



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA  
CELULAR

**Fisiología de los receptores de  
glutamato en transmisión y  
plasticidad sinápticas en el hipocampo  
y el cerebelo de ratón**

TESIS DOCTORAL

**RAFAEL FALCÓN MOYA**

DIRECTOR: Prof. Dr. ANTONIO RODRÍGUEZ MORENO

SEVILLA, 2022

D. Antonio Rodríguez Moreno, Catedrático de Fisiología de la Universidad Pablo de Olavide,

## INFORMA

Que D. Rafael Falcón Moya, con DNI 77861127D, ha realizado con total aprovechamiento y bajo su dirección los trabajos de investigación recogidos en esta memoria, titulada “Fisiología de los receptores de glutamato en transmisión y plasticidad sináptica en hipocampo y cerebelo de ratón”, para optar al grado de Doctor. Parte de este trabajo se encuentra reflejado en los siguientes artículos:

- Falcón-Moya, R., Losada-Ruiz, P., Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2018). Cerebellar Kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release requires Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and PKA. *Front. Mol Neurosci*, 11.
- Falcón-Moya, R., Pérez-Rodríguez, M., Prius-Mengual, J., Andrade-Talavera, Y., Arroyo-García, L. E., Pérez-Artés, R., ... & Rodríguez-Moreno, A. (2020). Astrocyte-mediated switch in spike timing-dependent plasticity during hippocampal development. *Nat. commun*, 11(1), 1-14.
- Falcón-Moya, R., Losada-Ruiz, P., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). Kainate receptor-mediated depression of glutamate release involves protein kinase A in the cerebellum. *Int. J. Mol. Sci*, 20(17), 4124.
- Falcón-Moya, R., Martínez-Gallego, I., & Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptor modulation of glutamatergic synaptic transmission in the CA2 region of the hippocampus. *J. Neurochem*. 158(5), 1083-1093.

Y para que así conste, firma el presente Informe en Sevilla, España, septiembre de 2022

Prof.. Antonio Rodríguez Moreno:

## Agradecimientos:

A mi tutor y director, el Profesor Antonio Rodríguez Moreno, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y realizar esta tesis doctoral, además de formarme, apoyarme, guiarme y mostrarme como ser un buen científico.

A mi madre, a la cual le tengo que agradecer todo lo lejos que he podido llegar, por ser mi apoyo constante que nunca me fallará.

A mi abuela, lejos de ser una abuela normal, eres mi mayor referente y orgullo, gracias por enseñarme a luchar y superarme a mí mismo.

A mi hermano por estar cuando lo he necesitado, como toda mi familia, en especial mis tías Nuria y Ofelia, siempre seréis especiales para mí.

A todos mis compañeros de laboratorio....

Pilar, por ser mi mejor amiga y darme los mejores momentos que he pasado fuera y dentro del laboratorio.

Cristina, por hacerme sentir seguro y ayudarme siempre que lo he necesitado.

Heriberto, gran amigo y científico, por aportarme tanto en ambos ámbitos.

Irene, mi compañera y amiga de siempre con sus múltiples retos interminables.

Pedro, por aconsejarme y hacerme ver el mundo científico desde otra perspectiva.

Ana, por la diversión, las salidas y los planes improvisados.

Al resto de compañeros de laboratorio en Minneapolis, destacando especialmente al Dr. Alfonso Araque y a Jose, por hacerme sentir uno más desde el principio.

A todos mis amigos....

Joaquín por acompañarme desde el principio hasta el final en este viaje.

Al equipo Mad men, los colegas que son y serán de toda la vida.

Ale, Marta, y Joaquín mis amigos de siempre, mi día a día.

Pepe, Dani y Torres, por aportarme con un toque especial.



