó el tren de despolarizaciones sobre la interneurona se compararon las respuestas sinápticas registradas durante 5 minutos antes del estímulo con las registradas durante los 30 segundos de máximo efecto sobre la transmisión sináptica durante la estimulación y con las respuestas sinápticas obtenidas durante los 2 minutos siguientes a la finalización del estímulo.

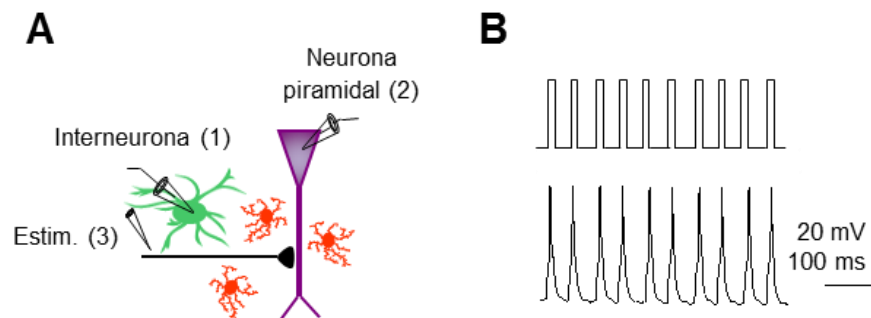


Figura 5. Tren de despolarizaciones de interneuronas. **A)** Esquema donde se representan los electrodos de registro de la interneurona (1) y de la neurona piramidal (2), así como la pipeta de estimulación (3). **B)** Paradigma de despolarizaciones de interneuronas a 20 Hz y sus trazos resultantes. Este protocolo se aplicó durante 90 segundos a no ser que se especifique lo contrario.

Para ilustrar el curso temporal de la modulación de la transmisión sináptica inducida por la liberación de gliotransmisores, los parámetros sinápticos se agruparon en conjuntos de 1 minuto. Durante el tren de despolarizaciones de las interneuronas o durante la foto-estimulación de astrocitos los parámetros sinápticos se agruparon en conjuntos de 30 segundos.

Las interneuronas registradas fueron clasificadas según su patrón y frecuencia de disparo siguiendo la clasificación de Petilla (Petilla Interneuron Nomenclature *et al.*, 2008). Para ello se determinó el ISI para cada una de ellas y se clasificaron según el siguiente criterio: ISI < 1.5: *fast spiking*; ISI 1.5 - 2: *non-adapting/non-fast spiking*; ISI > 2: *adapting*. De las interneuronas registradas un 30.9% fueron *fast spiking*, un 34% fueron *non-adapting/non-fast spiking* y un 35.1% fueron *adapting*. La modulación de la transmisión sináptica fue independiente del tipo de interneurona registrada, por lo que todos los datos fueron agrupados conjuntamente.

6. MONITORIZACIÓN DE Ca²⁺ EN LOS ASTROCITOS.

Los niveles de Ca²⁺ en los astrocitos localizados en el *Stratum Radiatum* de la región de CA1 del hipocampo se monitorizaron utilizando microscopía de fluorescencia para visualizar el indicador de Ca²⁺ Fluo4 (Molecular Probes, EE.UU.). Esta molécula es excitable a longitudes de onda dentro del espectro visible, presentando un máximo de excitación a λ_{exc} 494 nm y máximo de emisión a λ_{em} 506 nm. El fluoróforo Fluo4 resulta una herramienta adecuada para detectar cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular debido a que a bajas concentraciones de Ca²⁺ la sonda Fluo4 apenas emite fluorescencia, sin embargo su señal de fluorescencia puede aumentar > 100 veces en presencia de altas concentraciones de Ca²⁺. Las rodajas se incubaron con Fluo4-AM durante 45 - 60 minutos a temperatura ambiente (2 μ l de Fluo4-AM se aplicaron sobre las rodajas de hipocampo en LCA, alcanzando una concentración final de 7.6 μ M y 0.066% de ácido plurónico). En estas condiciones la mayoría de las células cargadas fueron astrocitos (Kang *et al.*, 1998; Parri *et al.*, 2001; Araque *et al.*, 2002; Nett *et al.*, 2002; Perea & Araque, 2005), como se confirmó en algunos casos por sus propiedades electrofisiológicas, esto es, falta de disparo de potenciales de acción, relación corriente/voltaje lineal y baja resistencia de acceso (Kang *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2008).

Los astrocitos se monitorizaron usando una cámara CCD (Hamamatsu photonics, Japón). Las células fueron iluminadas durante 100 - 500 ms con una lámpara de xenón a 490 nm usando

un monocromador Polychrome V (T.I.L.L. Photonics, Alemania) o con un LED a 470 nm (Prior Scientifics, EE.UU.), y las imágenes se obtuvieron cada 1 o 2 segundos. El Polychrome V y la cámara CCD se controlaron y sincronizaron usando el software IPLab (BD Biosciences, EE.UU.), la cámara CCD y el LED se sincronizaron con el software MetaMorph (Molecular Devices, EE.UU.). Las medidas cuantitativas de epifluorescencia se realizaron con los softwares IPLab o ImageJ.

La señal de Ca^{2+} de los astrocitos en el *Stratum Radiatum* se monitorizó en las células localizadas en un radio de 150 μm alrededor de la célula estimulada (neurona piramidal o interneurona) y perpendicular al *Stratum Pyramidale*. Las variaciones de Ca^{2+} , denominadas *espigas de Ca^{2+}* , se registraron en el soma de las células y se estimaron como el cambio de fluorescencia sobre la señal de fluorescencia basal usando la siguiente relación: $F-F_0*100/F_0$, donde F es la fluorescencia obtenida en cada secuencia y F_0 es el promedio de fluorescencia basal obtenido de 5 - 10 secuencias antes del estímulo. A los valores de fluorescencia se les restó la señal de fondo correspondiente a procesos de autofluorescencia de las células y uniones no específicas de la sonda Fluo4 con otros elementos.

La señal de Ca^{2+} en los astrocitos fue cuantificada como la probabilidad de ocurrencia de una espiga de Ca^{2+} , lo cual fue calculado como el número de elevaciones de Ca^{2+} (espigas de Ca^{2+}) agrupadas en conjuntos de 5 segundos y registradas en 5 a 25 astrocitos presentes en el campo de visión. El tiempo de cada elevación se consideró en el comienzo de dicha espiga de Ca^{2+} cuando la $F-F_0*100/F_0$ fue mayor de 3 veces la desviación estándar de la fluorescencia basal (fluorescencia obtenida promediando 5 – 10 secuencias antes del estímulo). Se consideró que las células respondían al estímulo cuando la señal $F-F_0*100/F_0$ fue mayor de 3 veces la desviación estándar de la fluorescencia basal al menos en 2 imágenes consecutivas durante los 15 segundos siguientes al comienzo del estímulo.

7. ESTIMULACIÓN DE ASTROCITOS POR FOTÓLISIS CON LUZ ULTRAVIOLETA.

En determinados experimentos se utilizaron técnicas de foto-estimulación de agentes quelantes de Ca^{2+} , conocidos como jaulas de Ca^{2+} , con las que se consiguió aumentar rápidamente los niveles de Ca^{2+} intracelular en un solo astrocito. Como agente quelante de Ca^{2+} se utilizó el o-nitrofenil EGTA (NP-EGTA; Molecular Probes, EE.UU.). La molécula NP-EGTA presenta una alta afinidad por Ca^{2+} que disminuye drásticamente (hasta 12.000 veces) después de la foto-estimulación con luz UV, permitiendo de este modo el incremento de Ca^{2+} en el

espacio intracelular (Liu *et al.*, 2004; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2008; Navarrete *et al.*, 2012).

Para los experimentos de foto-estimulación, se registraron astrocitos usando pipetas llenas con la solución intracelular de astrocitos que contenía además 5 mM NP-EGTA y 50 μ M Fluo4 para monitorizar los niveles de Ca^{2+} . Para los experimentos donde se estudió la plasticidad sináptica mediada por eCBs la foto-estimulación se realizó mediante trenes de pulsos (1 ms de duración a 6 - 15 mW) de luz UV (340 - 380 nm) a 1 Hz durante 10 segundos. La luz UV se aplicó en el soma y los procesos del astrocito registrado con una ventana óptica de 15 - 25 μ m de diámetro usando un sistema de fotólisis (Rapp OptoElectronic, Alemania). Para los experimentos donde se estudió el efecto de la liberación de gliotransmisores sobre la transmisión sináptica la estimulación con luz UV se aplicó durante 90 segundos utilizando un LED a 370 nm (Prior Scientifics, EE.UU.). Los experimentos control se realizaron aplicando la foto-estimulación con luz UV sobre astrocitos sin llenar con NP-EGTA, en estos casos no se observó ningún aumento en la señal de Ca^{2+} en los astrocito ni ningún cambio en los parámetros sinápticos (Figura 32C).

8. DROGAS Y REACTIVOS.

N-(Piperidin-1-il)-5(4-iodofenil)-1(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (AM-251), clorhidrato de piridina 2-Metil-6-(feniletinil) (MPEP), (S)-(+)-ácido α -Amino-4-carboxi-2-metilbenzeneacético (LY367385), ácido (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Diclorofenil)etil]amino-2-hidroxiopropil]](fenilmetil)fosfónico (CGP 55845) y Bisindolilmaleimida 1 (BIS I) fueron adquiridos a Tocris Cookson (Bristol, Reino Unido), Fluo4-AM, Fluo4 *cell impermeant*, o-nitrofenil EGTA sal tetrapotasio (NP-EGTA), Texas Red y Alexa Fluor 488 a Molecular Probes (Eugene, EE.UU.) y (S)-3,5-DHPG a Ascent Scientific (Bristol, Reino Unido). Todas las demás drogas y reactivos fueron suministrados por Sigma.

9. 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 y 12.5. La medida de

florescencia en los astrocitos y el tratamiento de las imágenes de Ca^{2+} se realizaron con los programas ImageJ y Photoshop 7.0.

Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM) indicándose en cada caso el número de datos (n). Los datos se analizaron utilizando el test paramétrico *t de Student*. Las diferencias significativas se representaron de la siguiente manera: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***) .

IV. RESULTADOS

1. SEÑALIZACIÓN POR ENDOCANNABINOIDES EN ASTROCITOS Y PLASTICIDAD SINÁPTICA.

Los endocannabinoides (eCBs) juegan un papel clave en la función cerebral actuando como neuromoduladores de la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal. Los eCBs son reconocidos como mensajeros retrógrados que median la depresión de la transmisión sináptica (Wilson & Nicoll, 2001; Piomelli, 2003; Chevalleyre & Castillo, 2004; Chevalleyre *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2007). Sus efectos conocidos sobre la modulación de la plasticidad sináptica son fundamentalmente inducir depresión sináptica a largo plazo (Chevalleyre & Castillo, 2004; Safo & Regehr, 2005; Peterfi *et al.*, 2012), y su capacidad para inducir potenciación de la transmisión sináptica a largo plazo (LTP) se desconoce. Estudios recientes han mostrado que el sistema endocannabinoide potencia la transmisión sináptica de manera transitoria a través de la estimulación de astrocitos en sinapsis relativamente lejanas (Navarrete & Araque, 2010). Dicha potenciación se debe a la liberación de glutamato por los astrocitos y la activación de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 1 (mGluR₁) en el terminal presináptico. Así mismo, la coincidencia de la señalización por astrocitos y la actividad postsináptica induce una potenciación a largo plazo de la liberación de neurotransmisor a través de la activación de mGluRs, también en el terminal presináptico (Perea & Araque, 2007; Navarrete *et al.*, 2012). Por todo ello, nos propusimos estudiar si los eCBs inducen plasticidad sináptica y potencian la transmisión sináptica glutamatérgica a largo plazo a través de la activación de la red astrocitaria cuando coincide con actividad en la neurona postsináptica.

EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE POTENCIA A LARGO PLAZO LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR EN SINAPSIS HETERONEURONALES:

Para investigar si el sistema endocannabinoide induce potenciación a largo plazo a través de la activación de la red astrocitaria se registraron pares de neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo (> 60 μm de distancia entre ellas), se midieron los niveles de Ca^{2+} en los astrocitos, y se monitorizó la transmisión sináptica evocada en las Colaterales de Schaffer usando la técnica de estimulación mínima que activa una o muy pocas sinapsis (ver Materiales y métodos; Figura 6A) (Raastad, 1995; Isaac *et al.*, 1996; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Navarrete *et al.*, 2012). Se usó el siguiente *paradigma de despolarizaciones pareadas*: una neurona (denominada *neurona liberadora de eCBs*, y cuyas sinapsis se denominaron *sinapsis homoneuronales*) fue despolarizada a 0 mV durante 5 segundos para estimular la liberación de eCBs (Kreitzer & Regehr, 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevalleyre & Castillo, 2004; Navarrete & Araque, 2008; 2010) y se monitorizó la actividad sináptica en la otra neurona (denominada *neurona postsináptica*, y cuyas sinapsis se

denominaron *sinapsis heteroneuronales*) que, a su vez, fue ligeramente despolarizada a -30 mV para imitar la actividad postsináptica (ver Materiales y métodos; Figura 3) (cf. (Perea & Araque, 2007)). Nuestro estudio se centró únicamente en las sinapsis heteroneuronales, ya que las sinapsis homoneuronales, tras la liberación de eCBs, experimentan una depresión de la transmisión sináptica mediada por la activación de receptores CB1 presinápticos (Figura 10 (Kreitzer & Regehr, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevaleyre *et al.*, 2006; Navarrete & Araque, 2010)).

El paradigma de despolarizaciones pareadas indujo una potenciación de larga duración de la transmisión sináptica en 8 de 12 sinapsis heteroneuronales (66.6% de las sinapsis registradas). La eficacia sináptica aumentó de -4.8 ± 0.6 pA a -7.8 ± 1.7 pA ($n = 12$; $P = 0.016$), como resultado de un aumento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor (de 0.50 ± 0.05 a 0.69 ± 0.06 ; $n = 12$; $P = 0.021$) sin cambios en la potencia sináptica (de -11.1 ± 0.9 pA a -11.7 ± 1.5 pA; $n = 12$; $P = 0.719$) (Figura 6B, 6D). Además, los cambios estaban asociados con una disminución en la facilitación por pares de pulsos (FPP, de 1.52 ± 0.11 a 1.27 ± 0.16 ; $n = 8$; $P = 0.015$; Figura 6C). Estos resultados indican que la potenciación de la transmisión sináptica a largo plazo se debe a un mecanismo de generación presináptico, lo cual es consistente con un aumento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor pero no de la potencia sináptica (Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010).

A pesar de que el mecanismo de generación de la LTP es presináptico, cuando cada una de las despolarizaciones se produjeron por separado no se observaron cambios en los parámetros sinápticos (sólo despolarización postsináptica $n = 6$ y sólo liberación de eCBs $n = 8$; Figura 6D), indicando que la actividad de ambas neuronas es necesaria para que se produzca la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica. Por tanto, estos datos sugieren que para la generación de la LTP es necesaria la producción de un mensajero retrógrado que se libere de la neurona postsináptica y ejerza su acción en el terminal presináptico.

Consistente con un mecanismo de acción presináptico es el hecho de que la LTP no pudo ser bloqueada en presencia de AP5 (50 μ M), un antagonista de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) ($n = 10$; Figura 8). Estos datos indican que los receptores de NMDA no están involucrados en este tipo de plasticidad sináptica. Por tanto, no se trata de un mecanismo clásico de plasticidad o plasticidad Hebbiana, la cual está mediada por la activación de receptores NMDA en el terminal postsináptico y la inserción de receptores AMPA en la sinapsis, siendo un mecanismo puramente postsináptico (Collingridge *et al.*, 1983; Luscher *et al.*, 1999).

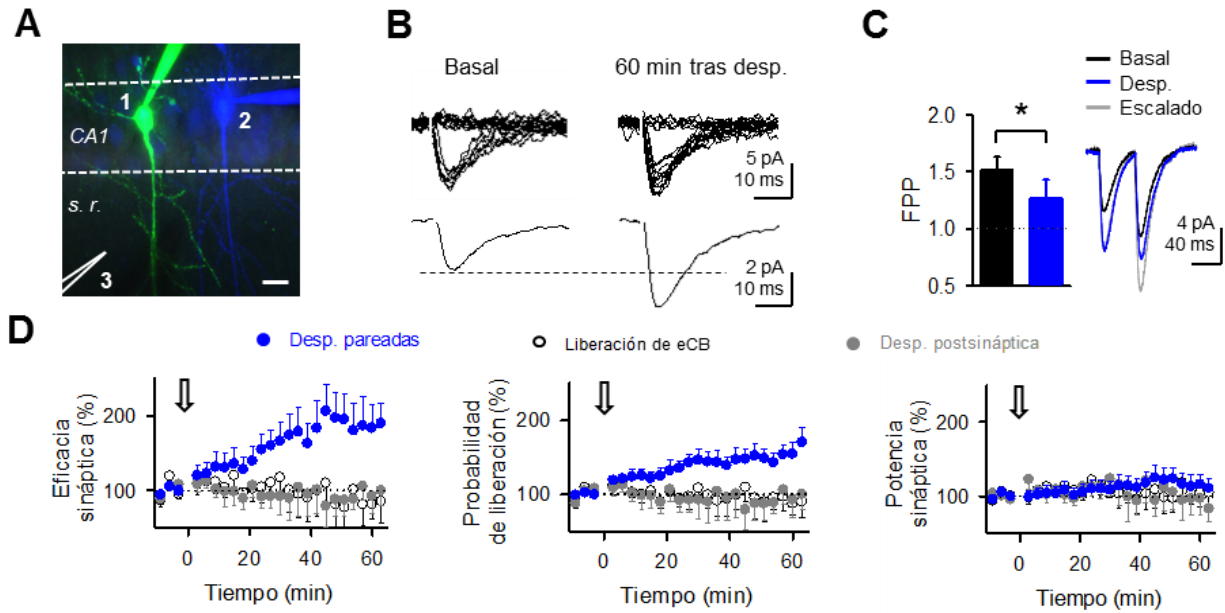


Figura 6. El paradigma de despolarizaciones pareadas induce una LTP en sinapsis de CA3-CA1. **A)** Imagen de falso color donde se muestran dos neuronas piramidales de CA1, una llenada con Alexa 488 (1, verde) y otra con Sulforodamina B (2, azul), así como el electrodo de estimulación (3). Barra de escala: 10 μm . s. r.: Stratum Radiatum. **B)** Trazos representativos inducidos por la estimulación mínima (20 trazos; panel superior) y sus trazos promedio (panel inferior) antes (Basal) y 60 minutos tras aplicar el paradigma de despolarizaciones pareadas. **C)** Índice de facilitación por pares de pulsos (FPP) y sus trazos representativos antes (negro) y después (azul) del paradigma de despolarizaciones pareadas. El trazo gris representa el trazo escalado a partir del basal del basal. **D)** Parámetros sinápticos a lo largo del tiempo cuando se aplicó el paradigma de despolarizaciones pareadas, sólo el paradigma de liberación de eCBs o la despolarización postsináptica.

A continuación se comprobó si la LTP está mediada por eCBs. Para ello se aplicó el paradigma de despolarizaciones pareadas en presencia un antagonista de receptores CB1 (AM251, 2 μM) o en rodajas de cerebro obtenidas del ratón transgénico *knockout* para los receptores CB1. En ambos casos la LTP fue bloqueada ($n = 5$ y 6 , respectivamente; Figura 7), indicando que los cambios a largo plazo de la transmisión sináptica están mediados por la coincidencia de la señalización por eCBs con la actividad postsináptica. En conjunto, estos resultados indican que los eCBs liberados por la neurona de liberadora de eCBs desencadenan una potenciación a largo plazo (eLTP) de la liberación de neurotransmisor en sinapsis heteroneuronales de neuronas relativamente distantes ($> 60 \mu\text{m}$) cuando coinciden con actividad postsináptica.

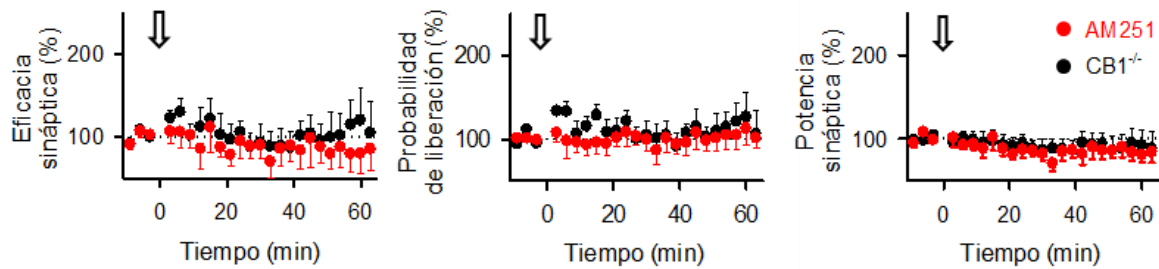
A

Figura 7. La LTP está mediada por la activación de receptores CB1. A) Parámetros sinápticos frente al tiempo cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó en presencia de AM251 o en el ratón transgénico CB1^{-/-}.

La temperatura afecta a la difusión de los eCBs en el cerebro (Kreitzer & Regehr, 2002). Por este motivo se comprobó el efecto de la temperatura sobre la potenciación a largo plazo mediada por eCBs. Sin embargo, la potenciación sináptica observada en los experimentos realizados a 30 – 32 °C no mostró diferencias significativas con respecto a la observada en situación control a temperatura ambiente (Figura 8).

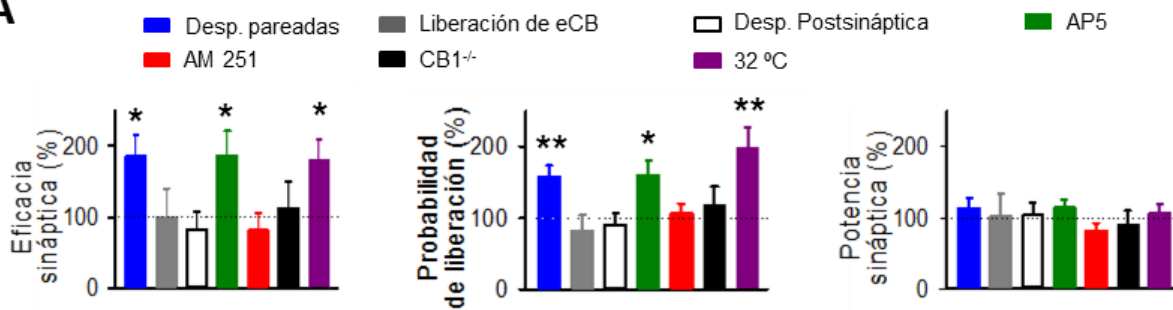
A

Figura 8. Resumen del efecto del paradigma de despolarizaciones pareadas aplicado bajo distintas condiciones. A) Cambio en los parámetros sinápticos 60 minutos tras aplicar el protocolo de despolarizaciones pareadas en situación control, cuando las despolarizaciones fueron aplicadas por separado, en presencia de AP5, en presencia de AM251, en el ratón transgénico CB1^{-/-} o cuando los experimentos se realizaron a 32 °C.