*Un hombre que ha pasado por experiencias amargas y ha viajado lejos,  
disfruta incluso de sus sufrimientos después de un tiempo.*

*Homero-La Odisea*



## **RESUMEN**

Glutamato es el neurotransmisor excitador más importante del sistema nervioso central de los mamíferos. Las acciones fisiológicas de glutamato están mediadas por la activación de sus receptores (ionotrópicos y metabotrópicos) y sistemas de señalización. Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasifican en tres tipos, en función del agonista que los activa con mayor afinidad en receptores de tipo NMDA (NMDAR), de tipo AMPA (AMPA) y receptores de tipo kainato (KAR). El glutamato participa en la transmisión sináptica normal, así como en los procesos de potenciación y depresión de larga duración que son considerados los correlatos celulares de los procesos de aprendizaje, memoria, neurodesarrollo, entrenamiento sensorial y otras funciones. En el presente trabajo se ha estudiado la fisiología de los receptores presinápticos de glutamato de tipo kainato en el hipocampo y el cerebelo de ratón y los mecanismos celulares que subyacen a dichas acciones. Así se observó la facilitación de la liberación de glutamato mediada por la activación de estos receptores en la sinapsis establecida entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (PF-PuC) de cerebelo. En las sinapsis descritas, la facilitación observada se debe a la activación de KARs presinápticos permeables a calcio, es dependiente de los niveles de calcio citoplasmático e involucra a la cascada de señalización intracelular  $Ca^{2+}$ -calmodulina/adenilato ciclasa (AC)/ adenosín monofosfato cíclico (cAMP)/Proteína quinasa A (PKA). Asimismo, se ha estudiado el efecto depresor de la transmisión glutamatérgica mediado por la activación de KARs presinápticos en la sinapsis PF-PuC de cerebelo y las sinapsis de las colaterales de Schaffer y Cornus Ammonis 2 (SC-CA2) de hipocampo de ratón. En el cerebelo esta depresión está mediada por KAR e involucra a la PKA. En el hipocampo necesita el correcto funcionamiento de la PKA y proteínas G. En este trabajo también se han estudiados los mecanismos moleculares y celulares de la *Spike timing depend plasticity* (STDP). Tanto de depresión de larga duración (t-LTD) como potenciación de larga duración (t-LTP). Así se observó una t-LTD en las sinapsis SC-CA1 de hipocampo, que es evidente hasta la tercera semana posnatal en ratones, desapareciendo durante la cuarta semana. En etapas más maduras, se encontró que el protocolo que inducía t-LTD indujo t-LTP. Se ha caracterizó esta forma de t-LTP y los mecanismos involucrados en su inducción, así como también los que impulsan este cambio de t-LTD a t-LTP. Se observó que esta t-LTP se expresa presinápticamente en las sinapsis CA3-CA1, como lo demuestra el análisis del coeficiente de variación, del número de fallos, la relación de pulsos pareados y el análisis de

respuestas miniatura. Además, esta forma de t-LTP presináptica no requiere NMDAR, sino la activación de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona postsináptica a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje de tipo L y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de organulos intracelulares. El óxido nítrico (NO) también se requiere como mensajero de la neurona postsináptica. De manera crucial, se requiere la liberación de adenosina y glutamato por parte de los astrocitos para la inducción de esta t-LTP y para el cambio de t-LTD a t-LTP. Por lo tanto, se ha descubierto un cambio durante el desarrollo de la transmisión sináptica de t-LTD a t-LTP en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo en las que los astrocitos juegan un papel central revelando una forma de LTP presináptica y los mecanismos para su inducción.