Para comprobar si la potenciación sináptica a largo plazo puede ser inducida bajo condiciones más fisiológicas se utilizó un paradigma de inducción diferente. En lugar de despolarizar la neurona postsináptica a -30 mV artificialmente, se estimularon vías de las Colaterales de Schaffer independientes a las estimuladas con la estimulación mínima usando un

paradigma denominado *Theta Burst Stimulation* (TBS, 4 trenes a 5 Hz de 4 estímulos a 40 Hz fueron aplicados 10 veces a 0.1 Hz) (ver Materiales y métodos Figura 4, 9A). El paradigma de TBS fue aplicado a intensidades que despolarizaban la neurona postsináptica por debajo del umbral de disparo de potenciales de acción. Además, estos experimentos se realizaron en presencia del antagonista de receptores NMDA (AP5 50 μ M) para evitar un fenómeno de plasticidad sináptica clásica (Collingridge *et al.*, 1983; Luscher *et al.*, 1999). Por sí mismo, el paradigma de estimulación de TBS no provocó potenciación sináptica, pero sí cuando éste se aplicó de manera coincidente con la liberación de eCBs ($n = 6$; Figura 9B-D). Estos resultados indican que la eLTP puede ser inducida bajo condiciones más fisiológicas de actividad postsináptica.

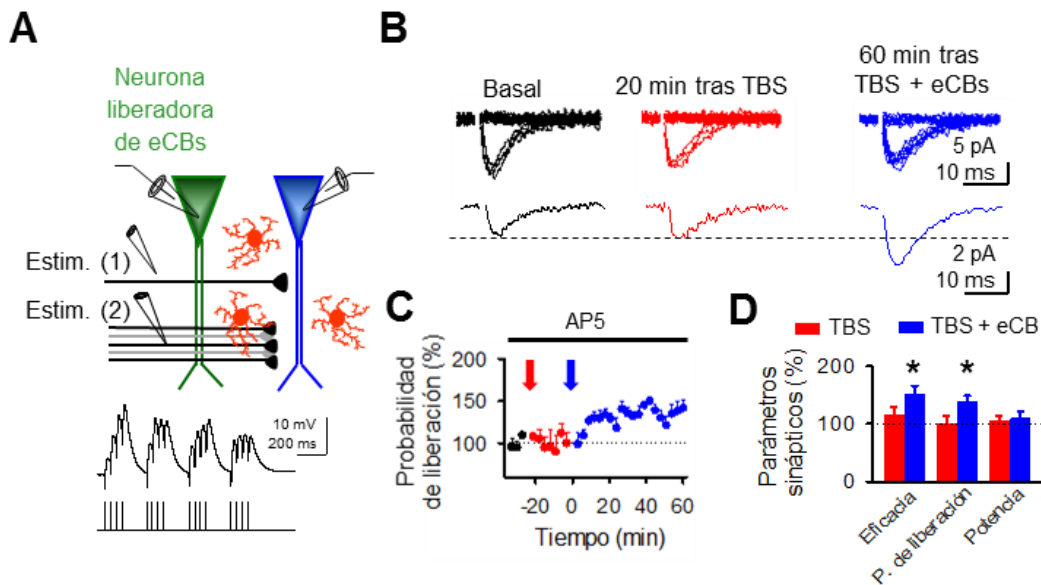


Figura 9. La eLTP puede ser inducida bajo condiciones más fisiológicas. **A)** Dibujo esquemático del modelo experimental donde se muestran los registros dobles y los dos electrodos de estimulación, así como los trazos obtenidos con el paradigma de TBS. **B)** Trazos representativos evocados por la estimulación mínima (20 trazos; paneles superiores) y sus trazos promedio (paneles inferiores) antes (negro), 20 minutos tras aplicar el paradigma de TBS (rojo) y 60 minutos tras parear el paradigma de TBS con la liberación de eCBs (azul). **C)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo. La flecha roja indica la aplicación del paradigma de TBS; la flecha azul indica la aplicación del paradigma de TPS pareado con la liberación de eCBs. **D)** Cambio en los parámetros sinápticos 20 minutos tras la aplicación del paradigma de TBS y 60 minutos tras parear el paradigma de TBS con la liberación de eCBs.

LA eLTP REQUIERE ELEVACIONES DE Ca²⁺ EN LOS ASTROCITOS:

Los eCBs liberados por una neurona piramidal deprimen la neurotransmisión a través la activación directa de receptores CB1 en el terminal presináptico en las sinapsis cercanas (< 20 μm; (Wilson & Nicoll, 2001; Piomelli, 2003; Chevalleyre & Castillo, 2004; Chevalleyre *et al.*, 2006)), por lo que la depresión de la transmisión sináptica se encuentra restringida a un área cercana a la fuente de eCBs. Además de la depresión sináptica, los eCBs pueden también activar receptores CB1 en los astrocitos cercanos (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Navarrete *et al.*, 2014), los cuales pueden elevar sus niveles de Ca²⁺ intracelular y expandirla a otros procesos celulares o quizás también a otras células, induciendo así la liberación de glutamato a regiones relativamente distantes (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Covelo & Araque, 2015). La liberación de glutamato iniciada por la señalización por eCBs sobre los astrocitos conlleva un aumento transitorio de la neurotransmisión en sinapsis relativamente lejanas que no sufren el efecto directo de la inhibición sináptica (Navarrete & Araque, 2010). Por tanto, se investigó el posible papel de los astrocitos en la generación de eLTP a través de las elevaciones de Ca²⁺ mediadas por la activación de receptores CB1.

Con este objetivo se usaron rodajas de hipocampo del ratón transgénico *knockout* para los receptores de IP₃ de tipo 2 (ratones IP₃R2^{-/-}) (Li *et al.*, 2005). Estos receptores son los principales receptores de IP₃ funcionales expresados en los astrocitos y se encargan de la movilización de Ca²⁺ intracelular mediada por la activación de proteínas G (Petraovicz *et al.*, 2008; Di Castro *et al.*, 2011; Takata *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012; Perez-Alvarez *et al.*, 2014).

En primer lugar, se comprobó si la liberación de eCBs provocada por la despolarización neuronal se encuentra afectada en estos ratones transgénicos, para ello se monitorizó la DSE en sinapsis homoneuronales. La DSE es un fenómeno bien conocido de depresión de la transmisión sináptica mediado por receptores CB1 presinápticos (Kreitzer & Regehr, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevalleyre *et al.*, 2006; Navarrete & Araque, 2010). La amplitud de DSE observada en rodajas de cerebro obtenidas de ratones IP₃R2^{-/-} no fue significativamente diferente a la observada en ratones de genotipo silvestre (WT, del inglés *Wild Type*) (n = 6 y 6, respectivamente, Figura 10), indicando que la maquinaria de síntesis y liberación de eCBs, así como los receptores CB1 son funcionales en los ratones IP₃R2^{-/-}.

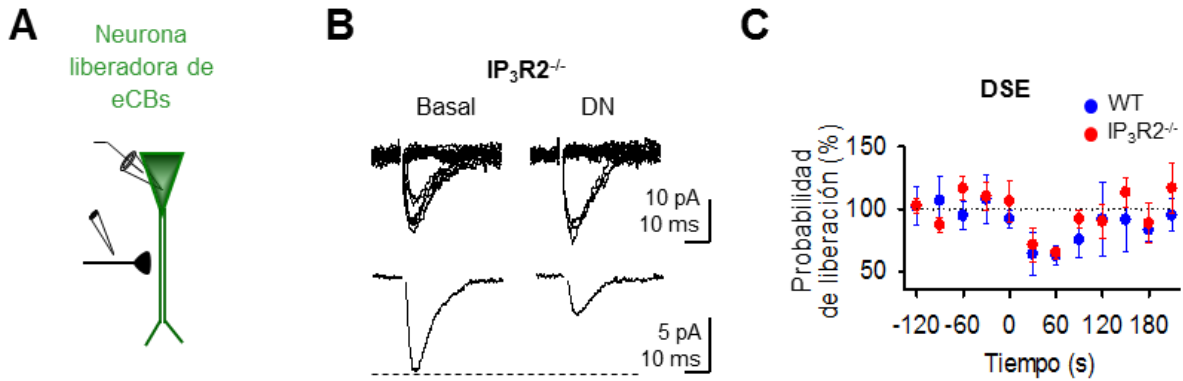


Figura 10. Los ratones transgénicos $IP_3R2^{-/-}$ liberan eCBs. A) Dibujo esquemático del modelo experimental. **B)** Trazos representativos inducidos por la estimulación mínima (20 trazos; panel superior) y sus trazos promedio (panel inferior) antes (Basal) y después de la despolarización neuronal (DN) en rodajas de cerebro obtenidas del ratón transgénico $IP_3R2^{-/-}$. **C)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo en el ratón WT y en el ratón $IP_3R2^{-/-}$.

Aunque el sistema endocannabinoide se encuentra conservado en el ratón transgénico $IP_3R2^{-/-}$, la despolarización neuronal indujo la elevación de Ca^{2+} citoplasmático en los astrocitos de rodajas de cerebro obtenidas de ratones WT (47 de 74 astrocitos de 8 rodajas; cf. (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Perez-Alvarez *et al.*, 2014)), pero no en las rodajas de cerebro obtenidas del ratón $IP_3R2^{-/-}$ (1 de 55 astrocitos de 8 rodajas mostró elevaciones de Ca^{2+}) (Figura 11), confirmando que las elevaciones de Ca^{2+} intracelular en los astrocitos inducidas por eCBs están mediadas por la activación del receptor de IP_3 de tipo 2 (Petraovicz *et al.*, 2008; Di Castro *et al.*, 2011; Takata *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012; Perez-Alvarez *et al.*, 2014).

Acorde con estos datos, el paradigma de despolarizaciones pareadas que indujo potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica en el ratón WT no indujo cambios sinápticos a largo plazo en el ratón $IP_3R2^{-/-}$ ($n = 8$; Figura 12). Por tanto, estos resultados indican que las elevaciones de Ca^{2+} en los astrocitos son necesarias para la inducción de la potenciación sináptica a largo plazo mediada por eCBs.

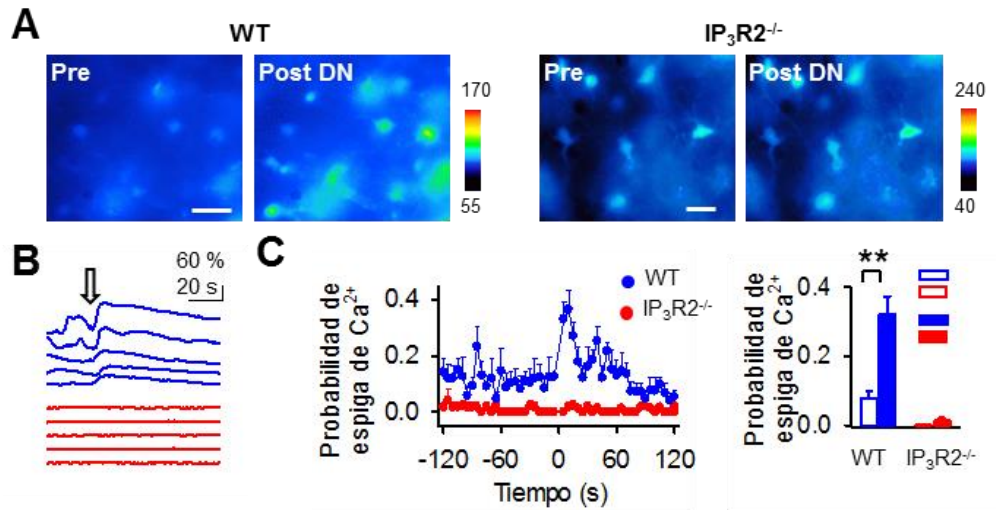


Figura 11. Los eCBs inducen elevaciones de calcio intracelular en los astrocitos mediadas por la activación del receptor de IP₃ de tipo 2. **A)** Imágenes de pseudocolor de los niveles de fluorescencia de la sonda Fluo4 antes (pre) y después (post DN) de la liberación de eCBs en el ratón WT y en el ratón IP₃R2^{-/-}. Barra de escala: 20 μm. **B)** Trazos representativos de la señal relativa de calcio obtenidos de astrocitos del ratón WT (azul) y del ratón IP₃R2^{-/-} (rojo). **C)** A la izquierda, probabilidad de que ocurra una espiga de Ca²⁺ frente al tiempo. A la derecha, probabilidad de que ocurra una espiga de Ca²⁺ antes y después de la liberación de eCBs en ambos ratones.

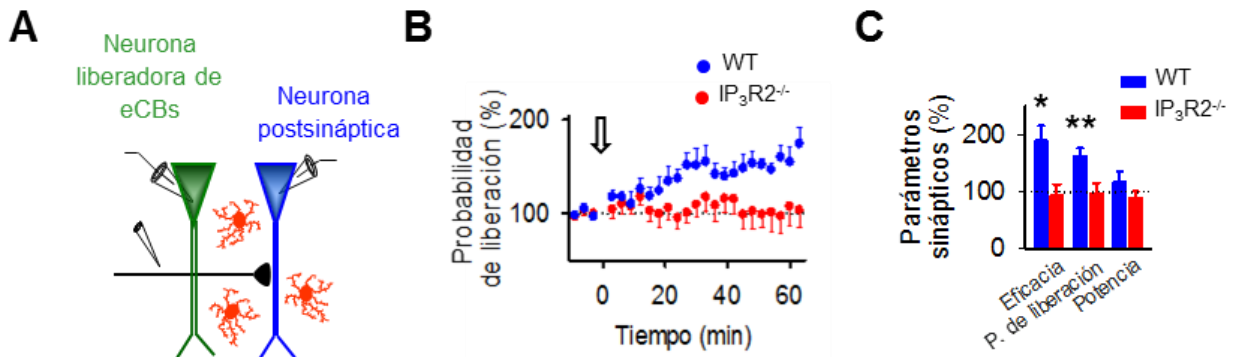


Figura 12. La eLTP requiere la elevación de los niveles de Ca²⁺ en los astrocitos. **A)** Dibujo esquemático del modelo experimental donde se muestran las neuronas de registro y el electrodo de estimulación. **B)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó en el ratón WT y en el ratón IP₃R2^{-/-}. **C)** Cambio en los parámetros sinápticos en el ratón WT y en el ratón IP₃R2^{-/-} tras aplicar el paradigma de despolarizaciones pareadas.

Para confirmar el papel de la señal de Ca^{2+} intracelular de los astrocitos inducida por eCBs sobre la generación de la eLTP, se estimularon los astrocitos independientemente de la señalización por eCBs. Para ello se llenaron los astrocitos con NP-EGTA (5 mM), una jaula de Ca^{2+} que bajo iluminación con luz ultravioleta (UV) eleva los niveles de Ca^{2+} en el astrocito de manera reproducible tanto en las rodajas de cerebro obtenidas de ratones WT como en las obtenidas de ratones $\text{IP}_3\text{R}2^{-/-}$ (Figura 13A,B) (Liu *et al.*, 2004; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Navarrete *et al.*, 2012). Pareando la foto-estimulación con luz UV con la despolarización postsináptica (a -30 mV) se consiguió inducir una potenciación a largo plazo de la liberación de neurotransmisor tanto en el ratón WT como en el ratón $\text{IP}_3\text{R}2^{-/-}$ (n = 6 y 6, respectivamente, Figura 13C,D; cf. (Perea & Araque, 2007)). Estos resultados indican que el efecto de los eCBs sobre la potenciación sináptica a largo plazo puede ser sustituido por la elevación de Ca^{2+} inducida por foto-estimulación en el astrocito, y que las vías de señalización necesarias para la generación de la eLTP tras la señal de Ca^{2+} en el astrocito se encuentran conservadas en el ratón $\text{IP}_3\text{R}2^{-/-}$. Por tanto, la coincidencia de la actividad postsináptica con la señal de Ca^{2+} en los astrocitos es condición necesaria y suficiente para inducir una potenciación a largo plazo de la neurotransmisión.

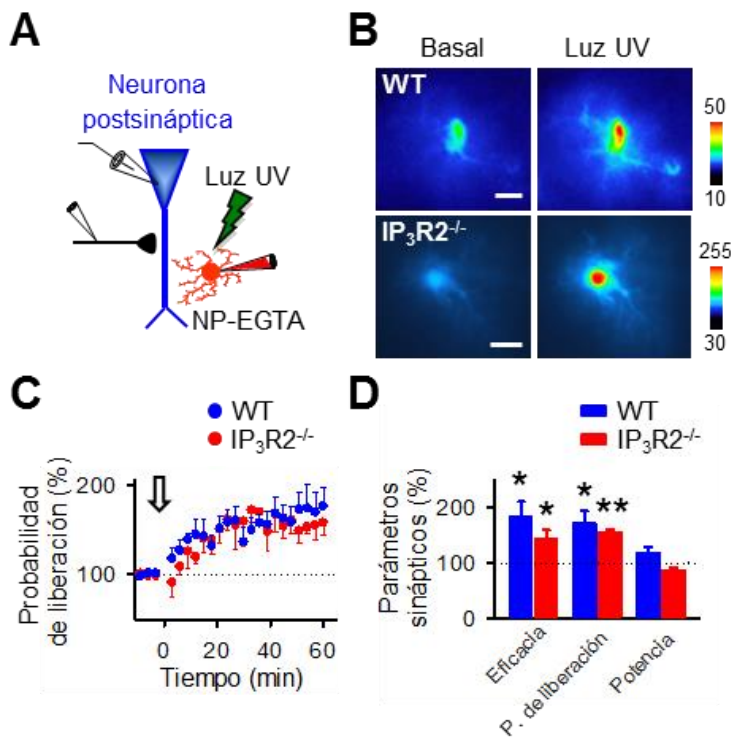


Figura 13. La eLTP es inducida pareando la señal de calcio en los astrocitos con la despolarización postsináptica. **A)** Dibujo esquemático del modelo experimental donde se muestra la neurona de registro, el electrodo de estimulación y el astrocito llenado con NP-EGTA. **B)** Imágenes en pseudocolor mostrando los niveles de Ca^{2+} en el astrocito antes (basal) y después (luz UV) de la foto-estimulación en el ratón WT y en el ratón $\text{IP}_3\text{R}2^{-/-}$. Barra de escala: 10 μm . **C)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo cuando el paradigma de foto-estimulación se aplicó en el ratón WT y en el ratón $\text{IP}_3\text{R}2^{-/-}$. **D)** Cambio en los parámetros sinápticos en el ratón WT y en el ratón $\text{IP}_3\text{R}2^{-/-}$ tras el paradigma de foto-estimulación.

Los datos presentados hasta el momento indican que para que ocurra la potenciación de la transmisión sináptica a largo plazo es necesaria la actividad de todos los elementos de la Sinapsis Tripartita. Esto es, i) es necesaria la elevación de Ca^{2+} en los **astrocitos**; ii) la **neurona postsináptica** debe ser despolarizada y iii) el mecanismo de acción es **presináptico**. Todo ello indica que para generar este tipo de plasticidad sináptica tanto el terminal postsináptico como los astrocitos deben liberar mensajeros cuya diana molecular se encuentra situada probablemente en el terminal presináptico.

SEÑALIZACIÓN POSTSINÁPTICA: LA eLTP REQUIERE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA NEURONA POSTSINÁPTICA:

Dado que la potenciación de la transmisión sináptica mediada por el sistema endocannabinoide se expresa presinápticamente como un incremento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor y requiere la despolarización postsináptica (Figura 6C,D), nos propusimos identificar la señal retrógrada que se libera desde la célula postsináptica y que impacta en el terminal presináptico.

Un posible candidato fue el óxido nítrico ya que puede ser liberado tanto por el terminal presináptico como por el postsináptico y ha sido relacionado con diferentes tipos de plasticidad sináptica en hipocampo, corteza, cerebelo y estriado (Schuman & Madison, 1991; Zhuo *et al.*, 1998; Bon & Garthwaite, 2003; Taqatqeh *et al.*, 2009). Aunque en cerebelo y estriado el óxido nítrico es liberado por el terminal presináptico e induce depresión a largo plazo de la transmisión sináptica (Bon & Garthwaite, 2003), en hipocampo y corteza es liberado postsinápticamente, induciendo potenciación a largo plazo de la neurotransmisión (Schuman & Madison, 1991; Zhuo *et al.*, 1998; Bon & Garthwaite, 2003; Taqatqeh *et al.*, 2009). Dada su naturaleza gaseosa y su gran permeabilidad, el óxido nítrico difunde fácilmente a través de la hendidura sináptica de manera retrógrada hasta el terminal presináptico, donde ejerce su efecto mediante la activación de guanilil ciclasa (Schuman & Madison, 1994).

Para comprobar el posible papel del óxido nítrico sobre la generación de la potenciación sináptica, las rodajas fueron incubadas con PTIO (100 μM), un secuestrador de óxido nítrico que permea a través de la membrana plasmática (Figura 14A). Bajo estas condiciones la señal de Ca^{2+} en los astrocitos inducida por la liberación de eCBs se encuentra conservada ($n = 98$ astrocitos de $n = 7$ rodajas; Figura 14B,C), sin embargo, el paradigma de despolarizaciones pareadas no indujo cambios en los parámetros sinápticos ($n = 6$; Figura 14D). Estos resultados indican que, además de la señal de Ca^{2+} en los astrocitos, la producción de óxido nítrico es necesaria para la generación de la potenciación sináptica a largo plazo mediada por eCBs.

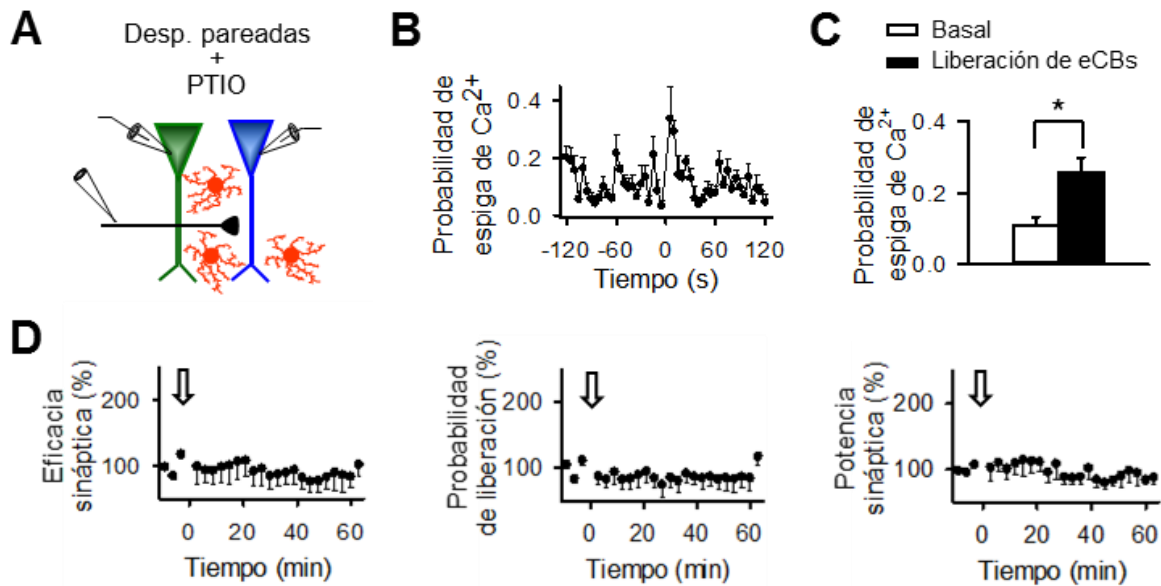


Figura 14. La eLTP requiere la producción de óxido nítrico. **A)** Dibujo esquemático donde se muestra el modelo experimental. **B)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} frente al tiempo. **C)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} antes (basal) y después (liberación de eCBs) de aplicar el paradigma de despolarizaciones pareadas en presencia de PTIO. **D)** Parámetros sinápticos frente al tiempo cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó en presencia de PTIO.

El óxido nítrico puede ser producido tanto en las neuronas piramidales como en los astrocitos. Para investigar qué tipo celular libera óxido nítrico bajo nuestras condiciones experimentales se incluyó L-NAME 100 μ M (un antagonista de la óxido nítrico sintasa que previene la producción de óxido nítrico) en la pipeta de registro de la neurona postsináptica o en la red local de astrocitos para prevenir la producción de óxido nítrico específicamente en la célula postsináptica o en los astrocitos, respectivamente (Figura 15A). Mientras que la señal de Ca^{2+} en los astrocitos inducida por la liberación de eCBs no se vio afectada al incluir L-NAME en la pipeta de registro de la neurona postsináptica ($n = 58$ astrocitos de $n = 5$ rodajas; Figura 15B,C), el paradigma de despolarizaciones pareadas no indujo cambios sinápticos a largo plazo (L-NAME_N; $n = 5$; Figura 15D). Sin embargo, cuando el L-NAME se incluyó en la red de astrocitos la eLTP no se vio afectada (L-NAME_A; $n = 11$; Figura 15D), indicando que la producción de óxido nítrico por los astrocitos no contribuye de manera significativa a la inducción de la potenciación sináptica a largo plazo. Por tanto, estos resultados sugieren que, además de la señal de Ca^{2+} en los astrocitos, la producción de óxido nítrico durante la actividad postsináptica es requerida para generar la potenciación de la liberación de neurotransmisor mediada por eCBs.

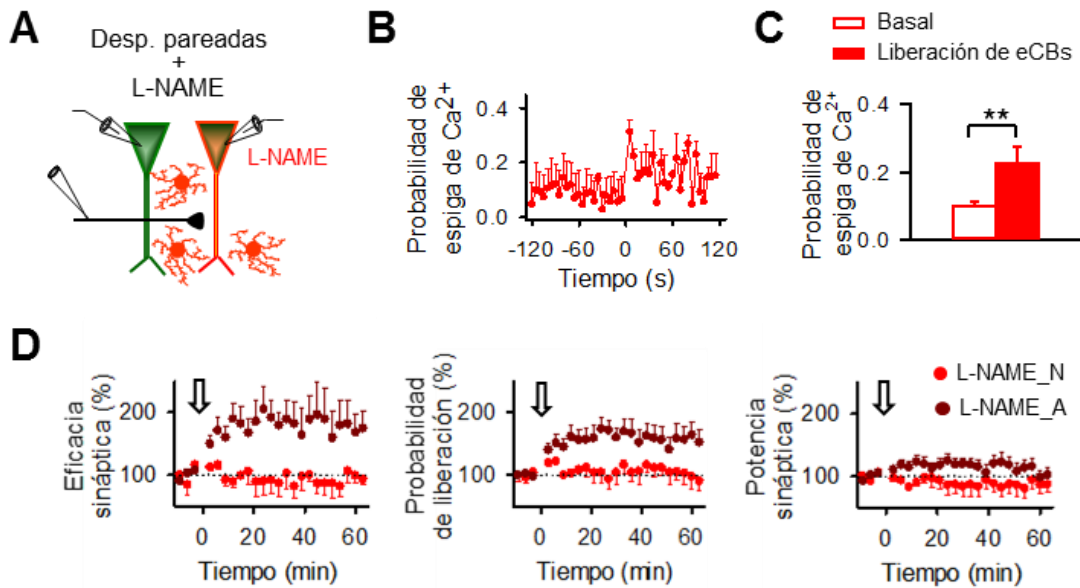


Figura 15. El óxido nítrico se produce en el terminal postsináptico. **A)** Dibujo esquemático donde se muestra el modelo experimental. **B)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} frente al tiempo. **C)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} antes (basal) y después (liberación de eCBs) de aplicar el paradigma de despolarizaciones pareadas en presencia de L-NAME en la pipeta de registro de la neurona postsináptica. **D)** Parámetros sinápticos frente al tiempo cuando el protocolo de despolarizaciones pareadas se aplicó en presencia de L-NAME en la neurona postsináptica (L-NAME_N) o en la red local de astrocitos (L-NAME_A).

Para elucidar si la producción de óxido nítrico en el terminal postsináptico es suficiente para inducir eLTP sin ninguna otra señal postsináptica adicional, se administró óxido nítrico directamente en ausencia de la despolarización postsináptica. Para ello se aplicó NONO-ato (100 μ M, un compuesto donante de óxido nítrico) mediante un pulso de presión (durante 180 segundos) a través de una micropipeta (Figura 16A). Mientras que la aplicación de NONO-ato por sí misma no produjo cambios en la transmisión sináptica ($n = 8$), al combinarla con la despolarización de la neurona liberadora de eCBs se generó eLTP en las sinapsis heteroneuronales ($n = 9$; Figura 16D). Estos resultados confirman que el óxido nítrico es el único mensajero retrógrado producido por la neurona postsináptica involucrado en la generación de la potenciación sináptica mediada por eCBs.

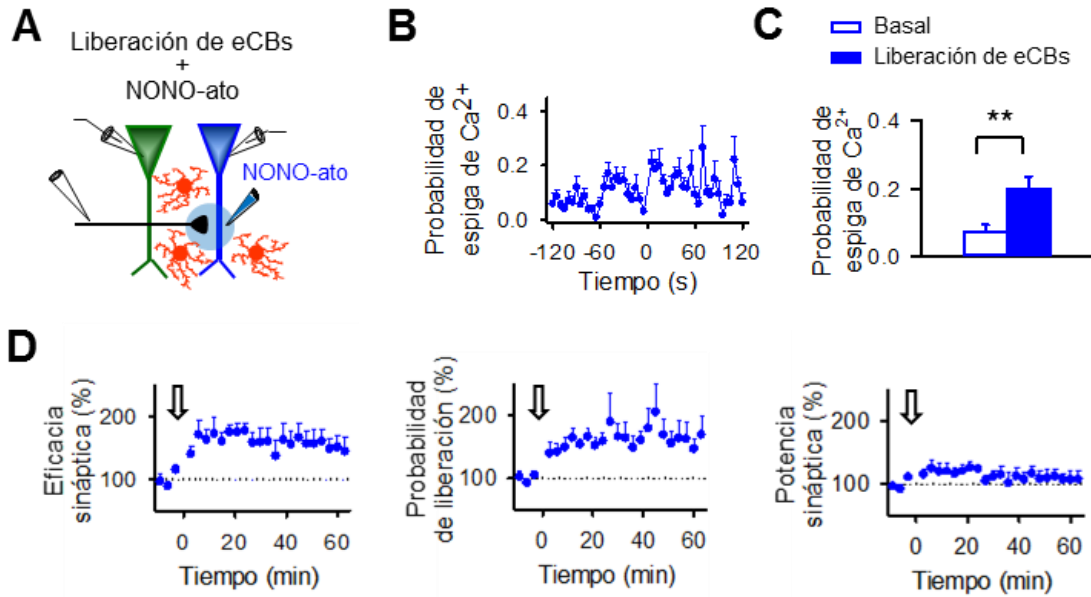


Figura 16. Parear la señalización por eCBs con la aplicación local de NONO-ato es suficiente para inducir eLTP. A) Dibujo esquemático donde se muestra el modelo experimental. **B)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} frente al tiempo. **C)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} antes (basal) y después (liberación de eCBs) de parear la liberación de eCBs con la aplicación de NONO-ato. **D)** Parámetros sinápticos frente al tiempo cuando se pareó la liberación de eCBs con la aplicación de NONO-ato.

Además, se investigó la posibilidad de que la liberación conjunta de óxido nítrico y eCBs por una única neurona pudiera inducir eLTP en las homosinapsis. Para ello se aplicó el paradigma de despolarizaciones pareadas sobre una única neurona, es decir, una despolarización suave a -30 mV seguida de 0 mV durante 5 segundos. Sin embargo, con este paradigma no se observaron cambios en la transmisión sináptica en estas neuronas ($n = 9$; Figura 17). Estos datos sugieren que la inducción de la potenciación sináptica a largo plazo es independiente de la coincidencia espacial de eCBs y óxido nítrico en las mismas sinapsis, sino que depende de la coincidencia temporal de ambas señales a través de la activación de astrocitos.

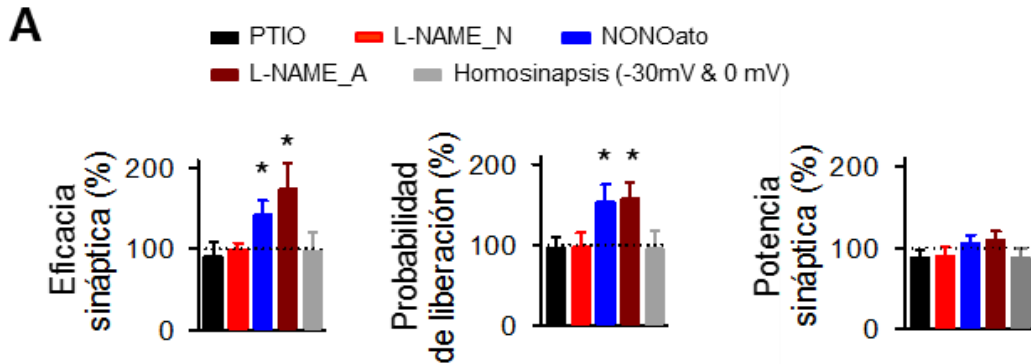


Figura 17. La producción de óxido nítrico en el terminal postsináptico es necesaria para inducir la eLTP. A) Cambios en los parámetros sinápticos cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó en presencia de PTIO, con L-NAME en la neurona postsináptica (L-NAME_N) o en la red de astrocitos (L-NAME_A), cuando la liberación de eCBs se pareó con la aplicación local de NONO-ato o cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó sobre una misma neurona (Homosinapsis (-30 mV & 0 mV)).

SEÑALIZACIÓN PRESINÁPTICA: LA eLTP ESTÁ MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE mGluRs Y PKC EN EL TERMINAL PRESINÁPTICO:

Tras identificar el mensajero retrógrado originado en la neurona postsináptica, investigamos los mecanismos moleculares presinápticos responsables de generar eLTP. La potenciación sináptica a largo plazo está mediada por la estimulación de astrocitos a través de receptores CB1. La activación de estos receptores en astrocitos se ha relacionado con la liberación de glutamato (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Min & Nevian, 2012) y la regulación de la transmisión sináptica glutamatérgica a través de la activación de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) (Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Navarrete *et al.*, 2012). De modo que se investigó el posible papel de estos receptores en la generación de la plasticidad sináptica mediada por eCBs y astrocitos. Para ello se aplicó el paradigma de despolarizaciones pareadas en presencia de los antagonistas de mGluR de grupo I MPEP (50 μ M) y LY367385 (100 μ M; antagonistas de mGluR₅ y mGluR₁ respectivamente). En estas condiciones no se observaron cambios a largo plazo en los parámetros sinápticos ($n = 8$, $P = 0.592$), sin embargo, la señal de Ca^{2+} inducida por eCBs en los astrocitos no se vio afectada ($n = 53$ astrocitos de $n = 5$ rodajas; cf. (Navarrete & Araque, 2010)). Estos resultados indican que tras la activación de receptores CB1 en los astrocitos, éstos liberan glutamato que activa mGluRs de grupo I, probablemente en el terminal presináptico (cf. (Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Navarrete *et al.*, 2012)).

En un conjunto de experimentos en los que no se despolarizó la neurona postsináptica (-30 mV) y se aplicó NONO-ato en presencia de MPEP (50 μ M) y LY367385 (100 μ M), no se observaron cambios significativos en los parámetros sinápticos, sugiriendo que la señalización por óxido nítrico no es suficiente para inducir eLTP y la activación de mGluR_{1/5} también es necesaria (Figura 18).

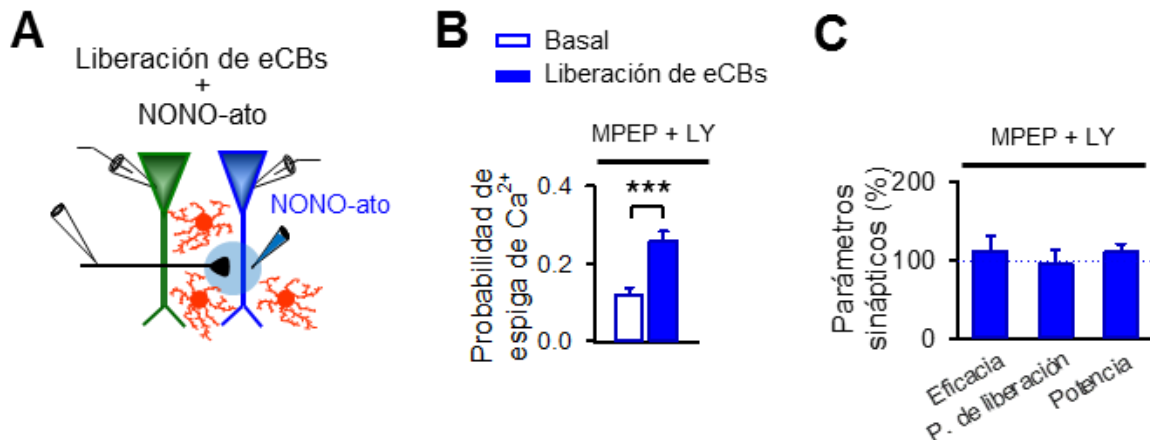


Figura 18. La activación de mGluRs de grupo I es necesaria para inducir la eLTP. A) Dibujo esquemático donde se muestra el modelo experimental. **B)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca²⁺ antes y después de la liberación de eCBs con la aplicación local de NONO-ato en presencia de MPEP + LY367385. **C)** Cambio en los parámetros sinápticos tras deparar la liberación de eCBs con la aplicación local de NONO-ato en presencia de MPEP + LY367385.

A continuación, se investigó el subtipo de mGluR involucrado en la generación de la potenciación de la transmisión sináptica a largo plazo mediante la perfusión de los antagonistas de los subtipos de mGluR de grupo I por separado (Figura 19). Mientras que el antagonista de mGluR₁ (LY367385 100 μ M) bloqueó la generación de eLTP (Figura 19A–C) sin modificar la señal de Ca²⁺ en los astrocitos (n = 91 astrocitos de n = 6 rodajas; Figura 19D–F), el antagonista de mGluR₅ (MPEP 50 μ M) no bloqueó los cambios sinápticos a largo plazo (Figura 19B–F). Estos datos indican que la generación de eLTP está mediada específicamente por la activación de mGluR₁.

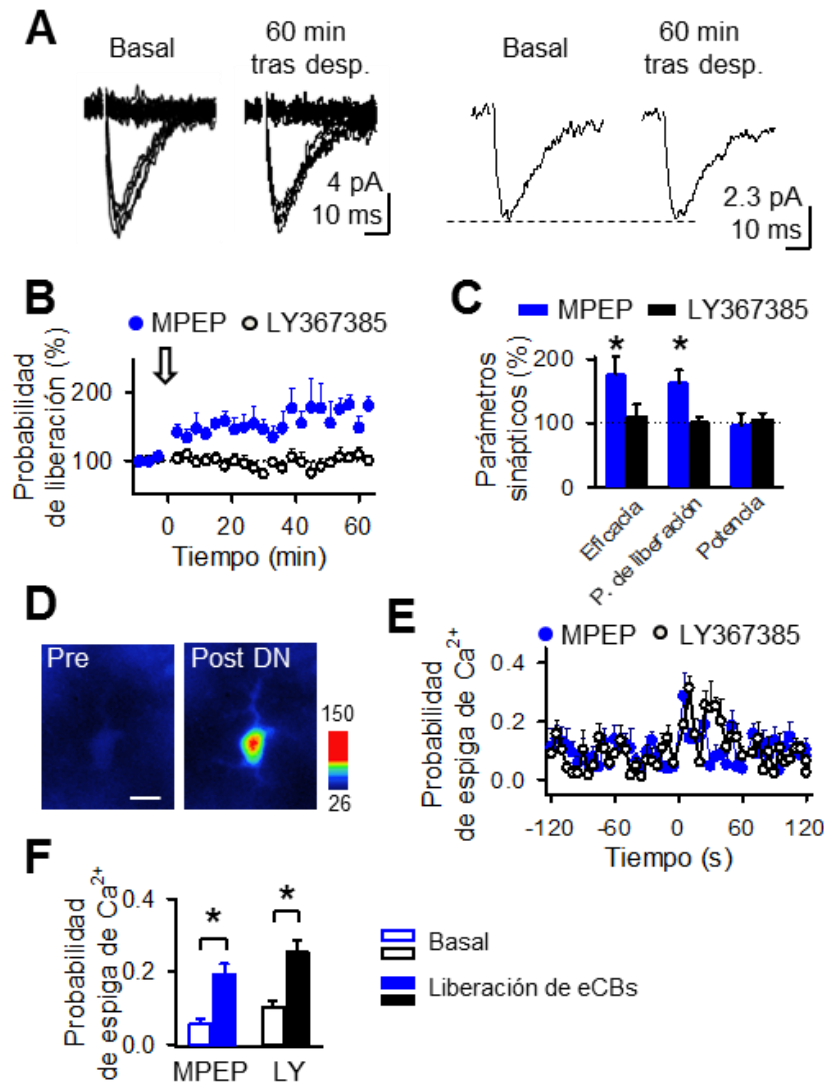


Figura 19. La eLTP está mediada por la activación de mGluR1. **A)** Trazos representativos antes (basal) y 60 minutos después de aplicar el paradigma de despolarizaciones pareadas en presencia de LY367385 (izquierda) y sus trazos promedio (derecha). **B)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo en presencia de MPEP o de LY367385. **C)** Cambio en los parámetros sinápticos en presencia de MPEP o de LY367385. **D)** Imágenes de pseudocolor de un astrocyto cargado con Fluo4-AM antes (Pre) y después (Post DN) de aplicar el paradigma de despolarizaciones pareadas en presencia de LY367385. Barra de escala: 10 μm . **E)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} frente al tiempo en presencia de MPEP o de LY367385. **F)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} antes (basal) y después (liberación de eCBs) de aplicar el paradigma de despolarizaciones pareadas en presencia de MPEP o de LY367385.

Los cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor y la facilitación por pares de pulsos indican que potenciación de la neurotransmisión está mediada por la activación de mGluRs en el terminal presináptico. Para comprobar la posible contribución de mGluRs postsinápticos a la generación de eLTP, se añadió GDP β S (2 mM; un compuesto estable análogo a GDP capaz de inhibir la actividad de proteínas G) en la pipeta de registro de la neurona postsináptica para prevenir la cascada de señalización intracelular generada por la activación de mGluR (Turner *et al.*, 1986; Miyazaki, 1988; Navarrete & Araque, 2010).

La eficacia del GDPβS para bloquear la cascada de señalización intracelular de receptores metabotrópicos se confirmó comprobando las respuestas de Ca²⁺ neuronales ante la aplicación local de DHPG (2 mM; agonista específico de mGluRs de grupo I) o ACh (1 mM) (Figura 20A). Mientras que en situación control se observaron elevaciones de Ca²⁺ en todas las neuronas (18 de 18 neuronas control), únicamente 3 de 20 neuronas cargadas con GDPβS mostraron elevaciones de Ca²⁺ (Figura 20B-D). Estos datos indican que el GDPβS es capaz de evitar la señalización intracelular generada por la activación de receptores metabotrópicos (cf. (Turner *et al.*, 1986; Miyazaki, 1988; Navarrete & Araque, 2010)).

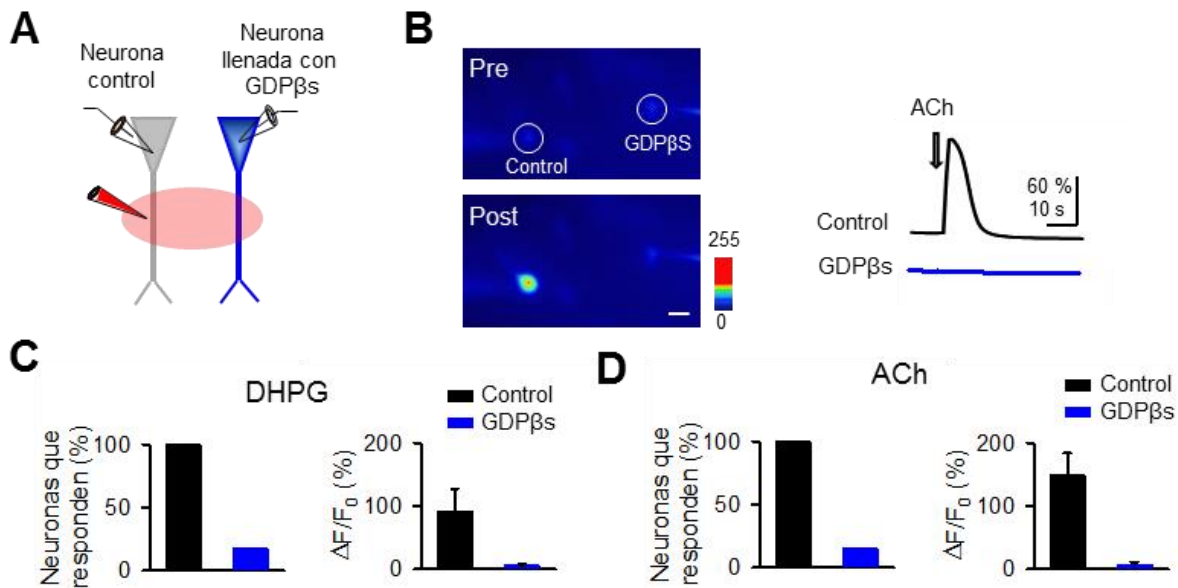


Figura 20. El GDPβS bloquea la cascada de señalización intracelular desencadenada por la activación de receptores metabotrópicos. **A)** Esquema ilustrativo del modelo experimental. **B)** A la izquierda, imágenes de pseudocolor de dos neuronas llenadas con Fluo4, una en condiciones control y otra llenada con GDPβS, antes (Pre) y después (Post) de la aplicación de ACh. Barra de escala: 20 μm. A la derecha, trazos de calcio relativo de dichas neuronas tras la aplicación de ACh. **C)** A la izquierda, porcentaje de neuronas que respondieron con elevaciones de Ca²⁺ intracelular a la aplicación de DHPG en condiciones control y llenadas con GDPβS. A la derecha, valores relativos de Ca²⁺ intracelular tras la aplicación de DHPG en ambas situaciones. **D)** A la izquierda, porcentaje de neuronas que respondieron con elevaciones de Ca²⁺ intracelular a la aplicación de ACh en condiciones control y llenadas con GDPβS. A la derecha, valores relativos de Ca²⁺ intracelular tras la aplicación de ACh en ambas situaciones.