## **ABSTRACT**

Glutamate is the most important excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. The physiological actions of glutamate are mediated by the activation of its receptors (ionotropic and metabotropic) and signaling systems. Ionotropic glutamate receptors are classified into three types, depending on the agonist that activates them with the highest affinity: NMDAR, AMPAR, and KAR. Glutamate participates in normal synaptic transmission, as well as in long-term potentiation and depression processes that are considered the cellular correlates of learning, memory and neurodevelopment processes and other forms of plasticity. In the present work, the physiology of kainate-type presynaptic glutamate receptors in the mouse hippocampus and cerebellum and the cellular mechanisms underlying these actions have been studied. Facilitation of glutamate release mediated by the activation of these receptors was observed in the Parallel fibers – Purkinje cells (PF-PuC) synapses of the cerebellum. In the synapses described, the observed facilitation is due to the activation of presynaptic calcium-permeable KAR, depends on cytoplasmic calcium levels, and involves intracellular  $Ca^{2+}$ -calmodulin/AC/cAMP/PKA signaling cascade. Likewise, the depressant effect of glutamatergic transmission mediated by the activation of presynaptic kainate receptors in the PF-PuC synapse of the cerebellum and Schaffer Collaterals- Cornu Ammonis 2 (SC-CA2) of the mouse hippocampus has been studied. In the cerebellum, this depression is mediated by kainate receptors and involves PKA. In the hippocampus, it requires the correct functioning of PKA and G proteins to produce the observed depression mediated by kainate receptors. In this work, the molecular and cellular mechanisms of Spike timing depend plasticity (STDP) have also been studied. Both long-term depression (t-LTD) and long-term potentiation (t-LTP). Thus, a t-LTD was observed in the SC-CA1 synapses of the hippocampus, which is evident until the third postnatal week in mice, disappearing during the fourth week. At more mature stages, the protocol that induced t-LTD was found to induce t-LTP. This form of t-LTP and the mechanisms involved in its induction, as well as those that drive this change from t-LTD to t-LTP, have been characterized. This t-LTP has been shown to be expressed presynaptically at CA3-CA1 synapses, as evidenced by coefficient of variation, number of failures, paired-pulse ratio, and miniature response analysis. Furthermore, this form of presynaptic t-LTP does not require NMDAR, but rather mGluR activation,  $Ca^{2+}$  entry into the postsynaptic neuron via L-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels and  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores. Nitric oxide

is also required as a postsynaptic neuron messenger. Crucially, adenosine and glutamate release from astrocytes are required for the induction of this t-LTP and for the switch from t-LTD to t-LTP. Thus, a developmental shift of synaptic transmission from t-LTD to t-LTP has been discovered at hippocampal CA3-CA1 synapses in which astrocytes play a central role revealing a peresynaptic form of LTP and the mechanisms for it. his induction.

# índice

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. RECEPTORES DE GLUTAMATO. ....	1
1.1.1. RECEPTORES DE TIPO NMDA.....	3
1.1.2. RECEPTORES DE TIPO AMPA .....	5
1.1.3. RECEPTORES DE TIPO KAINATO .....	6
1.2. EL CEREBELO .....	8
1.2.1. CITOARQUITECTURA DEL CEREBELO .....	9
1.2.2. CAPA MOLECULAR.....	12
1.2.3. CAPA DE LAS CÉLULAS DE PURKINJE .....	14
1.2.4. CAPA GRANULAR.....	15
1.2.5. RECEPTORES DE KAINATO EN EL CEREBELO.....	17
1.3. EL HIPOCAMPO .....	20
1.3.1. NEUROANATOMÍA DEL HIPOCAMPO. ....	22
1.3.2. FUNCIONES DEL HIPOCAMPO .....	24
1.4. PLASTICIDAD SINÁPTICA.....	26
1.4.1. PLASTICIDAD DE CORTA DURACIÓN.....	30
1.4.2. PLASTICIDAD DE LARGA DURACIÓN.....	30
1.4.3. SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY (STDP).....	31
1.5. ASTROCITOS.....	33
1.5.1. MORFOLOGÍA Y TIPOS.....	33
1.5.2. FUNCIÓN- SINAPSI TRIPARTITA.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. OBJETIVOS GENERALES .....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
3.1. OBTENCIÓN DEL TEJIDO.....	39
3.2. SOLUCIONES .....	41
SOLUCIÓN EXTRACELULAR.....	41
3.2.1. SOLUCIÓN INTERNA.....	42
3.3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	43
3.3.1. REGISTRO DE CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EXCITADORAS EVOCADAS.....	43
3.3.2. REGISTRO DE CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EXCITADORAS DE CAMPO EN RODAJAS .....	46
3.3.3. REGISTRO DE POTENCIALES POSTSINÁPTICOS EXCITADORES DE CAMPO <i>IN VIVO</i> . ....	46