Dado que el GDPβS bloquea de manera efectiva la señalización intracelular mediada por la activación de proteínas G (Figura 20; cf. (Turner *et al.*, 1986; Miyazaki, 1988; Navarrete & Araque, 2010)), se incluyó en la pipeta de registro de la neurona postsináptica para evitar la señalización intracelular generada por mGluR de manera específica en la neurona postsináptica (Navarrete & Araque, 2010). Aunque la neurona postsináptica se llenó con GDPβS, el paradigma

de despolarizaciones pareadas indujo una potenciación de la transmisión sináptica a largo plazo (Figura 21A-C). Estos resultados indican que la activación de $mGluR_1$ no se produce en la neurona postsináptica, sino que probablemente es la activación de $mGluR_1$ en el terminal presináptico la que genera este tipo de plasticidad sináptica mediada por eCBs.

Además, en presencia de AM251 en el baño (un antagonista de los receptores CB1) para descartar un posible efecto de los eCBs que pudieran ser liberados por la despolarización de la neurona postsináptica, y GDP β S en la neurona postsináptica, la aplicación local de DHPG pareada con la despolarización postsináptica a -30 mV fue suficiente para inducir cambios a largo plazo en la transmisión sináptica (Figura 21D-F). Dado que el óxido nítrico es el único mensajero liberado por la neurona postsináptica (Figura 16), estos resultados sugieren que el glutamato necesario para activar $mGluR_1$ presinápticos proviene probablemente de los astrocitos.

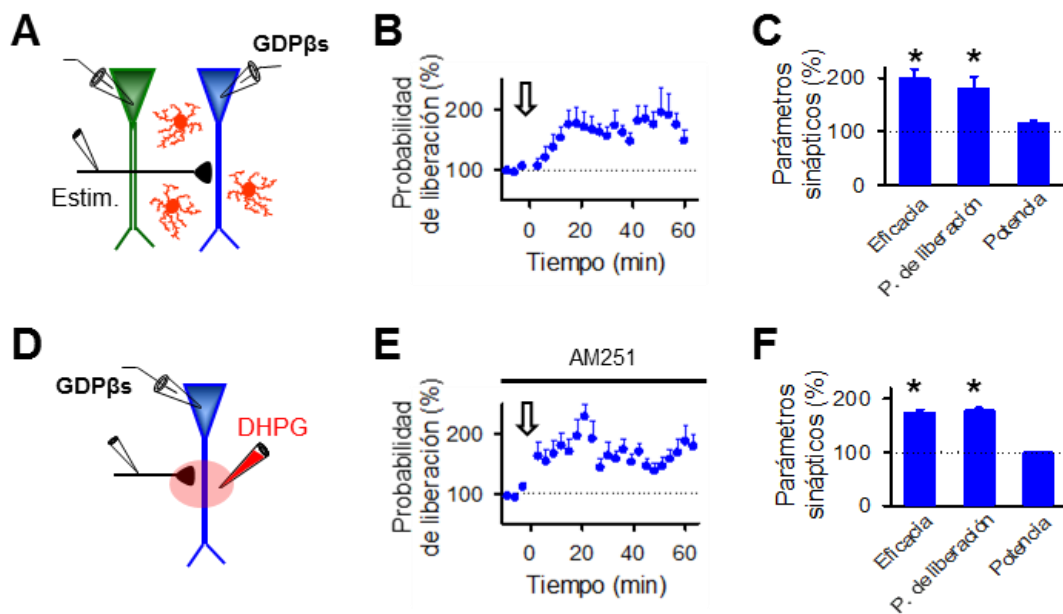


Figura 21. La eLTP está mediada por la activación de $mGluR_1$ presinápticos. **A)** Esquema ilustrativo del modelo experimental. **B)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó en presencia de GDP β S en la neurona postsináptica. **C)** Cambios en los parámetros sinápticos cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó en estas condiciones. **D)** Esquema ilustrativo del modelo experimental. **E)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo cuando se pareó la aplicación local de DHPG con la despolarización de la neurona postsináptica (-30 mV) llenada con GDP β S y en presencia de AM251. **F)** Cambios en los parámetros sinápticos cuando se pareó la aplicación local de DHPG con la despolarización de la neurona postsináptica (-30 mV) llenada con GDP β S y en presencia de AM251.

Por tanto, nuestros datos sugieren que los astrocitos responden a la señalización por eCBs liberando glutamato que activa receptores mGluR₁. Aunque los mGluR₁ se encuentran predominantemente en los terminales postsinápticos (Lujan *et al.*, 1996), nuestros resultados indican que la potenciación de la transmisión sináptica a largo plazo inducida por el sistema endocannabinoide está mediada por la activación de receptores presinápticos y no por los postsinápticos.

A continuación, se investigó la diana molecular responsable de la expresión a largo plazo de la potenciación de la transmisión sináptica provocada por la activación de mGluR₁. La estimulación de mGluR₁ conlleva la activación de la proteína kinasa C (PKC), la cual ha sido relacionada con fenómenos de plasticidad sináptica (revisado en Anwyl, 2009)). Cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó en presencia de BIS I 2 μ M, un inhibidor de PKC que permea a través de la membrana plasmática (Toullec *et al.*, 1991; Daw *et al.*, 2000), la señal de Ca²⁺ en los astrocitos no se vio afectada (n = 58 astrocitos de n = 6 rodajas) (Figura 22C). Sin embargo, no se observaron cambios de la transmisión sináptica a largo plazo (n = 4, Figura 22A,B), sugiriendo que la activación de PKC es necesaria para generar en este tipo de plasticidad sináptica mediada por eCBs.

BIS I es una molécula difusible a las membranas celulares y, al ser aplicado en el baño, ejerce su acción tanto en el terminal presináptico como en el postsináptico. Por ello, se aplicó otro inhibidor de PKC (cheleritrina 1 μ M) (Ling *et al.*, 2002; Kwon & Castillo, 2008) directamente en la pipeta de registro de la neurona postsináptica, de manera que se pudiera inhibir PKC selectivamente en la neurona postsináptica. Al igual que ocurrió cuando se aplicó BIS I en el baño, la señal de Ca²⁺ en los astrocitos no se vio afectada en presencia de cheleritrina (n = 73 astrocitos de n = 7 rodajas; Figura 22C), sin embargo, los cambios a largo plazo de la liberación de neurotransmisor no se bloquearon con la presencia de cheleritrina en la neurona postsináptica (n = 9, Figura 22A,B). Estos datos indican que la activación de PKC en la neurona postsináptica no se encuentra involucrada en la generación de la eLTP.

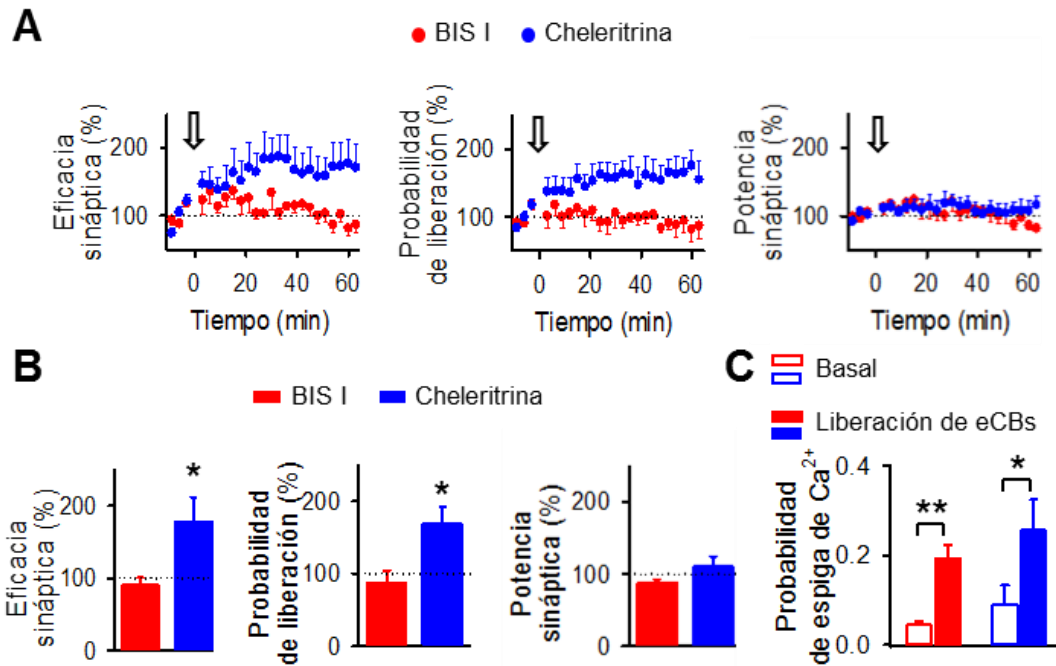


Figura 22. La activación de PKC en el terminal presináptico interviene en la eLTP. A) Parámetros sinápticos frente al tiempo cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó en presencia de BIS I o de chelitrina. **B)** Cambio en los parámetros sinápticos cuando el paradigma de despolarizaciones pareadas se aplicó en presencia de BIS I o de chelitrina. **C)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca²⁺ antes (basal) y después (liberación de eCBs) de aplicar el paradigma de despolarizaciones pareadas en presencia de BIS I o de chelitrina.

La efectividad de la chelitrina se comprobó en experimentos paralelos monitorizando la corriente lenta de K⁺ activada por Ca²⁺ (sI_{AHP}), la cual es sensible a la activación de PKC (Engisch *et al.*, 1996; Seroussi *et al.*, 2002). Se realizaron pares de registros donde una neurona se llenó con solución intracelular control mientras que la otra se llenó con solución intracelular que contenía chelitrina 1 μM (Figura 23A). Mientras que la activación de PKC mediante la perfusión de PMA (Forbol 12-Miristato 13-Acetato, 15 μM) (Engisch *et al.*, 1996) inhibió la corriente sI_{AHP} en las neuronas control, la corriente sI_{AHP} registrada en las neuronas que contenían chelitrina no se vió afectada (n = 4; Figura 23B,C).

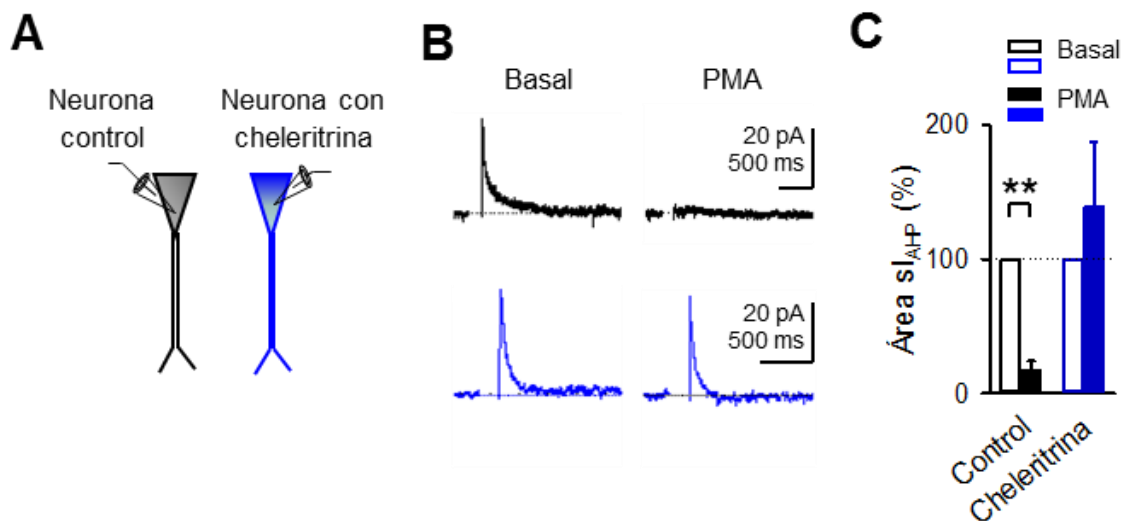


Figura 23. La chelitrina bloquea PKC de manera efectiva. A) Esquema donde se representa el modelo experimental. **B)** Trazos representativos mostrando la corriente I_{AHP} en la neurona control (negro) y en una neurona llenada con chelitrina (azul) antes (basal) y después de aplicar PMA en el baño. **C)** Cambios relativos en el área de la corriente I_{AHP} en la neurona control y en una neurona llenada con chelitrina antes (basal) y después de la aplicación de PMA.

En conjunto, estos resultados muestran que la activación de $mGluR_1$ y PKC, localizados presinápticamente en lugar de postsinápticamente, median el aumento a largo plazo de la probabilidad de liberación de neurotransmisor.

Los resultados mostrados hasta ahora muestran que el sistema endocannabinoide induce una potenciación de la transmisión sináptica a largo plazo a través de la inducción de la señal de Ca^{2+} en los astrocitos cuando ésta coincide con actividad postsináptica. Esta eLTP necesita la actividad coordinada de los tres componentes de la Sinapsis Tripartita, esto es: i) la señal de Ca^{2+} y liberación de glutamato de los astrocitos; ii) la producción de óxido nítrico en el terminal postsináptico y iii) la activación de $mGluR$ de tipo 1 y de PKC en el terminal presináptico. Estos datos amplían la función de los eCBs sobre la transmisión sináptica, mostrando que pueden inducir potenciación sináptica a largo plazo.

2. ESTUDIO DE LOS PROCESOS QUE REGULAN LA LIBERACIÓN DE GLIOTRANSMISORES.

Los datos hasta ahora expuestos apoyan que los astrocitos liberan glutamato tras la activación de receptores CB1 (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Min & Nevian, 2012; Navarrete *et al.*, 2014). Sin embargo, otros estudios han revelado que los astrocitos también liberan otros gliotransmisores como D-serina o ATP e inducen diferentes tipos de regulación de la transmisión sináptica tanto a corto como a largo plazo (Pascual *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006; Perea & Araque, 2007; Henneberger *et al.*, 2010; Navarrete & Araque, 2010; Takata *et al.*, 2011; Min & Nevian, 2012; Navarrete *et al.*, 2012).

La liberación de glutamato de los astrocitos se ha mostrado tanto en rodajas de cerebro como *in vivo* tras la activación de receptores GABA_B (Kang *et al.*, 1998), de receptores de ATP (Perea & Araque, 2007), de receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR, del inglés *muscarinic acetylcholine receptors*) (Takata *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012) o, como se ha mostrado en este y en otros trabajos, tras la activación de receptores CB1 (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Min & Nevian, 2012). Estos estudios muestran que la activación de diferentes receptores en los astrocitos puede desencadenar la misma señal, es decir, la liberación de glutamato. Por sí misma, la liberación de glutamato de los astrocitos da lugar a un rápido aumento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor durante un periodo de tiempo relativamente corto (< 3 minutos) (Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010).

Así mismo, la activación de receptores GABA_B también induce la liberación de ATP que, tras ser degradado a adenosina por ectonucleotidasas extracelulares, activa receptores de adenosina A₁ y produce una depresión transitoria de la transmisión sináptica (Serrano *et al.*, 2006). Esta depresión sináptica se desarrolla de manera más lenta que la potenciación sináptica mediada por glutamato (Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010), llegando a durar más de 5 minutos (Serrano *et al.*, 2006).

Estos estudios son aparentemente contradictorios y suscitan varias preguntas. ¿Puede una sinapsis ser modulada por varios gliotransmisores? ¿Pueden los astrocitos liberar varios gliotransmisores? ¿Existen subtipos de astrocitos especializados en la síntesis y liberación de los diferentes gliotransmisores?

UNA ÚNICA SINAPSIS PUEDE SER MODULADA POR VARIOS GLIOTRANSMISORES.

Para investigar si una única sinapsis es susceptible de ser modulada por varios gliotransmisores se monitorizó la transmisión sináptica inducida en las Colaterales de Schaffer

en una neurona piramidal de la región de CA1 del hipocampo y se aplicaron dos paradigmas de estimulación diferentes que inducen la liberación de glutamato o ATP desde los astrocitos. Estos protocolos fueron los siguientes:

- i) La **despolarización neuronal (DN)** de una neurona piramidal de CA1 induce la liberación de eCBs (Kreitzer & Regehr, 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevaleyre & Castillo, 2004; Navarrete & Araque, 2008; 2010). Los eCBs liberados por esta neurona activan receptores CB1 en los astrocitos dando lugar a la elevación de Ca^{2+} intracelular y la liberación de glutamato (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Min & Nevia, 2012). Este glutamato, proveniente de los astrocitos, activa receptores mGluR₁ en los terminales presinápticos dando lugar a un aumento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor en sinapsis relativamente lejanas a la fuente de eCBs (60 - 120 μ m) (Navarrete & Araque, 2010).
- ii) Un **tren de estimulación de alta frecuencia (HFS)** aplicado en las Colaterales de Schaffer induce la liberación de GABA desde las interneuronas y activa receptores GABA_B en los astrocitos provocando el aumento sus niveles de Ca^{2+} intracelular. Tras ser activados, los astrocitos liberan ATP, que es convertido a adenosina por ectonucleotidasas extracelulares y activa receptores A₁ neuronales, dando lugar a una depresión sináptica transitoria en las sinapsis de CA3-CA1 que no han sido estimuladas por el tren de alta frecuencia. Este fenómeno se conoce como *depresión heterosináptica* (Lynch *et al.*, 1977; Zhang *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006).

La depresión heterosináptica ha sido generalmente estudiada utilizando registros de campo (Pascual *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006), donde se registra una población neuronal. Por este motivo se comprobó si la depresión heterosináptica puede ser inducida utilizando la técnica de estimulación mínima donde una o muy pocas sinapsis son estimuladas (Raastad, 1995; Isaac *et al.*, 1996; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010). Para ello se registraron neuronas piramidales de CA1 y se midió la transmisión sináptica inducida en las Colaterales de Schaffer en la configuración de estimulación mínima (Figura 24A,B). La depresión heterosináptica se indujo aplicando 3 trenes de 100 Hz durante 1 segundo de duración cada uno a intervalos de 30 segundos sobre un grupo de Colaterales de Schaffer independientes a las estimuladas con la técnica de estimulación mínima (ver Material y métodos). Este paradigma de estimulación deprimió la transmisión sináptica de manera transitoria en el 43.75% de las sinapsis registradas. La probabilidad de liberación de neurotransmisor se redujo al $54.74 \pm 6.54\%$ ($n = 9$, $P < 0.001$) con respecto a la probabilidad de liberación de neurotransmisor basal y la eficacia sináptica se redujo al $72.54 \pm 11.04\%$ ($n = 9$, $P = 0.038$), sin embargo, la potencia

sináptica no se vio afectada $86.69 \pm 11.97\%$ ($n = 9$, $P = 0.3$) (Figura 24C,D). Estos resultados sugieren que la depresión heterosináptica puede ser inducida bajo nuestras condiciones experimentales.

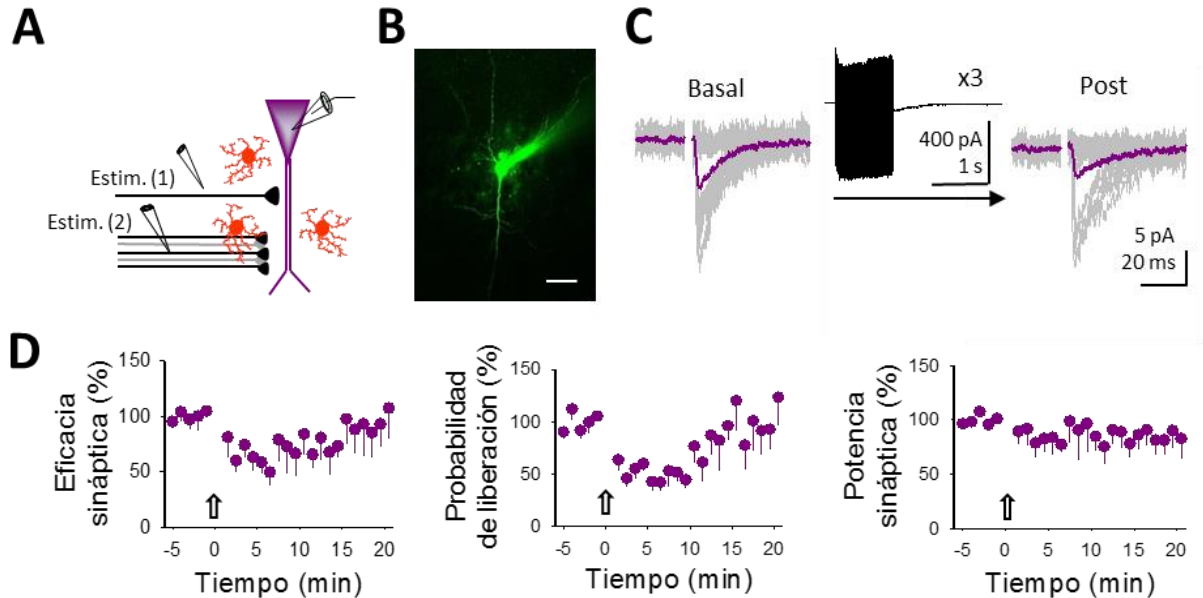


Figura 24. La depresión heterosináptica puede ser inducida empleando la técnica de estimulación mínima. A) Dibujo esquemático mostrando la neurona de registro, el electrodo de estimulación mínima (1) y el electrodo con el que se aplicó el paradigma de HFS. **B)** Imagen de una neurona piramidal de CA1 llenada con Alexa 488. Barra de escala: 20 μm . **C)** Trazos representativos inducidos con la estimulación mínima (gris) y sus trazos promedio (morado) antes (basal) y después (post) de aplicar el paradigma de estimulación de HFS. **D)** Parámetros sinápticos frente al tiempo.

A continuación se investigó si una única sinapsis es susceptible de ser modulada por los gliotransmisores glutamato y ATP, cuya liberación desde los astrocitos es estimulada mediante la despolarización neuronal o un tren de alta frecuencia respectivamente (Pascual *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006; Navarrete & Araque, 2010; Navarrete *et al.*, 2012). Para ello se registraron pares de neuronas piramidales de CA1 mientras se monitorizaba la transmisión sináptica inducida en las Colaterales de Schaffer. Una de las neuronas fue despolarizada a 0 mV durante 5 segundos para inducir la liberación de eCBs (Kreitzer & Regehr, 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevaleyre & Castillo, 2004; Navarrete & Araque, 2008; 2010) y se midió la transmisión sináptica en la otra neurona, donde se esperaba ver una potenciación transitoria de la probabilidad de liberación de neurotransmisor mediada por glutamato proveniente de los astrocitos (Navarrete & Araque, 2010). Una vez que los valores de los parámetros sinápticos volvieron a niveles basales, se aplicó un tren de alta frecuencia en un conjunto independiente de Colaterales de Schaffer para inducir la depresión heterosináptica

mediada por ATP liberado por los astrocitos (Figura 24A,B) (Lynch *et al.*, 1977; Zhang *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006). Ninguno estos dos fenómenos está mediado por la activación de receptores GABA_A (Figura 25) (Navarrete & Araque, 2010) por lo que estos experimentos se realizaron en presencia de su antagonista (Picrotoxina 50 μM).

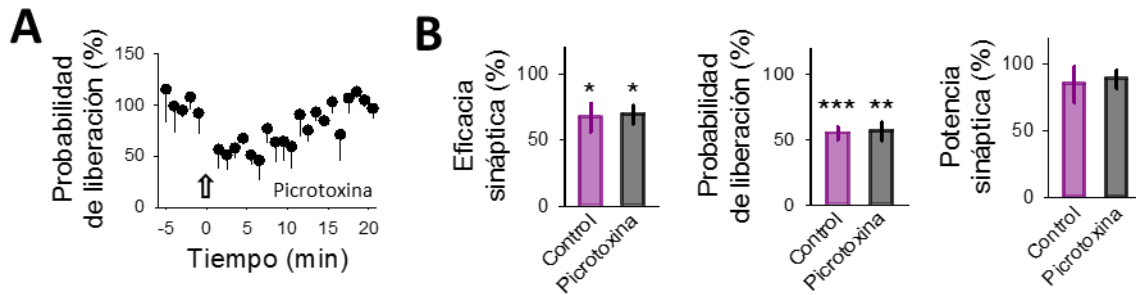


Figura 25. La Depresión Heterosináptica no está mediada por la activación de receptores GABA_A. **A)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo cuando la depresión heterosináptica fue inducida en presencia de picrotoxina. **B)** Cambios en los parámetros sinápticos tras aplicar el paradigma de estimulación de HFS en situación control y en presencia de picrotoxina.

Tras aplicar ambos paradigmas (i. e. DN y HFS) se observó la coincidencia de la potenciación sináptica mediada por eCBs y la depresión heterosináptica en la misma sinapsis en 5 de 16 sinapsis (31.25%), con cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor y en la eficacia sináptica pero no en la potencia sináptica (n = 5; Figura 26C,D,F,G). La potenciación sináptica mediada por eCBs fue bloqueada en presencia del antagonista de los receptores mGluR₁ (LY367385 100 μM; n = 4; Figura 26E-G), indicando que los astrocitos liberan glutamato como respuesta a la activación de receptores CB1 (cf. (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Min & Nevian, 2012)). Por otro lado, la depresión heterosináptica mediada por la activación de receptores GABA_B fue bloqueada en presencia del antagonista de los receptores de adenosina A₁ (CPT 2 μM; n = 6; Figura 26E-G), sugiriendo que los astrocitos liberan ATP/adenosina en respuesta a la activación por receptores GABA_B (cf. (Serrano *et al.*, 2006)). Estos resultados muestran que una sinapsis puede ser modulada por diversos gliotransmisores liberados ante diferentes estímulos fisiológicos.

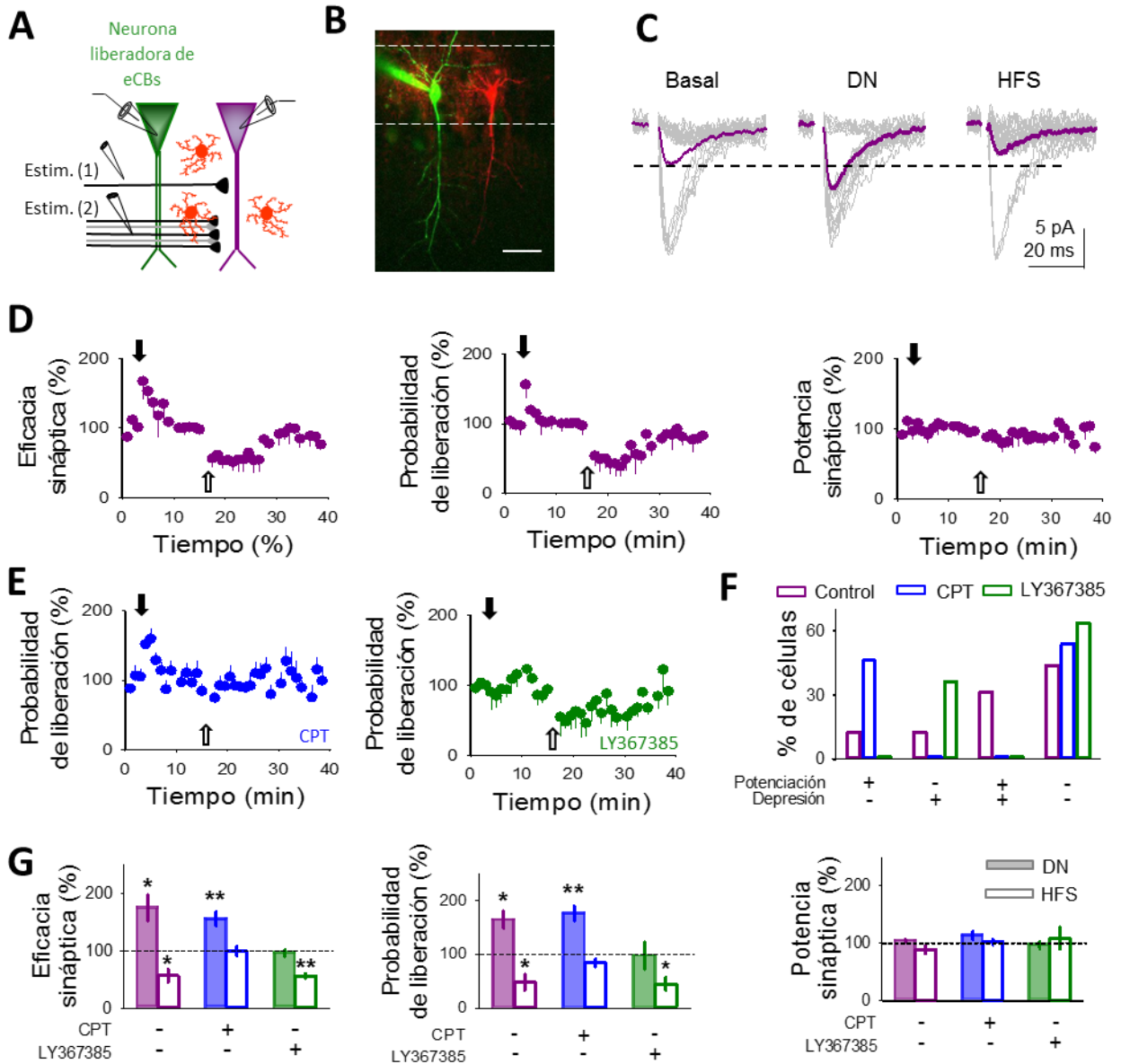


Figura 26. Una sinapsis es susceptible de ser modulada por varios gliotransmisores. **A)** Dibujo esquemático donde se muestran las dos neuronas registradas y los electrodos de estimulación mínima (1) y de aplicación del paradigma de HFS (2). **B)** Imagen de fluorescencia donde se muestran dos neuronas piramidales de CA1, una llenada con Alexa 488 (verde) y otra con Texas Red (rojo). Barra de escala: 25 μ m. **C)** Trazos representativos obtenidos con la estimulación mínima (gris) y sus trazos promedio (morado) en situación basal, después de la despolarización neuronal (DN) y después de aplicar el paradigma de HFS. **D)** Parámetros sinápticos frente al tiempo en condiciones control. Las flechas abiertas y cerradas indican la aplicación de los paradigmas de de DN y de HFS, respectivamente. **E)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo en presencia de CPT o de LY367385. **F)** Porcentaje de células que sufrieron potenciación sináptica, depresión sináptica, ambos o ningún cambio sináptico en cada condición. **G)** Parámetros sinápticos antes y después de aplicar los paradigmas de DN o HFS en situación control o en presencia de CPT o LY367385.

LOS ASTROCITOS MODULAN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA TRAS LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES GABA_B.

La depresión heterosináptica se debe a la liberación de GABA por las interneuronas activadas por el tren de alta frecuencia. Este GABA activa receptores GABA_B en los astrocitos induciendo aumentos de Ca²⁺ citoplasmáticos y la liberación de ATP (Serrano *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha propuesto que los astrocitos también pueden liberar glutamato tras la activación de receptores GABA_B (Kang *et al.*, 1998). Para investigar el proceso por el cual los astrocitos liberan ATP o glutamato tras la estimulación de la misma ruta de señalización, se comprobó la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las interneuronas ante el tren de alta frecuencia para luego comprobar si cambios en esa frecuencia de disparo pueden inducir la liberación de gliotransmisores diferentes desde los astrocitos.

Para ello se registraron los potenciales de acción disparados por las interneuronas en el *Stratum Radiatum* (Figure 27A) en la configuración de *cell attached* ante una estimulación 100 Hz sobre las Colaterales de Schaffer. Para confirmar si las interneuronas estaban siendo estimuladas directamente con el estimulador o de manera sináptica se comprobó si los potenciales de acción eran bloqueados en presencia de CNQX 20 μM y AP5 50 μM (antagonistas de los receptores de AMPA y NMDA, respectivamente; Figura 27B). Cuando las interneuronas fueron estimuladas de manera directa respondieron a todos y cada uno de los estímulos del tren de 100 Hz (Figura 27E) indicando que tienen la capacidad de disparar potenciales de acción a una frecuencia de 100 Hz. Sin embargo, cuando las interneuronas fueron estimuladas sinápticamente se observaron diferentes respuestas. Algunas interneuronas mostraron adaptación en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (la mayoría de los potenciales de acción ocurrieron al inicio del tren de alta frecuencia) mientras que otras interneuronas mostraron un patrón de disparo de potenciales de acción relativamente constante durante toda la estimulación (Figura 27C). Aunque la respuesta observada fue heterogénea, en promedio las interneuronas disparan 20 potenciales de acción por segundo como respuesta a la estimulación sináptica (Figura 27D).

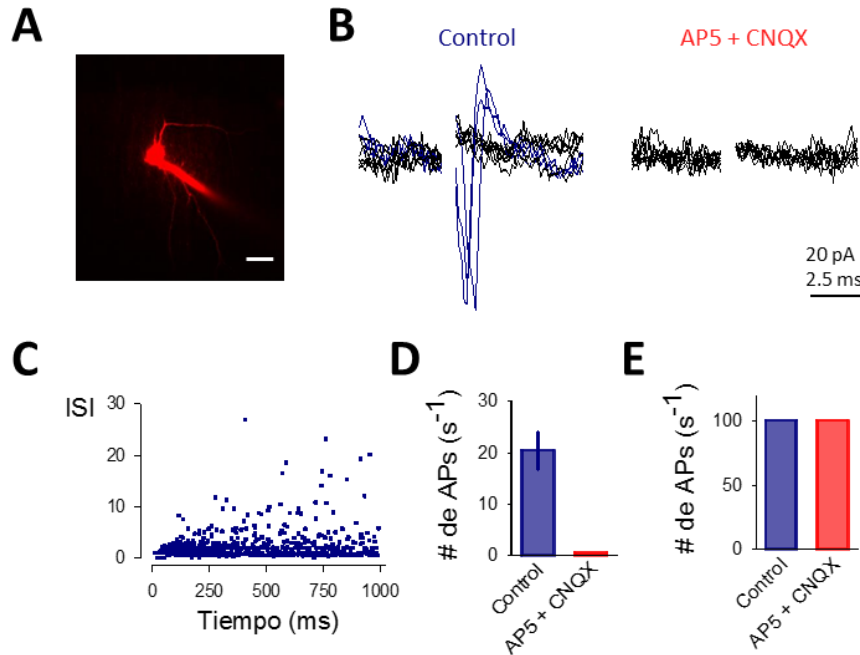


Figura 27. Patrón de disparo de potenciales de acción de las interneuronas durante el paradigma de HFS. A) Imagen de una interneurona del Stratum Radiatum llenada con Texas Red. Barra de escala: 20 μm . **B)** 10 trazos consecutivos mostrando la presencia (azul) o ausencia (negro) de potenciales de acción durante el paradigma de HFS aplicado en condiciones control y en presencia de AP5 + CNQX. **C)** Intervalo entre espigas (ISI) frente al tiempo de todas las interneuronas registradas. **D)** Número de potenciales de acción por segundo disparados por las interneuronas durante el paradigma de HFS en condiciones control y en presencia de AP5 + CNQX cuando las interneuronas fueron estimuladas sinápticamente. **E)** Número de potenciales de acción por segundo disparados por las interneuronas durante el paradigma de HFS en condiciones control y en presencia de AP5 + CNQX cuando las interneuronas fueron estimuladas directamente.

A continuación se investigó el efecto de la frecuencia de disparo de las interneuronas sobre la liberación de gliotransmisores. Para ello se realizaron pares de registros de interneuronas del *Stratum Radiatum* y neuronas piramidales de CA1 mientras monitorizamos las señales de Ca^{2+} en los astrocitos y las corrientes sinápticas inducidas en las Colaterales de Schaffer en la neurona piramidal. La interneurona fue despolarizada a una frecuencia de 20 Hz durante 90 segundos para imitar su respuesta al tren de estimulación a alta frecuencia (ver Materiales y métodos; Figura 5). Durante el tren de despolarizaciones de la interneurona se observaron elevaciones de Ca^{2+} en los astrocitos ($n = 147$ astrocitos en $n = 17$ rodajas; Figura 28), que fueron bloqueadas en presencia de CGP54626 (1 μM ; antagonista de los receptores GABA_B ; $n = 85$ astrocitos de $n = 9$ rodajas) pero no en presencia de picrotoxina (50 μM ; antagonista de los receptores GABA_A ; $n = 157$ astrocitos de $n = 16$ rodajas; Figura 28E),

indicando que las interneuronas estimulan la elevación de Ca^{2+} en los astrocitos mediante la activación de receptores GABA_B .

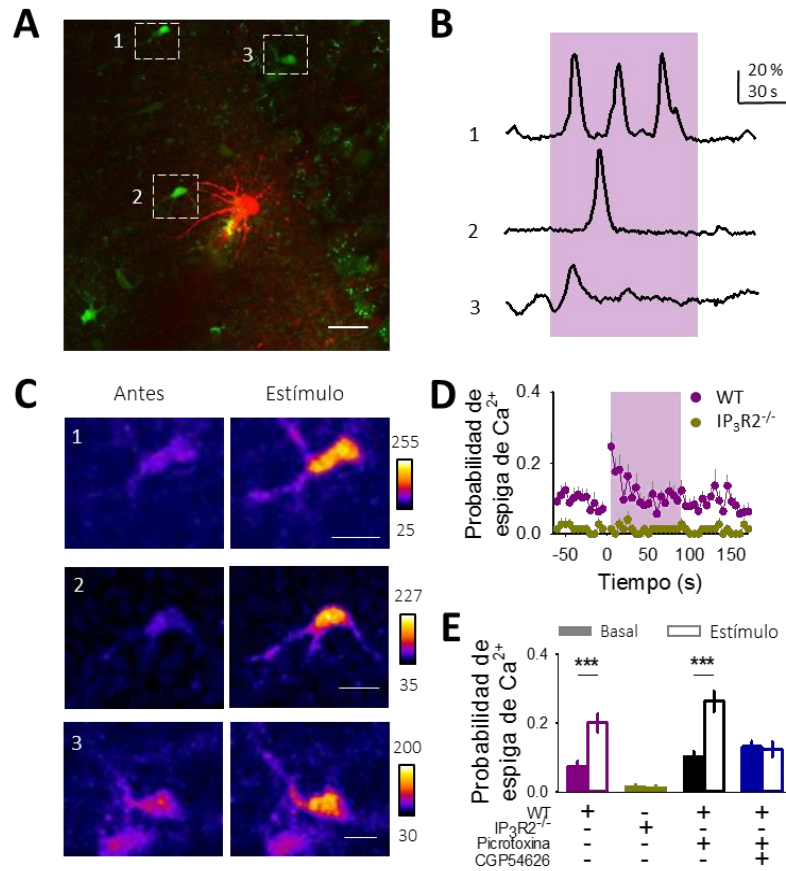


Figura 28. Los astrocitos responden a GABA con elevaciones de Ca^{2+} . **A)** Imagen de fluorescencia mostrando una interneurona cargada con Texas Red (rojo) y los astrocitos cargados con Fluo4-AM (verde). Barra de escala: 20 μm . **B)** Trazos donde se muestran los aumentos de Ca^{2+} relativos de los 3 astrocitos marcados en el panel A. El área rosa indica la duración del estímulo (despolarización de interneuronas a 20 Hz durante 90 segundos). **C)** Imágenes de pseudocolor de los niveles fluorescencia de la sonda Fluo4 de los astrocitos marcados en el panel A antes y durante el estímulo. Barra de escala: 10 μm . **D)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} frente al tiempo en el ratón WT y en el ratón $\text{IP}_3\text{R}2^{-/-}$. El área rosa indica la duración del estímulo. **E)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} antes y durante el estímulo en el ratón WT en condiciones control, en presencia de picrotoxina y CGP54626 y en el ratón $\text{IP}_3\text{R}2^{-/-}$.

Además, la transmisión sináptica mostró una rápida potenciación durante el inicio del tren de despolarizaciones de las interneuronas seguida de una depresión de la transmisión sináptica, dando lugar a una modulación bifásica de la probabilidad de liberación de

neurotransmisor. De nuevo, los cambios sinápticos se observaron en la probabilidad de liberación de neurotransmisor y en la eficacia sináptica pero no en la potencia sináptica ($n = 7$; Figura 29C-E). Ambos fenómenos estuvieron presentes en presencia de picrotoxina ($n = 8$), mostrando que no están mediados por la activación directa de receptores GABA_A en los terminales sinápticos. Sin embargo, tanto la potenciación como la depresión sinápticas fueron bloqueadas en presencia de CGP54626 ($n = 9$; Figura 29E). En conjunto estos datos sugieren que tanto la potenciación como la depresión sinápticas inducidas por la activación de receptores GABA_B podrían estar mediadas por la activación de astrocitos.

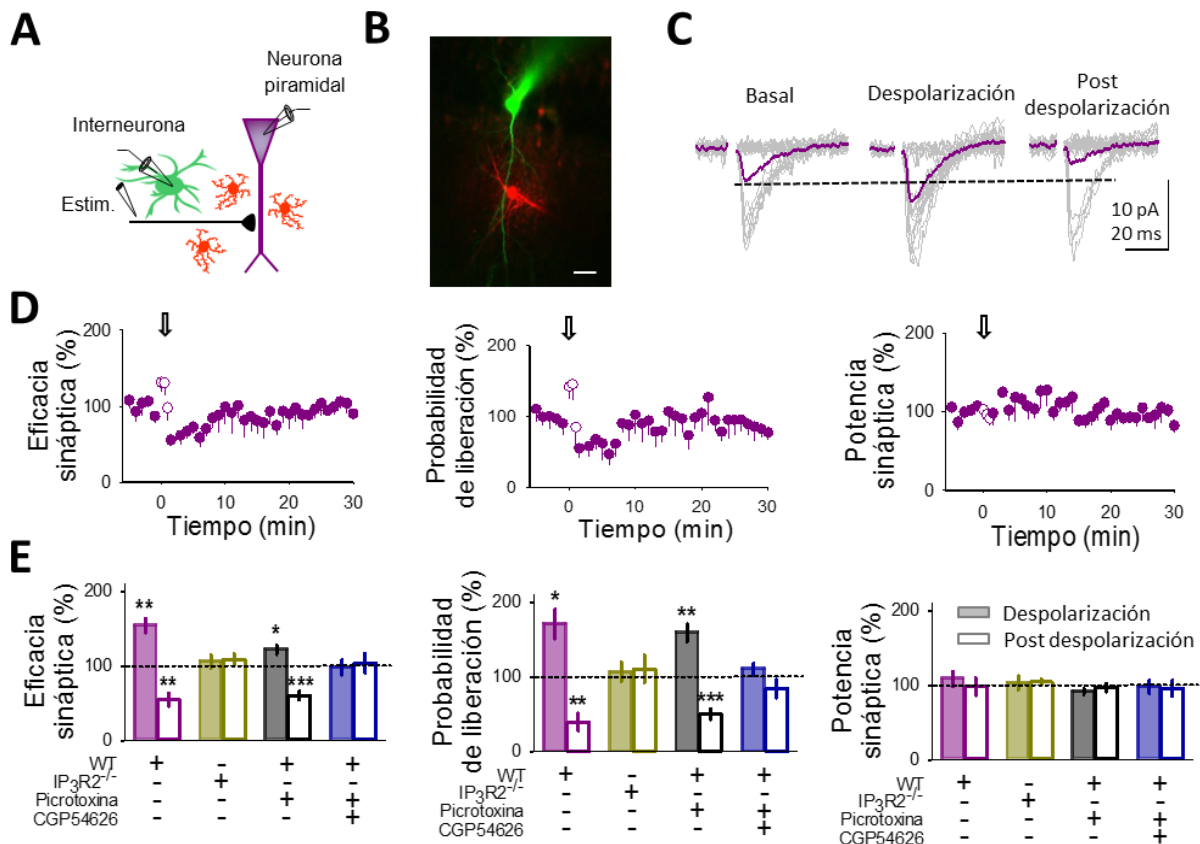


Figura 29. Los astrocitos inducen una modulación bifásica de la transmisión sináptica. **A)** Dibujo esquemático donde se muestran los registros dobles de interneuronas y neuronas piramidales de CA1 y el electrodo de estimulación. **B)** Imagen donde se muestra una interneurona del Stratum Radiatum llenada con Texas Red (rojo) y una neurona piramidal de CA1 llenada con Alexa 488 (verde). Barra de escala: 20 μ m. **C)** Trazos representativos obtenidos con la estimulación mínima (gris) y sus trazos promedio (morado) antes (basal), durante (despolarización) y después (post despolarización) de aplicar el tren de despolarizaciones en las interneuronas. **D)** Parámetros sinápticos frente al tiempo en condiciones control. Los puntos abiertos se corresponden con la duración del tren de despolarizaciones de las interneuronas. **E)** Cambios en los parámetros sinápticos durante (despolarización) y después (post despolarización) de aplicar el tren de despolarizaciones en las interneuronas en situación control, en presencia de picrotoxina, de CGP54626 y en el ratón IP₃R2^{-/-}.

Para verificar si los cambios de la transmisión sináptica están mediados por la activación de astrocitos se utilizaron rodajas de hipocampo obtenidas de ratones transgénicos $IP_3R2^{-/-}$, donde la señal de Ca^{2+} en los astrocitos se encuentra reducida (Petraovicz *et al.*, 2008; Di Castro *et al.*, 2011; Takata *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012; Perez-Alvarez *et al.*, 2014). En estos ratones no se observaron elevaciones de Ca^{2+} en los astrocitos ante el tren de despolarizaciones de las interneuronas ($n = 109$ astrocitos en $n = 10$ rodajas; Figura 28D,E). Así mismo, ni la potenciación ni la depresión de la transmisión sináptica estuvieron presentes en estos ratones ($n = 9$. Figura 27E). Por tanto, estos datos indican que los astrocitos inducen una modulación bifásica de la probabilidad de liberación de neurotransmisor en las sinapsis de CA3-CA1 del hipocampo tras la activación de receptores $GABA_B$.

LOS ASTROCITOS LIBERAN GLUTAMATO Y ATP TRAS LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES $GABA_B$.

A continuación, investigamos qué gliotransmisores están involucrados en la modulación de la transmisión sináptica inducida por GABA. Los astrocitos potencian la transmisión sináptica a corto plazo mediante la liberación de glutamato y la activación de $mGluR_1$ (Navarrete & Araque, 2010). Así mismo, los astrocitos liberan ATP que, tras ser convertido a adenosina, deprime la transmisión sináptica de manera transitoria mediante la activación de receptores de adenosina A_1 (Serrano *et al.*, 2006). Para investigar el posible papel de estos gliotransmisores sobre la modulación bifásica de la transmisión sináptica observada tras la despolarización de interneuronas, se aplicó el paradigma de despolarizaciones de las interneuronas en presencia de LY367385 (100 μM ; antagonista de $mGluR_1$) o en presencia de CPT (2 μM ; antagonista de los receptores A_1). Bajo estas condiciones, la potenciación de la transmisión sináptica fue bloqueada por LY367385 ($n = 6$) pero no por CPT ($n = 7$; Figura 30), mostrando que está mediada por la activación de $mGluR_1$. Sin embargo, la depresión de la transmisión sináptica fue bloqueada por CPT ($n = 7$) pero no por LY367685 ($n = 6$; Figura 30) indicando que está mediada por la activación de receptores A_1 . Además, las elevaciones de Ca^{2+} en los astrocitos inducidas por GABA no se vieron afectadas en presencia de LY367385 ni de CPT ($n = 96$ astrocitos en $n = 11$ rodajas y $n = 109$ astrocitos en $n = 11$ rodajas respectivamente; Figura 30C,D) confirmando que la liberación tanto de glutamato como de ATP/adenosina es posterior a la señal de Ca^{2+} en los astrocitos.