3.4.	PROCOLOS EMPLEADOS.....	49
3.4.1.	PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA ESTUDIAR LOS MECANISMO DE ACCION DEL KAINATO SOBRE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO .....	49
3.4.2.	PROCOLOS DE PLASTICIDAD.....	50
3.5.	ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	51
4.	RESULTADOS .....	53
4.1.	PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EXCITADORA. ....	53
4.1.1.	PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (FP-PuC) DE CEREBELO DE RATÓN .....	53
4.1.1.1.	LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UN AUMENTO DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO DE RATÓN .....	53
4.1.1.2.	EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARS EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO ES PRESINÁPTICO.....	56
4.1.1.3.	LA FACILITACIÓN DE TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRESINÁPTICOS EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) INVOLUCRA LA RUTA ADENILATO CICLASA/ AMP CÍCLICO/ PROTEÍNA QUINASA A .....	58
4.1.1.4.	LA PROTEÍNA QUINASA C Y LAS PROTEÍNAS G SE REQUIEREN EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE KARS EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) .....	60
4.1.1.5.	LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO REQUIERE UN AUMENTO DE $Ca^{2+}$ EN EL CITOSOL EN SINAPSIS PF-PuC.....	60
4.1.1.6.	LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO (KARS) REQUIERE $Ca^{2+}$ -CALMODULINA EN LAS SINAPSIS PF-PuC.....	64
4.1.2.	LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO DE RATÓN .....	66
4.1.2.1	LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO POR $3\mu M$ KA PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA AMPLITUD DE LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EVOCADAS DE NMDA EN LAS SINAPSIS ENTRE FIBRAS PARALELAS Y CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DEL CEREBELO DE RATÓN .....	66
4.1.2.2.	MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARS EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO ES PRESINÁPTICO .....	68
4.1.2.3.	LA DEPRESIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA MEDIADA POR KAR EN LA SINAPSIS PF-PuC DEPENDE DE LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE CAMP.....	70

4.2.1.4. LA DEPRESIÓN DE LA AMPLITUD EN LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EVOCADAS DE NMDA MEDIADA POR KAR REQUIERE PROTEÍNA G EN LAS SINAPSIS PF-PuC.....	72
4.2.1.5. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LAS SINAPSIS PF-PuC NO ESTÁ MEDIADA POR KAR PERMEABLE AL CALCIO Y NO REQUIERE LA LIBERACIÓN DE CALCIO DE LAS RESERVAS INTRACELULARES .....	73
4.1.3. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFFER Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) DEL HIPOCAMPO DE RATÓN .....	75
4.1.3.1. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES SCHAFFER Y LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA2 (SC-CA2) DEL HIPOCAMPO DE RATÓN .....	75
4.1.3.2. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARS QUE MEDIAN DISMINUCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES SCHAFFER Y LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) ES PRESINÁPTICO.....	78
4.1.3.3. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRESINÁPTICOS EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS COLATERALES SCHAFFER Y LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA2 (SC-CA2) MEDIAN LA DEPRESIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA A TRAVÉS DE LA RUTA ADENILATO CICLASA/ AMP CÍCLICO/ PROTEÍNA QUINASA A.....	81
4.1.3.4. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR KARS EN LA SINAPSIS SC-CA2 REQUIERE LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS G.....	83
4.1.3.5. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO EN LA SINAPSIS SC-CA2 NO REQUIERE CANALES DE TIPO L PERMEABLES AL CALCIO NI LIBERACIÓN DE CALCIO DE RESERVORIOS INTRACELULARES.....	84
4.1.3.6. LOS KARS QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUK1 ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO OBSERVADA EN LA SINAPSIS SC-CA2.....	86
4.2. LOS ASTROCITOS Y LA ADENOSINA MEDIAN CAMBIOS EN LA SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL EN LAS SINAPSIS SC-CA1 DE HIPOCAMPO.....	88
4.2.1. EXISTEN CAMBIOS EN LA PLASTICIDAD. t-LTD A t-LTP EN LA SINAPSIS SC-CA1 DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL.....	88
4.2.2. LA t-LTP ES DE EXPRESIÓN PRESINÁPTICA.....	91
4.2.3. EL CAMBIO DE t-LTD A t-LTP OCURRE DENTRO DE UN INTERVALO TEMPORAL ESPECÍFICO ENTRE EL EEPSP Y EL POTENCIAL DE ACCIÓN (PA) POSTSINÁPTICO.....	93
4.2.4. LA t-LTP PRESINÁPTICA NO REQUIERE RECEPTORES DE NMDA.....	95
4.2.5. LA t-LTP PRESINÁPTICA REQUIERE DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO.....	96
4.2.6. LA t-LTP PRESINÁPTICA NO REQUIERE DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO SITUADOS EN LAS CÉLULAS POSTSINÁPTICAS .....	97