Se debe aclarar que la liberación de gliotransmisores se estudia mediante su efecto sobre la transmisión sináptica. La falta de efecto de los gliotransmisores sobre la transmisión sináptica indica que: i) no se liberan dichos gliotransmisores o ii) la concentración de los gliotransmisores no es suficiente para inducir un efecto sináptico. Aunque que en este trabajo no se midió directamente la liberación de gliotransmisor y ninguna de las dos opciones puede

ser descartada, la falta de efecto sobre la transmisión sináptica será asumida como la falta de liberación de gliotransmisores.

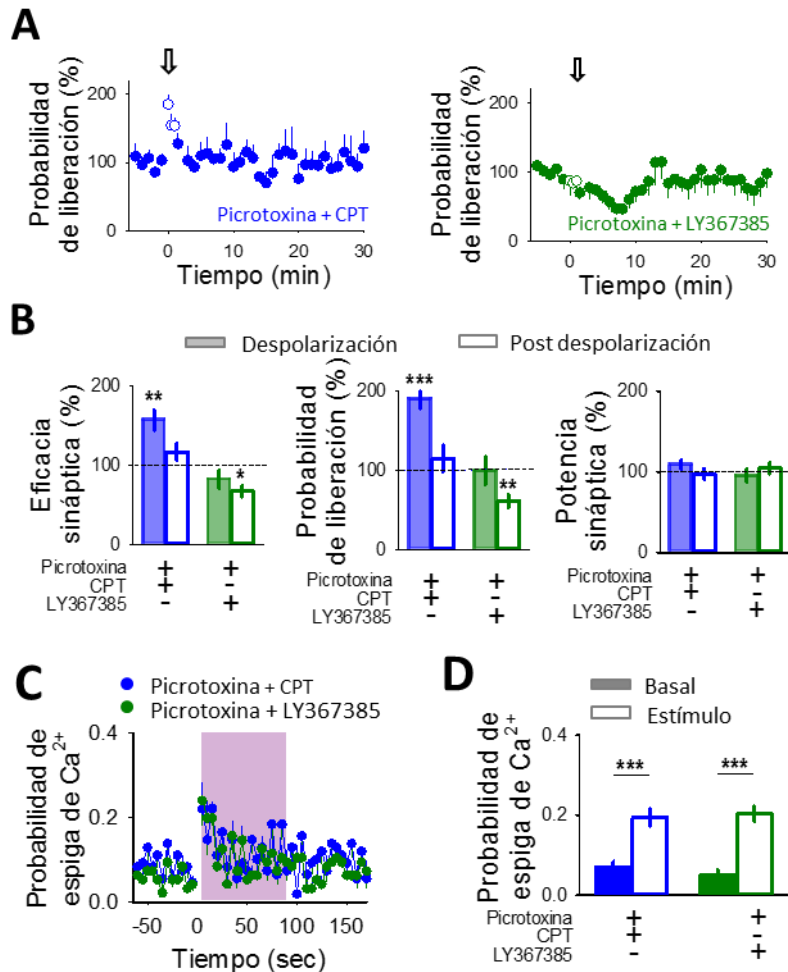


Figura 30. Los astrocitos liberan glutamato y ATP/adenosina en respuesta a la señalización GABAérgica. A) Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo en presencia de CPT o de LY367385. Los puntos abiertos se corresponden con la duración del estímulo. **B)** Cambios en los parámetros sinápticos durante (despolarización) y después (post despolarización) de aplicar el tren de despolarizaciones de las interneuronas en presencia de CPT o de LY367385. **C)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} frente al tiempo en presencia de CPT o de LY367385. El área rosa indica la duración del estímulo. **D)** Probabilidad de que ocurra una espiga de Ca^{2+} antes (basal) y durante el estímulo en presencia de CPT o de LY367385.

Estos datos sugieren que tras la activación de receptores GABA_B, los astrocitos liberan glutamato y ATP/adenosina dando lugar a una potenciación de la probabilidad de liberación de neurotransmisor, que está seguida de una depresión de la transmisión sináptica. Por tanto, los astrocitos pueden modular de manera diferente una sinapsis incluso tras la activación de una misma ruta de señalización. Sin embargo, la duración del efecto del gliotransmisor glutamato y del gliotransmisor ATP/adenosina cuando fueron aislados farmacológicamente fue mayor que

el efecto conjunto (Figura 31), indicando que existe un efecto aditivo de ambos gliotransmisores probablemente al ser liberados simultáneamente.

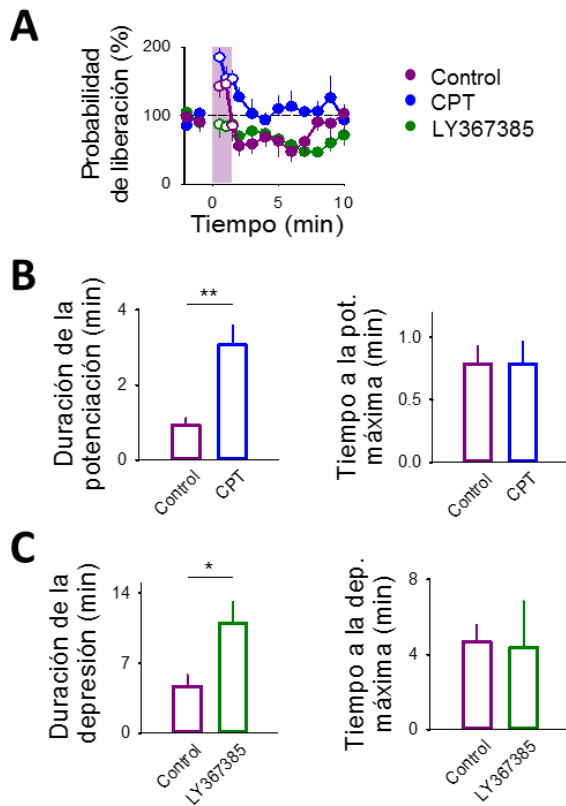


Figura 31. Los astrocitos co-liberan glutamato y ATP/adenosina. A) Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo en condiciones control y en presencia de CPT o de LY367385. El área rosa y los puntos abiertos indican la duración del estímulo. **B)** Duración de la potenciación sináptica y el tiempo a la máxima potenciación en condiciones control y en presencia de CPT. **C)** Duración de la depresión sináptica y el tiempo a la máxima depresión en condiciones control y en presencia de LY367385.

A continuación, se comprobó si la activación de un único astrocito es suficiente para inducir la modulación de la transmisión sináptica mediada por los gliotransmisores glutamato y ATP/adenosina. Para ello se llenó un astrocito con la jaula de Ca^{2+} NP-EGTA y se estimuló con luz UV para aumentar los niveles de Ca^{2+} intracelular e inducir la liberación de gliotransmisores (Liu *et al.*, 2004; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Navarrete *et al.*, 2012). Mientras que la estimulación con luz UV por sí misma no produjo ningún cambio en la transmisión sináptica ($n = 7$; Figura 32C), cuando un astrocito se llenó con NP-EGTA se observó una potenciación de la transmisión sináptica seguida de una depresión sináptica ($n = 4$; Figura 32) similares a las obtenidas al estimular las interneuronas a una frecuencia de 20 Hz. Estos datos muestran que la activación de un solo astrocito es suficiente para inducir la liberación de glutamato y ATP/adenosina, indicando que un único astrocito puede liberar al menos dos gliotransmisores y modular la transmisión sináptica de manera diferente.

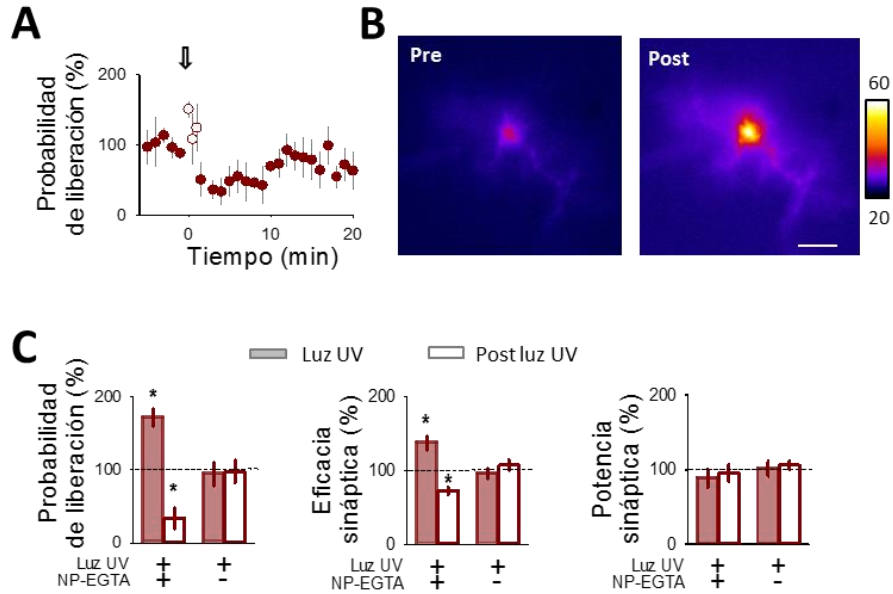


Figura 32. Los astrocitos liberan varios gliotransmisores tras la elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular. A) Probabilidad de liberación de neurotransmisor frente al tiempo. Los puntos abiertos se corresponden con la duración del estímulo. **B)** Imagen de pseudocolor donde se muestran las intensidades de fluorescencia de un astrocyto cargado con Fluo4 y NP-EGTA antes (pre) y después (post) de la estimulación con luz UV. Barra de escala: 20 μ m. **C)** Cambios en los parámetros sinápticos durante (luz UV) y después (post luz UV) de iluminar los astrocitos con luz UV.

LA LIBERACIÓN DE GLIOTRANSMISORES DEPENDE DE LA FRECUENCIA DE DISPARO DE POTENCIALES DE ACCIÓN Y DE LA DURACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEURONAL.

Los resultados presentados indican que la activación de astrocitos da lugar a la liberación de glutamato y ATP/adenosina. Dado que el efecto de la liberación de glutamato ocurre antes que el efecto de la liberación de ATP/adenosina, se puede hipotetizar que la liberación de diferentes gliotransmisores depende de la duración del estímulo neuronal. Para comprobar la validez de esta hipótesis se despolarizaron las interneuronas de manera que dispararan potenciales de acción a una frecuencia de 20 Hz utilizando trenes de diferentes tiempos de duración (100 ms, 1, 30, 60 y 90 segundos) y se midieron los parámetros sinápticos en las neuronas piramidales.

Tras aplicar un tren de despolarizaciones sobre las interneuronas a 20 Hz durante 100 ms no se observaron cambios en los parámetros sinápticos ($n = 6$; Figura 33), sin embargo, con un tren de despolarizaciones neuronales de 1 segundo de duración se observó una potenciación transitoria de la transmisión sináptica ($n = 6$) de mayor duración que la observada anteriormente al aplicar estímulos de 90 segundos de duración. Además, con un estímulo de 1 segundo no se observó depresión sináptica, indicando que estímulos de corta duración dan lugar a la liberación de glutamato por parte de los astrocitos pero no de ATP/adenosina (Figura 33). Fueron necesarios estímulos de mayor duración (30, 60 y 90 segundos) para inducir tanto la liberación de glutamato como de ATP/adenosina de los astrocitos ($n = 4$, $n = 5$ y $n = 7$, respectivamente; Figura 33). Estos datos indican que estímulos relativamente cortos son suficientes para inducir la liberación de glutamato por los astrocitos dando lugar a una potenciación transitoria de la transmisión sináptica, por otro lado, la actividad neuronal sostenida estimula también la liberación de ATP/adenosina por parte de los astrocitos, transformando la potenciación sináptica mediada por glutamato en una depresión de la probabilidad de liberación de neurotransmisor. Como se ha indicado anteriormente, aunque no se puede descartar que la falta de efecto de los gliotransmisores glutamato o ATP/adenosina sobre la transmisión sináptica se debe a que estos gliotransmisores no alcanzan la concentración necesaria, la falta de efecto de los gliotransmisores es asumida en este trabajo como una falta de liberación de gliotransmisor.

Además, nos propusimos estudiar cómo afecta la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las interneuronas a la liberación de gliotransmisores. Para ello se aplicó el tren de despolarizaciones de las interneuronas a diferentes frecuencias (1, 10, 20, 30, 50 Hz) y se comprobó su efecto sobre la transmisión sináptica en las neuronas piramidales. A una frecuencia de disparo de potenciales de acción relativamente baja (1 Hz) ni la potenciación ni la depresión sinápticas fueron inducidas ($n = 8$; Figura 34), indicando que una baja actividad de las interneuronas no es suficiente para que se liberen gliotransmisores. Por otro lado, cuando las interneuronas disparaban potenciales de acción a una frecuencia de 10 Hz se observó únicamente potenciación de la transmisión sináptica ($n = 7$; Figura 34), mostrando que la liberación de glutamato de los astrocitos ocurre a frecuencias más bajas que la liberación de ATP/adenosina. Cuando las interneuronas fueron despolarizadas a una frecuencia de 20 Hz, la potenciación sináptica duró 55.71 ± 12.12 segundos hasta que comenzó la depresión sináptica, y su tiempo al máximo efecto fue de 47.14 ± 8.92 segundos, mientras que la depresión sináptica duró 4.71 ± 1.1 minutos con un tiempo al máximo efecto de 4.5 ± 0.8 minutos ($n = 7$; Figura 34). Notablemente, cuando las interneuronas disparaban potenciales de acción a una frecuencia de 30 y 50 Hz tanto la potenciación como la depresión sinápticas tuvieron mayor duración ($n = 8$ y $n = 5$, respectivamente; potenciación sináptica: 1.78 ± 0.28 y 4.2 ± 1.26 minutos, respectivamente; depresión sináptica: 11 ± 1.6 minutos y 20.1 ± 0.9 minutos,

respectivamente; Figura 34) indicando que cuanto mayor fue la frecuencia de disparo de potenciales de acción más largo fue el efecto de la liberación de gliotransmisor sobre la transmisión sináptica. En conjunto, estos datos muestran que los astrocitos son capaces de detectar no sólo la duración del estímulo sino también el nivel de actividad neuronal. Así, un estímulo de igual duración produce diferentes efectos sobre la modulación sináptica mediada por astrocitos dependiendo de la frecuencia de disparo de potenciales de acción de la interneurona que esté activando a los astrocitos.

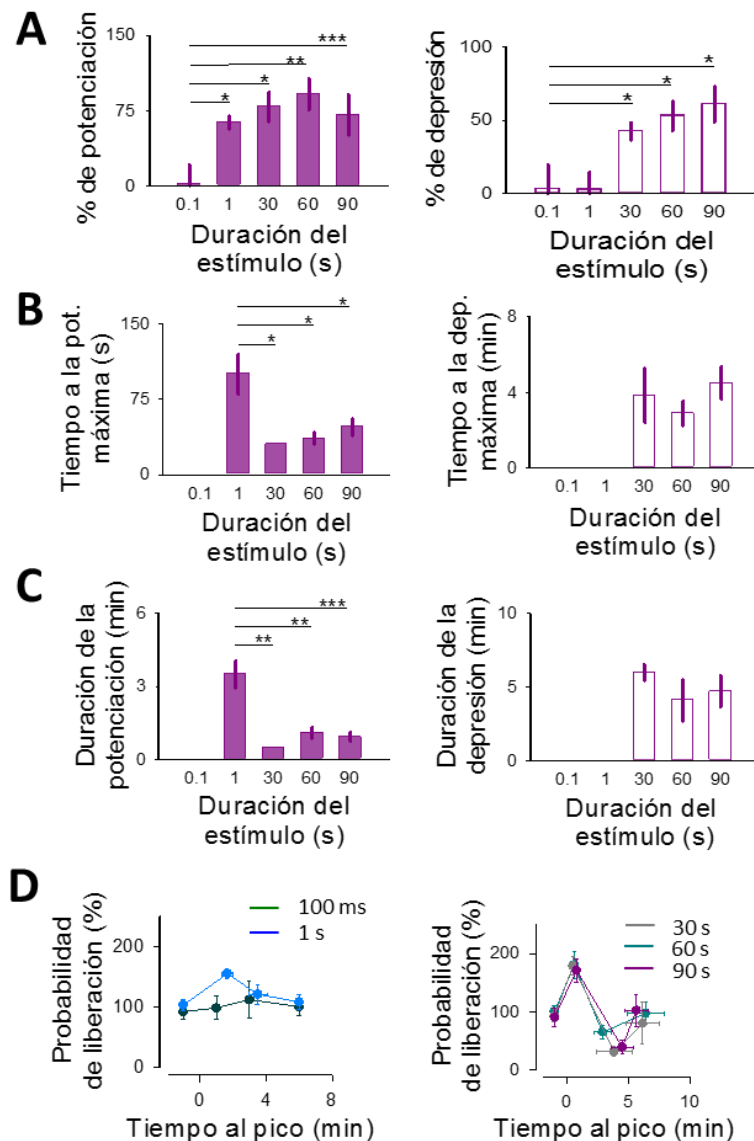


Figura 33. La liberación de gliotransmisores depende de la duración del estímulo. A) Porcentaje de potenciación y depresión en la probabilidad de liberación de neurotransmisor cuando las interneuronas disparaban potenciales de acción a 20 Hz durante 100 ms, 1, 30, 60 o 90 segundos. **B)** Tiempo al efecto máximo (potenciación o depresión sinápticas) en cada condición. **C)** Duración de la potenciación y la depresión sinápticas en cada condición. **D)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor cuando el efecto es máximo en cada condición.

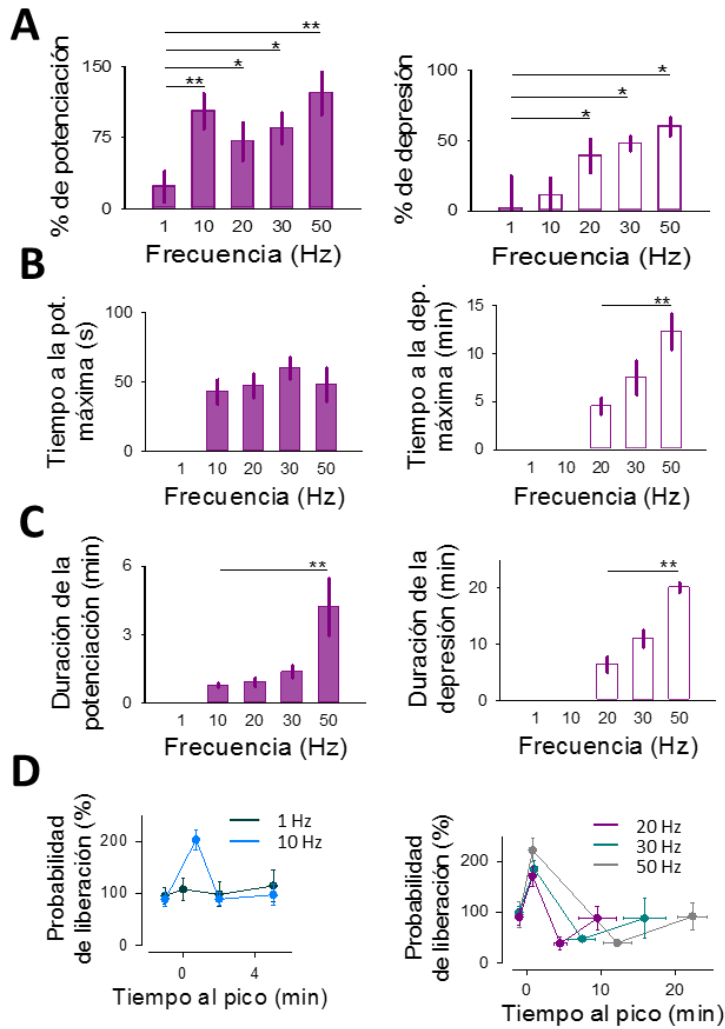


Figura 34. La liberación de gliotransmisores depende de la frecuencia de disparo de potenciales de acción neuronal. A) Porcentaje de potenciación y depresión en la probabilidad de liberación de neurotransmisor cuando las interneuronas fueron despolarizadas durante 90 segundos utilizando trenes de 1, 10, 20, 30 o 50 Hz. **B)** Tiempo al efecto máximo (potenciación o depresión sináptica) en cada condición. **C)** Duración de la potenciación y la depresión sinápticas en cada condición. **D)** Probabilidad de liberación de neurotransmisor cuando el efecto es máximo en cada condición.

V. DISCUSIÓN

1. LOS eCBs INDUCEN UNA POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR EN SINAPSIS DE CA3-CA1.

Los resultados descritos en este trabajo muestran que los eCBs liberados por las neuronas piramidales de CA1 de la región del hipocampo, además de sus ya conocidos efectos suprimiendo la actividad sináptica, pueden inducir un aumento de la transmisión sináptica glutamatérgica a través de la activación de astrocitos, de modo que la señalización eCB-astrocito potencia la probabilidad de liberación de neurotransmisor a largo plazo en las sinapsis heteroneuronales cuando ésta coincide con actividad postsináptica. Además, estos datos muestran que los transmisores y rutas moleculares involucrados en esta eLTP resultan de la actividad concertada de los tres elementos de la Sinapsis Tripartita: la señal de Ca^{2+} en los astrocitos evocada por eCBs que induce la liberación del gliotransmisor glutamato; la producción de óxido nítrico en el terminal postsináptico; y la activación de mGluR_1 y PKC en el terminal presináptico (Figura 35).

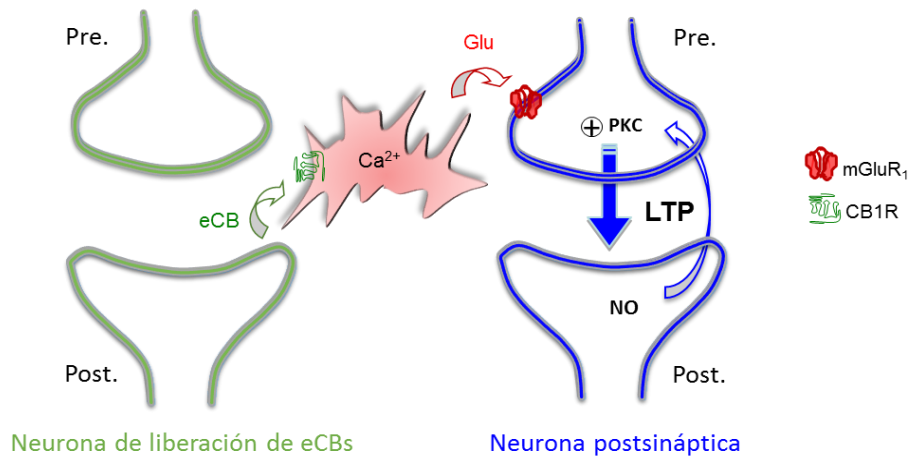


Figura 35. Esquema explicativo del mecanismo de generación de la eLTP.