4.2.7.	LA t-LTP PRESINÁPTICA NO REQUIERE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO SITUADOS EN LOS ASTROCITOS .....	97
4.2.8.	LA t-LTP OBTENIDA APLICANDO UN PROTOCOLO PRE-POST DEPENDE DE RECEPTORES POSTSINÁPTICOS DE NMDA .....	99
4.2.9.	LA t-LTP REQUIERE DE CALCIO POSTSINÁPTICO .....	101
4.2.10.	LA t-LTP PRESINÁPTICA NO REQUIERE ENDOCANNABINOIDES NI RECEPTORES CB <sub>1</sub> 103	
4.2.11.	LA t-LTP REQUIERE ÓXIDO NÍTRICO PROVENIENTE DE LA CÉLULA POSTSINÁPTICA 105	
4.2.12.	EL ÓXIDO NÍTRICO NO ES NECESARIO PARA INDUCIR t-LTD A P13-21.....	107
4.2.13.	LA INDUCCIÓN DE t-LTP REQUIERE DE ACTIVIDAD ASTROCITARIA .....	108
4.2.14.	LA INHIBICIÓN MEDIADA POR RECEPTORES GABAÉRGICOS NO ES NECESARIA PARA INDUCIR LA t-LTP .....	110
4.2.15.	LA t-LTP REQUIERE ADENOSINA Y GLUTAMATO PROVENIENTE DE LOS ASTROCITOS .....	112
4.2.16.	LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE ADENOSINA A <sub>1</sub> A P13-21 CONVIERTE LA t-LTD EN t-LTP 116	
4.2.17.	LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD EXCITADORA ESPONTÁNEA Y EVOCADA CON MADURACIÓN LA INVOLUCRA LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE ADENOSINA A <sub>1</sub> .....	119
4.2.18.	EL ÓXIDO NÍTRICO ES NECESARIO PARA LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR POR PARTE DEL ASTROCITO Y LA INDUCCIÓN DE LA t-LTP.....	121
4.2.19.	EL CAMBIO DE LTD A LTP QUE SE OBTIENE DURANTE LA MADURACIÓN ESTÁ PRESENTE APLICANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE PLASTICIDAD .....	123
4.2.20.	EL CAMBIO DE LTD A LTP ESTÁ PRESENTE <i>IN VIVO</i> .....	127
5.	DISCUSIÓN.....	129
5.1.	PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO DE RATÓN .....	129
5.1.1.	LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UN AUMENTO DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO DE RATÓN.....	129
5.1.1.1.	EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARS EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PUC) DE CEREBELO ES PRESINÁPTICO .....	130
5.1.1.2.	LA FACILITACIÓN DE TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRESINÁPTICOS EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) INVOLUCRAN LA RUTA ADENILATO CICLASA/ AMP CÍCLICO/ PROTEÍNA QUINASA A .....	131
5.1.1.3.	LA PROTEÍNA KINASA C Y LAS PROTEÍNAS G SE REQUIEREN EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTUACIÓN DE KARS EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) .....	131