Los efectos de la señalización por eCBs sobre la transmisión sináptica y la plasticidad ha sido estudiada en diferentes áreas cerebrales, donde se ha visto que inducen la inhibición de la liberación de neurotransmisor mediante la activación de receptores CB1 presinápticos, lo cual conlleva diferentes tipos de depresión tanto a corto como a largo plazo en forma de DSI, DSE o LTD (Kreitzer & Regehr, 2001; Alger, 2002; Wilson & Nicoll, 2002; Freund *et al.*, 2003; Chevaleyre *et al.*, 2006; Heifets & Castillo, 2009; Navarrete & Araque, 2010). Sin embargo, los resultados descritos en este trabajo muestran que los eCBs pueden además desencadenar una potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica en el hipocampo mediante la estimulación de astrocitos. Estos resultados revelan que los eCBs, que han sido generalmente

considerados señales retrogradas capaces de inducir únicamente depresión sináptica, también pueden iniciar una señal lateral mediante la activación de astrocitos e inducir un aumento de la transmisión sináptica en sinapsis relativamente lejanas de la fuente de eCBs, es decir, en sinapsis heteroneuronales. Por tanto, estos hallazgos indican que los eCBs pueden producir efectos adicionales a la depresión sináptica clásica, lo cual se ve respaldado por estudios recientes en roedores, carpa dorada o lamprea (Cachope *et al.*, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Song *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012; Tamagnini *et al.*, 2013).

2. EL EFECTO DE LOS eCBs SE ENCUENTRA RESTRINGIDO DE MANERA ESPACIAL.

El hecho de que los eCBs puedan tener efectos opuestos sobre la neurotransmisión revela una mayor complejidad del sistema eCB sobre la transmisión sináptica de lo que se pensaba previamente. De hecho, podría tener implicaciones funcionales relevantes a nivel del funcionamiento de las redes neuronales, ya que los efectos opuestos de los eCBs sobre la transmisión sináptica se encuentran definidos espacialmente y dependen de las células diana. Mientras que los eCBs inducen una depresión transitoria o a largo plazo mediante la activación de receptores CB1 en las sinapsis homoneuronales cercanas a la fuente de eCBs (< 20 μm ; (Wilson & Nicoll, 2001; Chevalleyre & Castillo, 2004; Chevalleyre *et al.*, 2006)), también potencian la transmisión sináptica de manera transitoria (Navarrete & Araque, 2010) o, como se ha visto en este trabajo, de manera persistente en sinapsis más lejanas mediante la activación de astrocitos.

A pesar de que las sinapsis homoneuronales también pueden estar influidas por el óxido nítrico liberado por los terminales postsinápticos y el glutamato liberado por los astrocitos tras la activación por eCBs, estas sinapsis sufren únicamente una depresión sináptica inducida por la acción directa de los eCBs liberados por el terminal postsináptico (ver Figura 10; cf. (Kreitzer & Regehr, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Chevalleyre *et al.*, 2006; Navarrete & Araque, 2010)). Por otro lado, las sinapsis heteroneuronales, que están más lejos del rango de acción de la señalización directa de los eCBs, muestran una potenciación sináptica permanente debido a la actividad coordinada de las rutas de señalización de los mGluR₁ presinápticos y el óxido nítrico neuronal que viaja de manera retrógrada también al terminal presináptico. Por lo tanto, el efecto final de esta compleja señalización controlada de manera espacial es que los astrocitos pueden señalar selectivamente a las neuronas adyacentes, pero no hacia atrás a la neurona de liberación de eCB, porque la activación directa de receptores CB1 presinápticos resulta en una depresión sináptica, la cual domina ante la acción mediada por los mGluR₁ y el óxido nítrico

que dan lugar a la eLTP (cf. (Navarrete & Araque, 2010)).

En consecuencia, los eCBs liberados por neuronas activas deprimen la transmisión sináptica en neuronas cercanas, mientras que simultáneamente producen una potenciación en sinapsis lejanas, generando una organización espacial de depresión/potenciación sináptica.

Mostramos además que la LTP inducida por eCBs requiere necesariamente la acción de los astrocitos, los cuales juegan un papel esencial al responder con elevaciones de Ca^{2+} a los eCBs y estimulando la liberación de glutamato, expandiendo, de esta manera, la señal original a puntos más lejanos y transformándola en una señal potenciadora. De esta manera, se establece una modulación sináptica por parte de los eCBs cuyos efectos se definen espacialmente, estableciendo un núcleo de depresión sináptica en las sinapsis más cercanas a la fuente de eCBs el cual estaría rodado por una potenciación sináptica en las sinapsis más lejanas.

3. LA ACTIVIDAD DE LA RED DE ASTROCITOS ES NECESARIA PARA LA INDUCCIÓN DE LA eLTP.

En anteriores estudios la coincidencia de la señal de Ca^{2+} en el astrocito provocada por la foto-estimulación de jaulas de Ca^{2+} junto con la actividad postsináptica ha dado como resultado la generación de LTP en el hipocampo (Perea & Araque, 2007). Nuestros resultados actuales indican que la LTP mediada por astrocitos puede ser inducida por un estímulo endógeno (i. e. eCBs liberados por las neuronas piramidales) que eleva el Ca^{2+} en los astrocitos de manera fisiológica. Además, los astrocitos responden a la actividad colinérgica con elevaciones de los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos, que se han mostrado necesarias para la inducción de la LTP colinérgica en el hipocampo (Navarrete *et al.*, 2012). Los astrocitos expresan una gran cantidad de receptores acoplados a proteínas G capaces de movilizar el Ca^{2+} intracelular, si diferentes neurotransmisores pueden iniciar mecanismos similares de LTP, este hecho tendría un gran impacto en la manera actual de entender los mecanismos de señalización capaces de inducir LTP.

Además, en los resultados aquí presentados se identifican los mecanismos moleculares y las vías de señalización involucrados en la LTP mediada por astrocitos. Se muestra que la activación de receptores CB1 en los astrocitos eleva su Ca^{2+} y estimula la liberación de glutamato, el cual actuando sobre mGluR de tipo 1 aumenta la liberación de neurotransmisor de manera persistente cuando coincide con una señal postsináptica (i. e. óxido nítrico) mediante la activación de PKC en el terminal presináptico. La LTP dependiente de la activación

de mGluR₁ ha sido descrita en varias áreas del cerebro incluyendo el neocortex, el hipocampo, el estriado y el núcleo acumbens (revisado en (Anwyl, 2009)). Nuestros resultados son consistentes con los mecanismos propuestos para mediar la LTP inducida por la activación de mGluR, sin embargo, nuestros datos indican que los astrocitos son la fuente de glutamato responsable de la generación de la LTP, poniendo de manifiesto la importancia de los astrocitos en los procesos de memoria y aprendizaje.

4. LA eLTP ESTÁ MEDIADA POR mGluR PRESINÁPTICOS.

Nuestros resultados indican que la LTP inducida por eCBs requiere la activación de mGluR de tipo 1 por glutamato liberado por los astrocitos tras ser estimulados por eCBs. La localización subcelular de estos mGluR no se encuentra totalmente identificada. Aunque estos receptores se pueden localizar mayoritariamente en los terminales postsinápticos (Lujan *et al.*, 1996), los datos fisiológicos obtenidos indican que estos mGluR se encuentran también en los terminales presinápticos, ya que:

- i) La eLTP se caracteriza por el aumento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor sin cambios en la potencia sináptica, lo cual indica que el mecanismo de acción es presináptico en lugar de postsináptico (Figura 6B,D).
- ii) La eLTP se encuentra asociada con cambios en la facilitación por pares de pulsos (Figura 6C), lo cual es también consistente con un mecanismo de acción presináptico.
- iii) La eLTP seguía presente al bloquear los mGluR₁ postsinápticos (Figura 21), lo cual indica que los mGluR₁ involucrados en la eLTP son necesariamente los localizados en el terminal presináptico.

A pesar de que la existencia de mGluR en los terminales presinápticos se encuentra todavía bajo debate, otros estudios electrofisiológicos han sugerido la existencia de mGluRs presinápticos en las Colaterales de Schaffer, donde pueden regular la transmisión sináptica (Rodríguez-Moreno *et al.*, 1998; Fiacco & McCarthy, 2004; Sanchez-Prieto *et al.*, 2004; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010; Bonansco *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012). Además, la presencia de mGluRs en los terminales presinápticos ha sido recientemente

confirmada mediante microscopía electrónica (Gomez-Gonzalo *et al.*, 2014). Es interesante que la potenciación sináptica mediada por mGluR presinápticos ha sido descrita únicamente cuando estos receptores son activados por glutamato exógeno o glutamato liberado por astrocitos, sugiriendo que quizás son activados exclusivamente por gliotransmisores, por lo que serían dianas moleculares específicas para la señalización astrocito-neurona.

5. LOS ASTROCITOS LIBERAN GLUTAMATO Y ATP/ADENOSINA COMO RESPUESTA A LA ACTIVIDAD NEURONAL.

Aunque la eLTP está mediada por glutamato liberado desde los astrocitos, nuestros resultados muestran que los astrocitos también pueden liberar ATP/adenosina. De hecho, mostramos como un mismo astrocito puede liberar tanto glutamato como ATP/adenosina y potenciar o deprimir la liberación de neurotransmisor, respectivamente. Esta modulación sináptica mediada por astrocitos no se debe a la activación de vías de señalización diferentes, sino que puede ser generada incluso tras la activación del mismo receptor de membrana (i. e. GABA_B) dependiendo de la frecuencia disparo de las interneuronas, así como de la duración del estímulo.

En las últimas décadas se han publicado numerosos trabajos mostrando la implicación de los astrocitos en la modulación de la actividad sináptica, y diversos gliotransmisores han sido propuestos. Solamente en el hipocampo se ha reportado que los astrocitos pueden liberar glutamato, ATP y D-serina ante diferentes estímulos (Kang *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2008; Henneberger *et al.*, 2010; Panatier *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012), sin embargo, se desconocía si un astrocito podía liberar distintos tipos de gliotransmisores o, por el contrario, existían subpoblaciones de astrocitos capaces de liberar un sólo tipo de gliotransmisor específico. Nuestros datos muestran que la activación de un sólo astrocito es suficiente para inducir la liberación de glutamato y ATP/adenosina (ver Figura 32) y modular la transmisión sináptica de manera diferente dependiendo de la estimulación. Estos datos sugieren que no existen astrocitos especializados en la síntesis y liberación de cada gliotransmisor sino que los astrocitos tienen la capacidad de liberar diferentes tipos de gliotransmisores y responder de manera distinta según la señal neuronal que reciban.

Estudios previos han mostrado que los astrocitos expresan receptores GABA_B funcionales de manera que el GABA liberado por las interneuronas puede activar la señal de Ca²⁺ intracelular en los astrocitos induciendo la liberación de gliotransmisores. Sin embargo, existían datos contradictorios en cuanto al gliotransmisor liberado tras la activación de receptores de GABA_B en los astrocitos. Mientras que Kang *et al.* en 1998 propusieron la liberación de glutamato, Serrano *et al.* en 2006 propusieron que los astrocitos liberan ATP tras la activación de receptores de GABA_B. Estos datos son aparentemente contradictorios, sin embargo, son consistentes con los resultados expuestos en este trabajo, los cuales muestran que los astrocitos pueden liberar tanto glutamato como ATP/adenosina tras la activación de la misma ruta de señalización.

6. LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO Y ATP/ADENOSINA DEPENDE DE LA DURACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y DEL PATRÓN DE DISPARO NEURONAL.

La liberación de glutamato y ATP/adenosina desde los astrocitos depende del tiempo que dure la estimulación neuronal. De modo que estímulos de corta duración dan lugar únicamente a la liberación de glutamato y a una potenciación de la neurotransmisión mediada por receptores mGluR de tipo 1 (cf.(Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010)). Por otro lado, la actividad neuronal sostenida induce no solo la liberación de glutamato, sino también de ATP dando lugar a un fenómeno bifásico que comienza con una potenciación de la transmisión sináptica mediada por la activación de mGluR₁ seguida de una depresión de la probabilidad de liberación de neurotransmisor mediada por la activación de receptores A₁. Estos resultados muestran una relación entre la duración del estímulo que el astrocito recibe y el tipo de gliotransmisor que libera. De este modo, los astrocitos liberan glutamato al inicio del estímulo y, posteriormente, liberan ATP/adenosina si el estímulo es lo bastante duradero. Por tanto, parecen existir dos umbrales temporales de liberación de gliotransmisores, uno de ellos a partir del cual los astrocitos liberan glutamato y otro por el cual liberan el gliotransmisor ATP/adenosina.

Además, la duración del estímulo neuronal no es el único parámetro que los astrocitos descifren, sino que también decodifican la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las interneuronas adaptan su respuesta mediante la liberación de distintos gliotransmisores, resultando en una modulación de la transmisión sináptica diferente dependiendo de la frecuencia de disparo de las interneuronas. De este modo, frecuencias de disparo de potenciales de acción de relativamente baja frecuencia dan lugar a la liberación de glutamato y

a una potenciación de la transmisión sináptica transitoria. Mientras que, al igual que ocurre con la duración del estímulo neuronal, frecuencias de disparo de potenciales de acción de relativamente alta frecuencia dan como resultado también a la liberación de ATP/adenosina, por lo que la potenciación sináptica se continúa con una depresión de la liberación de neurotransmisor. Sin embargo, el curso temporal de la modulación bifásica de la transmisión sináptica fue diferente en respuesta a las diferentes frecuencias de disparo de potenciales de acción neuronales aplicados, indicando que a mayor actividad neuronal mayor es también el efecto de los gliotransmisores sobre la transmisión sináptica (ver Figura 34).

Además, nuestros indican que existe un periodo de tiempo durante el que se co-libera tanto glutamato como ATP, ya que el efecto del glutamato proveniente de los astrocitos sobre la transmisión sináptica es mayor cuando no se libera ATP/adenosina o cuando los receptores A_1 se encuentran bloqueados. Por otro lado, hemos observado que el efecto del glutamato ocurre de manera rápida y corta, mientras que el efecto del ATP/adenosina se desarrolla de manera más lenta y con mayor duración (cf. (Serrano et al., 2006; Perea & Araque, 2007; Navarrete & Araque, 2010). Estas diferencias en el curso temporal de los efectos de uno y otro gliotransmisores sobre la transmisión sináptica pueden ser explicadas tanto por su modo de acción así como por su recaptación. El glutamato liberado por los astrocitos activa mGluR de tipo 1 y es rápidamente recaptado desde el espacio extracelular (Zerangue & Kavanaugh, 1996; Shigeri et al., 2004), por lo que su efecto sobre la transmisión sináptica es relativamente corto. Sin embargo, el ATP debe ser convertido a adenosina para ejercer su acción sobre los receptores A_1 por lo que su efecto sobre la transmisión sináptica se desarrolla de manera más lenta (Zimmermann & Braun, 1999; Burnstock, 2007).

En resumen, nuestros datos indican que la actividad neuronal de corta duración o de relativamente baja frecuencia induce la liberación del gliotransmisor glutamato por parte de los astrocitos. Por otro lado, la actividad neuronal sostenida o de alta frecuencia conlleva la liberación tanto de glutamato como de ATP/adenosina desde los astrocitos dando lugar a una potenciación seguida de una depresión de la transmisión sináptica. Sin embargo, la duración del estímulo neuronal tiene un efecto distinto sobre la modulación por astrocitos que el patrón de disparo neuronal, ya que el curso temporal de la modulación bifásica es constante independiente del tiempo de actividad neuronal. Por otro lado, la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las interneuronas afecta a la duración de la modulación sináptica mediada por astrocitos, de manera que a mayor frecuencia de disparo neuronal mayor es el efecto de los gliotransmisores liberados. Estos datos indican que los astrocitos tienen la capacidad de descifrar e integrar señales complejas provenientes de la actividad neuronal, lo que puede tener importantes implicaciones sobre la modulación de la actividad de las redes

neuronales. Esto es especialmente importante en la región del hipocampo donde la actividad neuronal sincronizada es la base de los procesos de memoria y aprendizaje (revisado en (Lisman & Jensen, 2013)).

7. EL CONCEPTO DE SINAPSIS TRIPARTITA.

El papel del Ca^{2+} en los astrocitos y la gliotransmisión se han cuestionado recientemente basándose en resultados negativos obtenidos usando líneas de ratones transgénicos (Fiacco *et al.*, 2007; Petravicz *et al.*, 2008; Agulhon *et al.*, 2010; Fujita *et al.*, 2014; Sloan & Barres, 2014), incluyendo al ratón transgénico $\text{IP}_3\text{R}2^{-/-}$. Sin embargo, en el presente estudio se ha observado que este ratón no presenta la potenciación sináptica a largo plazo mediada por eCBs ni la modulación bifásica de la transmisión sináptica. Nuestros datos, junto con otros estudios (Haydon & Carmignoto, 2006; Perea & Araque, 2007; Di Castro *et al.*, 2011; Panatier *et al.*, 2011; Takata *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012) demuestran una gran relevancia fisiológica del papel de los astrocitos sobre la función sináptica.

Por lo tanto, nuestros resultados apoyan el concepto de la Sinapsis Tripartita, mostrando que los astrocitos están involucrados activamente en la función sináptica y la plasticidad, siendo capaces de extender espacialmente señales intercelulares e incluso transformar el signo del efecto de los mensajeros intercelulares. Además, nuestro estudio aporta evidencias adicionales de la contribución de los astrocitos a la plasticidad sináptica (Martineau *et al.*, 2006; Panatier *et al.*, 2006; Perea & Araque, 2007; Henneberger *et al.*, 2010; Takata *et al.*, 2011; Min & Nevian, 2012; Navarrete *et al.*, 2012), indicando que los astrocitos se encuentran involucrados de manera activa en el almacenamiento de información en el cerebro.

En resumen, presentamos evidencias indicando que los eCBs pueden inducir LTP mediante la participación necesaria de los astrocitos y la liberación de gliotransmisores, revelando de esta manera las diferentes rutas de señalización a nivel celular y molecular que subyacen a la potenciación de la neurotransmisión mediada por eCBs. Estas son la interacción entre las neuronas piramidales y los astrocitos, y la señalización por eCBs, mGluR, óxido nítrico y PKC. Mientras que los eCBs han sido generalmente considerados señales retrógradas que deprimen la neurotransmisión (Kreitzer & Regehr, 2001; Alger, 2002; Wilson & Nicoll, 2002; Freund *et al.*, 2003; Chevaleyre *et al.*, 2006; Heifets & Castillo, 2009; Navarrete & Araque, 2010), nosotros mostramos que pueden llevar a una regulación de la transmisión sináptica en sinapsis lejanas convirtiéndola en una potenciación lateral mediante la activación de los

astrocitos.

Esta LTP inducida por eCBs requiere la actividad coordinada de los tres elementos de la Sinapsis Tripartita:

- i) Es necesaria la elevación de los niveles de Ca^{2+} en los **astrocitos** y la liberación del gliotransmisor glutamato.
- ii) La actividad en la **neurona postsináptica** induce la producción y liberación de óxido nítrico.
- iii) Es necesaria la activación de mGluRs y PKC en el **terminal presináptico**.

Nuestros resultados muestran un mecanismo novedoso que concilia resultados previos obtenidos sobre el papel del óxido nítrico y la señalización por eCBs en la LTP (Schuman & Madison, 1991; Carlson *et al.*, 2002; Crosby *et al.*, 2011; Hardingham *et al.*, 2013), y la plasticidad sináptica mediada por astrocitos (Panatier *et al.*, 2006; Perea & Araque, 2007; Henneberger *et al.*, 2010; Takata *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012).

Además, los datos obtenidos sobre la liberación de gliotransmisores muestran que los astrocitos descifran e integran la información de la actividad neuronal circundante y adaptan su respuesta con la liberación de distintos gliotransmisores. Por tanto, estos resultados revelan novedosos mecanismos moleculares que arrojan luz sobre las consecuencias de la señal de Ca^{2+} en los astrocitos desencadenada por diferentes sistemas de señalización (i. e. eCBs y GABA) sobre la actividad sináptica y la plasticidad en el hipocampo.

VI. CONCLUSIONES

1. Los eCBs liberados por las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo pueden generar un aumento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor a largo plazo (eLTP) en las sinapsis de CA3-CA1 de hipocampo de ratón.
2. La eLTP requiere la actividad coordinada de los tres elementos de la Sinapsis Tripartita.
3. La elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular en los astrocitos mediada por la activación de receptores CB1 y la liberación de glutamato es necesaria para inducir la eLTP.
4. La eLTP requiere la producción de óxido nítrico en la célula postsináptica.
5. La activación de mGluR de tipo 1 y de PKC son necesarias para la inducción de la eLTP.
6. Las sinapsis de CA3-CA1 del hipocampo pueden ser moduladas diferencialmente por distintos gliotransmisores.
7. Un único astrocito tiene la capacidad de liberar los gliotransmisores glutamato y ATP/adenosina.
8. Los astrocitos presentan receptores GABA_B funcionales en su membrana y responden a GABA liberado sinápticamente con elevaciones de Ca^{2+} intracelulares.
9. Los astrocitos liberan glutamato y ATP/adenosina induciendo una modulación bifásica de la transmisión sináptica.
10. La liberación de glutamato o ATP/adenosina por parte de los astrocitos depende tanto de la duración de la actividad neuronal como de la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las interneuronas.
11. La liberación de glutamato de los astrocitos ocurre bajo estímulos de relativamente corta duración y/o de relativamente baja frecuencia de disparo de potenciales de acción de las interneuronas e induce una potenciación transitoria de la liberación de neurotransmisor.
12. La liberación de ATP/adenosina de los astrocitos ocurre bajo estímulos de relativamente larga duración y/o de relativamente alta frecuencia de disparo de potenciales de acción de las interneuronas, induciendo una depresión transitoria de la liberación de neurotransmisor.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, I.B. & Martin, B.R. (1996) Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*, **91**, 1585-1614.
- Agulhon, C., Fiacco, T.A. & McCarthy, K.D. (2010) Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science*, **327**, 1250-1254.
- Agulhon, C., Sun, M.Y., Murphy, T., Myers, T., Lauderdale, K. & Fiacco, T.A. (2012) Calcium Signaling and Gliotransmission in Normal vs. Reactive Astrocytes. *Frontiers in pharmacology*, **3**, 139.
- Alger, B.E. (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in neurobiology*, **68**, 247-286.
- Anwyl, R. (2009) Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology*, **56**, 735-740.
- Araque, A., Carmignoto, G. & Haydon, P.G. (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual review of physiology*, **63**, 795-813.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R. & Volterra, A. (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, **81**, 728-739.
- Araque, A., Li, N., Doyle, R.T. & Haydon, P.G. (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 666-673.
- Araque, A., Martin, E.D., Perea, G., Arellano, J.I. & Buno, W. (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 2443-2450.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P. & Haydon, P.G. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, **22**, 208-215.
- Bacci, A., Huguenard, J.R. & Prince, D.A. (2004) Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature*, **431**, 312-316.

- Banerjee, A., Gonzalez-Rueda, A., Sampaio-Baptista, C., Paulsen, O. & Rodriguez-Moreno, A. (2014) Distinct mechanisms of spike timing-dependent LTD at vertical and horizontal inputs onto L2/3 pyramidal neurons in mouse barrel cortex. *Physiological reports*, **2**, e00271.
- Bartos, M., Vida, I. & Jonas, P. (2007) Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature reviews. Neuroscience*, **8**, 45-56.
- 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.
- Bender, V.A., Bender, K.J., Brasier, D.J. & Feldman, D.E. (2006) Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 4166-4177.
- Bessman, S.P., Rossen, J. & Layne, E.C. (1953) Gamma-Aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain. *The Journal of biological chemistry*, **201**, 385-391.
- Bon, C.L. & Garthwaite, J. (2003) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 1941-1948.
- Bonansco, C., Couve, A., Perea, G., Ferradas, C.A., Roncagliolo, M. & Fuenzalida, M. (2011) Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *The European journal of neuroscience*, **33**, 1483-1492.
- Bouchard, J.F., Lepicier, P. & Lamontagne, D. (2003) Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life sciences*, **72**, 1859-1870.
- Bowery, N.G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J.P., Marshall, F., Raiteri, M., Bonner, T.I. & Enna, S.J. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacological reviews*, **54**, 247-264.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z. & Ellisman, M.H. (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience*, **22**, 183-192.
- Bussieres, N. & El Manira, A. (1999) GABA(B) receptor activation inhibits N- and P/Q-type calcium channels in cultured lamprey sensory neurons. *Brain research*, **847**, 175-185.
- Buzsaki, G. & Draguhn, A. (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, **304**, 1926-1929.

- 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.
- Cardin, J.A., Carlen, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.H. & Moore, C.I. (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, **459**, 663-667.
- Carlson, G., Wang, Y. & Alger, B.E. (2002) Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nature neuroscience*, **5**, 723-724.
- Castillo, P.E., Younts, T.J., Chavez, A.E. & Hashimoto, Y. (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, **76**, 70-81.
- Caterina, M.J. & Julius, D. (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual review of neuroscience*, **24**, 487-517.
- Chalifoux, J.R. & Carter, A.G. (2011) GABAB receptor modulation of synaptic function. *Current opinion in neurobiology*, **21**, 339-344.
- 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.
- Chavez, A.E., Chiu, C.Q. & Castillo, P.E. (2010) TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nature neuroscience*, **13**, 1511-1518.
- Chevalyere, V. & Castillo, P.E. (2004) Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron*, **43**, 871-881.
- Chevalyere, V., Takahashi, K.A. & Castillo, P.E. (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 37-76.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J. & McLennan, H. (1983) The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro. *The Journal of physiology*, **334**, 19-31.
- Corlew, R., Wang, Y., Ghermazien, H., Erisir, A. & Philpot, B.D. (2007) Developmental switch in the contribution of presynaptic and postsynaptic NMDA receptors to long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 9835-9845.

- 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**, 470-473.
- Covelo, A. & Araque, A. (2015) Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes. *Neuroscience*.
- 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.
- Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V. & Di Marzo, V. (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, **139**, 1405-1415.
- Cristino, L., Starowicz, K., De Petrocellis, L., Morishita, J., Ueda, N., Guglielmotti, V. & Di Marzo, V. (2008) Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience*, **151**, 955-968.
- Crosby, K.M., Inoue, W., Pittman, Q.J. & Bains, J.S. (2011) Endocannabinoids gate state-dependent plasticity of synaptic inhibition in feeding circuits. *Neuron*, **71**, 529-541.
- D'Ascenzo, M., Fellin, T., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Meaney, D.F., Auberson, Y.P., Moss, S.J. & Haydon, P.G. (2007) mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 1995-2000.
- Darabid, H., Arbour, D. & Robitaille, R. (2013) Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **33**, 1297-1313.
- Darabid, H., Perez-Gonzalez, A.P. & Robitaille, R. (2014) Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nature reviews. Neuroscience*, **15**, 703-718.
- Daw, M.I., Chittajallu, R., Bortolotto, Z.A., Dev, K.K., Duprat, F., Henley, J.M., Collingridge, G.L. & Isaac, J.T. (2000) PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Neuron*, **28**, 873-886.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**, 1946-1949.

- Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P. & Volterra, A. (2011) Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature neuroscience*, **14**, 1276-1284.
- Dinh, T.P., Freund, T.F. & Piomelli, D. (2002) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chemistry and physics of lipids*, **121**, 149-158.
- Engisch, K.L., Wagner, J.J. & Alger, B.E. (1996) Whole-cell voltage-clamp investigation of the role of PKC in muscarinic inhibition of IAHP in rat CA1 hippocampal neurons. *Hippocampus*, **6**, 183-191.
- Fiacco, T.A., Agulhon, C., Taves, S.R., Petravicz, J., Casper, K.B., Dong, X., Chen, J. & McCarthy, K.D. (2007) Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron*, **54**, 611-626.
- 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.
- Fraser, D.D., Mudrick-Donnon, L.A. & MacVicar, B.A. (1994) Astrocytic GABA receptors. *Glia*, **11**, 83-93.
- Freund, T.F., Katona, I. & Piomelli, D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological reviews*, **83**, 1017-1066.
- Fujita, T., Chen, M.J., Li, B., Smith, N.A., Peng, W., Sun, W., Toner, M.J., Kress, B.T., Wang, L., Benraiss, A., Takano, T., Wang, S. & Nedergaard, M. (2014) Neuronal transgene expression in dominant-negative SNARE mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **34**, 16594-16604.
- Gaoni, Y. & Mechoulam, R. (1964) Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, **86**, 1646-1647.
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D. & Rouach, N. (2010) NEURON-GLIA INTERACTIONS Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, **11**, 87-99.
- Giaume, C. & McCarthy, K.D. (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends in neurosciences*, **19**, 319-325.
- Gomez-Gonzalo, M., Navarrete, M., Perea, G., Covelo, A., Martin-Fernandez, M., Shigemoto, R., Lujan, R. & Araque, A. (2014) Endocannabinoids Induce Lateral Long-Term Potentiation of Transmitter Release by Stimulation of Gliotransmission. *Cerebral cortex*.

- 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. *Nature neuroscience*, **2**, 139-143.
- Grueter, B.A., Brasnjo, G. & Malenka, R.C. (2010) Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nature neuroscience*, **13**, 1519-1525.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*, **260**, 3440-3450.
- Hajos, N., Kathuria, S., Dinh, T., Piomelli, D. & Freund, T.F. (2004) Endocannabinoid transport tightly controls 2-arachidonoyl glycerol actions in the hippocampus: effects of low temperature and the transport inhibitor AM404. *The European journal of neuroscience*, **19**, 2991-2996.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.H. & Haydon, P.G. (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *Journal of Neuroscience*, **27**, 6473-6477.
- Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., Koehl, M., Abrous, D.N., Mendizabal-Zubiaga, J., Grandes, P., Liu, Q., Bai, G., Wang, W., Xiong, L., Ren, W., Marsicano, G. & Zhang, X. (2012) Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, **148**, 1039-1050.
- Hardingham, N., Dachtler, J. & Fox, K. (2013) The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in cellular neuroscience*, **7**, 190.
- Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T. & Kano, M. (2007) Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, **13**, 127-137.
- Hatten, M.E. & Mason, C.A. (1990) Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia*, **46**, 907-916.
- Haydon, P.G. & Carmignoto, G. (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological reviews*, **86**, 1009-1031.
- Heifets, B.D. & Castillo, P.E. (2009) Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annual review of physiology*, **71**, 283-306.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H. & Rusakov, D.A. (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*, **463**, 232-236.

- Hertz, L. (2013) The Glutamate-Glutamine (GABA) Cycle: Importance of Late Postnatal Development and Potential Reciprocal Interactions between Biosynthesis and Degradation. *Frontiers in endocrinology*, **4**, 59.
- Hillard, C.J., Edgemond, W.S., Jarrahan, A. & Campbell, W.B. (1997) Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *Journal of neurochemistry*, **69**, 631-638.
- Hillard, C.J., Wilkison, D.M., Edgemond, W.S. & Campbell, W.B. (1995) Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochimica et biophysica acta*, **1257**, 249-256.
- Holtzclaw, L.A., Pandhit, S., Bare, D.J., Mignery, G.A. & Russell, J.T. (2002) Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Glia*, **39**, 69-84.
- 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., Mechoulam, R. & Pertwee, R.G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, **54**, 161-202.
- Hua, X., Malarkey, E.B., Sunjara, V., Rosenwald, S.E., Li, W.H. & Parpura, V. (2004) C(a2+)-dependent glutamate release involves two classes of endoplasmic reticulum Ca(2+) stores in astrocytes. *Journal of neuroscience research*, **76**, 86-97.
- Innocenti, B., Parpura, V. & Haydon, P.G. (2000) Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 8710-8715.
- Isaacson, J.S. & Scanziani, M. (2011) How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*, **72**, 231-243.
- Ishac, E.J., Jiang, L., Lake, K.D., Varga, K., Abood, M.E. & Kunos, G. (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *British journal of pharmacology*, **118**, 2023-2028.

- Jimenez-Gonzalez, C., Pirttimaki, T., Cope, D.W. & Parri, H.R. (2011) Non-neuronal, slow GABA signalling in the ventrobasal thalamus targets delta-subunit-containing GABA(A) receptors. *The European journal of neuroscience*, **33**, 1471-1482.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A. & Nedergaard, M. (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature neuroscience*, **1**, 683-692.
- Kettenmann, H. & Ransom, B.R. (2005) Neuroglia. 2nd edition. Oxford University Press, New York.
- Klausberger, T., Magill, P.J., Marton, L.F., Roberts, J.D., Cobden, P.M., Buzsaki, G. & Somogyi, P. (2003) Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature*, **421**, 844-848.
- Kosaka, T. & Hama, K. (1986) Three-dimensional structure of astrocytes in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, **249**, 242-260.
- Kreitzer, A.C. & Regehr, W.G. (2001) Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**, RC174.
- Kreitzer, A.C. & Regehr, W.G. (2002) Retrograde signaling by endocannabinoids. *Current opinion in neurobiology*, **12**, 324-330.
- Kwon, H.B. & Castillo, P.E. (2008) Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, **57**, 108-120.
- Lambert, N.A. & Wilson, W.A. (1996) High-threshold Ca²⁺ currents in rat hippocampal interneurons and their selective inhibition by activation of GABA(B) receptors. *The Journal of physiology*, **492 (Pt 1)**, 115-127.
- Lepicier, P., Bouchard, J.F., Lagneux, C. & Lamontagne, D. (2003) Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *British journal of pharmacology*, **139**, 805-815.
- Li, X., Zima, A.V., Sheikh, F., Blatter, L.A. & Chen, J. (2005) Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP3)-receptor type 2-deficient mice. *Circulation research*, **96**, 1274-1281.
- Ling, D.S., Benardo, L.S., Serrano, P.A., Blace, N., Kelly, M.T., Crary, J.F. & Sacktor, T.C. (2002) Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nature neuroscience*, **5**, 295-296.
- Lisman, J.E. & Jensen, O. (2013) The theta-gamma neural code. *Neuron*, **77**, 1002-1016.

- Liu, Q.S., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J. & Nedergaard, M. (2004) Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 3172-3177.
- Losi, G., Mariotti, L. & Carmignoto, G. (2014) GABAergic interneuron to astrocyte signalling: a neglected form of cell communication in the brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **369**, 20130609.
- Lujan, R., Nusser, Z., Roberts, J.D., Shigemoto, R. & Somogyi, P. (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience*, **8**, 1488-1500.
- Luscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C. & Nicoll, R.A. (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*, **19**, 687-695.
- Luscher, C., Xia, H., Beattie, E.C., Carroll, R.C., von Zastrow, M., Malenka, R.C. & Nicoll, R.A. (1999) Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron*, **24**, 649-658.
- Lynch, G.S., Dunwiddie, T. & Gribkoff, V. (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature*, **266**, 737-739.
- Marinelli, S., Pacioni, S., Bisogno, T., Di Marzo, V., Prince, D.A., Huguenard, J.R. & Bacci, A. (2008) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is responsible for the slow self-inhibition in neocortical interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 13532-13541.
- Martin, E.D., Araque, A. & Buno, W. (2001) Synaptic regulation of the slow Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *Journal of neurophysiology*, **86**, 2878-2886.
- Martin, E.D., Fernandez, M., Perea, G., Pascual, O., Haydon, P.G., Araque, A. & Cena, V. (2007) Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia*, **55**, 36-45.
- Martineau, M., Baux, G. & Mothet, J.P. (2006) Gliotransmission at central glutamatergic synapses: D-serine on stage. *Journal of physiology, Paris*, **99**, 103-110.
- 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. *Annual review of biochemistry*, **74**, 411-432.
- Min, R. & Nevian, T. (2012) Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nature neuroscience*, **15**, 746-753.
- Min, R., Santello, M. & Nevian, T. (2012) The computational power of astrocyte mediated synaptic plasticity. *Front Comput Neurosci*, **6**, 93.
- Minta, A., Kao, J.P. & Tsien, R.Y. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *The Journal of biological chemistry*, **264**, 8171-8178.
- Miyazaki, S. (1988) Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *The Journal of cell biology*, **106**, 345-353.
- Navarrete, M. & Araque, A. (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, **57**, 883-893.
- Navarrete, M. & Araque, A. (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*, **68**, 113-126.
- Navarrete, M., Diez, A. & Araque, A. (2014) Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **369**, 20130599.
- Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gomez-Gonzalo, M., Nunez, A., Martin, E.D. & Araque, A. (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS biology*, **10**, e1001259.
- Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S.A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences*, **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. *Journal of neurophysiology*, **87**, 528-537.
- Nevian, T. & Sakmann, B. (2006) Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 11001-11013.
- Newman, E.A. & Zahs, K.R. (1997) Calcium waves in retinal glial cells. *Science*, **275**, 844-847.

- Nixdorf-Bergweiler, B.E., Albrecht, D. & Heinemann, U. (1994) Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia*, **12**, 180-195.
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. & Kano, M. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, **29**, 729-738.
- Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Mizushima, I., Yoneda, N., Zimmer, A. & Kano, M. (2002) Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 3864-3872.
- Olsen, W.R., & DeLorey, M.T. (1999) Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Elsevier.
- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A. & Oliet, S.H. (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell*, **125**, 775-784.
- Panatier, A., Vallee, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.C. & Robitaille, R. (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*, **146**, 785-798.
- Parpura, V. & Zorec, R. (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain research reviews*, **63**, 83-92.
- Parri, H.R., Gould, T.M. & Crunelli, V. (2001) Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nature neuroscience*, **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.
- Perea, G. & Araque, A. (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 2192-2203.
- Perea, G. & Araque, A. (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, **317**, 1083-1086.
- Perea, G. & Araque, A. (2010) GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev*, **63**, 93-102.

- Perea, G., Navarrete, M. & Araque, A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*, **32**, 421-431.
- Perea, G., Sur, M. & Araque, A. (2014a) Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Frontiers in cellular neuroscience*, **8**, 378.
- Perea, G., Yang, A., Boyden, E.S. & Sur, M. (2014b) Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nature communications*, **5**, 3262.
- Perez-Alvarez, A., Navarrete, M., Covelo, A., Martin, E.D. & Araque, A. (2014) Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **34**, 12738-12744.
- Pertwee, R.G. (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & therapeutics*, **74**, 129-180.
- Pertwee, R.G. (1998) Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors. *Biochemical Society transactions*, **26**, 267-272.
- Peterfi, Z., Urban, G.M., Papp, O.I., Nemeth, B., Monyer, H., Szabo, G., Erdelyi, F., Mackie, K., Freund, T.F., Hajos, N. & Katona, I. (2012) Endocannabinoid-mediated long-term depression of afferent excitatory synapses in hippocampal pyramidal cells and GABAergic interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 14448-14463.
- Peters, J.L., Earnest, B.J., Tjalkens, R.B., Cassone, V.M. & Zoran, M.J. (2005) Modulation of intercellular calcium signaling by melatonin in avian and mammalian astrocytes is brain region-specific. *The Journal of comparative neurology*, **493**, 370-380.
- Petilla Interneuron Nomenclature, G., Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsaki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairen, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T.F., Gardner, D., Gardner, E.P., Goldberg, J.H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., Karube, F., Kisvarday, Z.F., Lambolez, B., Lewis, D.A., Marin, O., Markram, H., Munoz, A., Packer, A., Petersen, C.C., Rockland, K.S., Rossier, J., Rudy, B., Somogyi, P., Staiger, J.F., Tamas, G., Thomson, A.M., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., West, D.C. & Yuste, R. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience*, **9**, 557-568.
- Petravicz, J., Fiacco, T.A. & McCarthy, K.D. (2008) Loss of IP3 receptor-dependent Ca²⁺ increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 4967-4973.

- Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews. Neuroscience*, **4**, 873-884.
- Puente, N., Cui, Y., Lassalle, O., Lafourcade, M., Georges, F., Venance, L., Grandes, P. & Manzoni, O.J. (2011) Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nature neuroscience*, **14**, 1542-1547.
- Raastad, M. (1995) Extracellular activation of unitary excitatory synapses between hippocampal CA3 and CA1 pyramidal cells. *The European journal of neuroscience*, **7**, 1882-1888.
- Roberts, E. & Frankel, S. (1950) gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *The Journal of biological chemistry*, **187**, 55-63.
- Roberts, J.C., Davis, J.B. & Benham, C.D. (2004) [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain research*, **995**, 176-183.
- Rodriguez-Moreno, A. & Paulsen, O. (2008) Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nature neuroscience*, **11**, 744-745.
- Rodriguez-Moreno, A., Sistiaga, A., Lerma, J. & Sanchez-Prieto, J. (1998) Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. *Neuron*, **21**, 1477-1486.
- Rodriguez, J.S., Bactor, S.Y., Flores, L.C., Phelix, C.F. & Martinez, J.L., Jr. (2011) Local pretreatment with the cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 attenuates methamphetamine intra-accumbens self-administration. *Neuroscience letters*, **489**, 187-191.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K. & Giaume, C. (2008) Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science*, **322**, 1551-1555.
- Safo, P.K. & Regehr, W.G. (2005) Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron*, **48**, 647-659.
- Sanchez-Prieto, J., Paternain, A.V. & Lerma, J. (2004) Dual signaling by mGluR5a results in bi-directional modulation of N-type Ca²⁺ channels. *FEBS letters*, **576**, 428-432.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K. & Stevens, B. (2013) The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*, **61**, 24-36.

- Schipke, C.G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F. & Kettenmann, H. (2002) Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **16**, 255-257.
- Schuman, E.M. & Madison, D.V. (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, **254**, 1503-1506.
- Schuman, E.M. & Madison, D.V. (1994) Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 153-183.
- Seroussi, Y., Brosh, I. & Barkai, E. (2002) Learning-induced reduction in post-burst after-hyperpolarization (AHP) is mediated by activation of PKC. *The European journal of neuroscience*, **16**, 965-969.
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.C. & Robitaille, R. (2006) GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 5370-5382.
- Serrano, A., Robitaille, R. & Lacaille, J.C. (2008) Differential NMDA-dependent activation of glial cells in mouse hippocampus. *Glia*, **56**, 1648-1663.
- Shen, M., Piser, T.M., Seybold, V.S. & Thayer, S.A. (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**, 4322-4334.
- Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R.T., O'Dell, T.J. & Khakh, B.S. (2013) TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J Neurosci*, **33**, 10143-10153.
- Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P. & Khakh, B.S. (2012) TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nature neuroscience*, **15**, 70-80.
- Sivilotti, L. & Nistri, A. (1991) GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, **36**, 35-92.
- Sjostrom, P.J., Turrigiano, G.G. & Nelson, S.B. (2003) Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron*, **39**, 641-654.
- Sloan, S.A. & Barres, B.A. (2014) Looks can be deceiving: reconsidering the evidence for gliotransmission. *Neuron*, **84**, 1112-1115.

- Song, J., Kyriakatos, A. & El Manira, A. (2012) Gating the polarity of endocannabinoid-mediated synaptic plasticity by nitric oxide in the spinal locomotor network. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 5097-5105.
- Spacek, J. (1985) Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. Glial sheath. *Anatomy and embryology*, **171**, 245-252.
- Sul, J.Y., Orosz, G., Givens, R.S. & Haydon, P.G. (2004) Astrocytic connectivity in the hippocampus. *Neuron glia biology*, **1**, 3-11.
- Sun, W., McConnell, E., Pare, J.F., Xu, Q., Chen, M., Peng, W., Lovatt, D., Han, X., Smith, Y. & Nedergaard, M. (2013) Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science*, **339**, 197-200.
- Szabo, B., Muller, T. & Koch, H. (1999) Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *Journal of neurochemistry*, **73**, 1084-1089.
- Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K. & Hirase, H. (2011) Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci*, **31**, 18155-18165.
- Tamagnini, F., Barker, G., Warburton, E.C., Burattini, C., Aicardi, G. & Bashir, Z.I. (2013) Nitric oxide-dependent long-term depression but not endocannabinoid-mediated long-term potentiation is crucial for visual recognition memory. *The Journal of physiology*, **591**, 3963-3979.
- Taqatqeh, F., Mergia, E., Neitz, A., Eysel, U.T., Koesling, D. & Mittmann, T. (2009) More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, **29**, 9344-9350.
- Theodosis, D.T., Poulain, D.A. & Oliet, S.H. (2008) Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological reviews*, **88**, 983-1008.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F. & et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*, **266**, 15771-15781.
- Tsien, R.Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, **19**, 2396-2404.

- Tsien, R.Y. (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, **290**, 527-528.
- Turner, P.R., Jaffe, L.A. & Fein, A. (1986) Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs by inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP-binding protein. *The Journal of cell biology*, **102**, 70-76.
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S. & Barres, B.A. (2001) Control of synapse number by glia. *Science*, **291**, 657-661.
- Ulrich, D. & Bettler, B. (2007) GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Current opinion in neurobiology*, **17**, 298-303.
- Varga, C., Golshani, P. & Soltesz, I. (2012) Frequency-invariant temporal ordering of interneuronal discharges during hippocampal oscillations in awake mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E2726-2734.
- Ventura, R. & Harris, K.M. (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **19**, 6897-6906.
- Vernadakis, A. (1996) Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Progress in neurobiology*, **49**, 185-214.
- Virchow, R. (1846) Über das granulirte ansehn der wandungen der gerhirnventrikel. *Allg.Z. Psychiatr.* **3**, 242.
- Volterra, A. & Meldolesi, J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature reviews. Neuroscience*, **6**, 626-640.
- Wagner, P.G. & Dekin, M.S. (1997) cAMP modulates an S-type K⁺ channel coupled to GABAB receptors in mammalian respiratory neurons. *Neuroreport*, **8**, 1667-1670.
- Walz, W. (1989) Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Progress in neurobiology*, **33**, 309-333.
- 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.

- Xu, J.Y., Zhang, J. & Chen, C. (2012) Long-lasting potentiation of hippocampal synaptic transmission by direct cortical input is mediated via endocannabinoids. *The Journal of physiology*, **590**, 2305-2315.
- Zhang, J.M., Wang, H.K., Ye, C.Q., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z.L., Wu, C.P., Poo, M.M. & Duan, S. (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron*, **40**, 971-982.
- Zhuo, M., Laitinen, J.T., Li, X.C. & Hawkins, R.D. (1998) On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long-term potentiation in the hippocampus. *Learn Mem*, **5**, 467-480.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 5780-5785.
- Zorec, R., Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Verkhratsky, A. & Parpura, V. (2012) Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro*, **4**.

VIII. SEPARATAS