5.1.1.4. LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO REQUIERE UN AUMENTO DE $Ca^{2+}$ EN EL CITOSOL EN SINAPSIS PF-PuC.....	132
5.1.1.5. LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO REQUIERE $Ca^{2+}$ -CALMODULINA EN LA SINAPSIS PF-PuC.....	133
5.1.2. LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE KAINATO PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PUC) DE CEREBELO DE RATÓN.....	133
5.1.2.1. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO POR 3 $\mu$ M KA PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA AMPLITUD EN LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EVOCADAS DE NMDA EN LAS SINAPSIS ENTRE FIBRAS PARALELAS Y CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DEL CEREBELO.....	134
5.1.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARS EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (FP-PuC) DE CEREBELO ES PRESINÁPTICO.....	134
5.1.2.3. LA INHIBICIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA MEDIADA POR KAR EN LA SINAPSIS PF-PUC DEPENDE DE LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE CAMP.....	135
5.1.2.4. LA DEPRESIÓN DE LA AMPLITUD EN LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EVOCADAS DE NMDA MEDIADA POR KAR REQUIERE PROTEÍNA G EN LAS SINAPSIS PF-PuC	135
5.1.2.5. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LAS SINAPSIS FP-CP NO ESTÁ MEDIADA POR KAR PERMEABLE AL CALCIO Y NO REQUIERE LA LIBERACIÓN DE CALCIO DE LAS RESERVAS INTRACELULARES.....	136
5.2. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) DEL HIPOCAMPO DE RATÓN.....	137
5.2.1. LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE KAINATO PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS COLATERALES SCHAFER Y LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) DEL HIPOCAMPO DE RATÓN.....	137
5.2.2. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARS EN LA DISMINUCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES SCHAFER Y LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) ES PRESINÁPTICO.....	138
5.2.3. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRESINÁPTICOS EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS COLATERALES SCHAFER Y LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) MEDIAN LA DEPRESIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA A TRAVÉS DE LA RUTA ADENILATO CICLASA/ AMP CÍCLICO/ PROTEÍNA QUINASA A.....	139
5.2.4. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR KARS EN LAS SINAPSIS SC-CA2 REQUIERE LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS G.....	139
5.2.5. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO EN LAS SINAPSIS SC-CA2 NO REQUIERE CANALES DE TIPO L PERMEABLES AL CALCIO NI LIBERACIÓN DE CALCIO DE LAS RESERVAS INTRACELULARES.....	140

5.2.6.	LOS KARS QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUK1 ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO OBSERVADA EN LAS SINAPSIS SC-CA2 .	140
5.3.	CAMBIOS EN LA PLASTICIDAD EN LA SINAPSIS SC-CA1 DURANTE EL DESARROLLO HIPOCAMPAL MEDIADOS POR LOS ASTROCITOS Y LA ADENOSINA.....	142
5.3.1.	OCURRE UN CAMBIO DE t-LTD A t-LTP LA SINAPSIS SC-CA1 DURANTE EL DESARROLLO .....	142
5.3.2.	LA t-LTP ES DE EXPRESIÓN PRESINÁPTICA .....	143
5.3.3.	EL CAMBIO DE t-LTD A t-LTP OCURRE DENTRO DE UN INTERVALO TEMPORAL ESPECÍFICO ENTRE EL EPSP Y EL POTENCIAL DE ACCIÓN (PA) POSTSINÁPTICO.....	143
5.3.4.	LA t-LTP PRESINÁPTICA REQUIERE DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO.....	144
5.3.5.	LA t-LTP OBTENIDA APLICANDO UN PROTOCOLO PRE-POST SÍ DEPENDE DE RECEPTORES POSTSINÁPTICOS DE NMDA .....	145
5.3.6.	LA t-LTP REQUIERE DE CALCIO POSTSINÁPTICO .....	145
5.3.7.	LA t-LTP REQUIERE ÓXIDO NÍTRICO PROVENIENTE DE LA CÉLULA POSTSINÁPTICA	145
5.3.8.	LA INDUCCIÓN DE t-LTP REQUIERE LA ACTIVIDAD ASTROCITARIA.....	146
5.3.9.	LA t-LTP REQUIERE ADENOSINA Y GLUTAMATO PROVENIENTE PROBABLEMENTE DE LOS ASTROCITOS.....	148
5.3.10.	EL ÓXIDO NÍTRICO ES NECESARIO PARA LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR POR PARTE DEL ASTROCITO Y LA INDUCCIÓN DE LA t-LTP.....	149
5.3.11.	EL CAMBIO DE LTD A LTP QUE SE OBTIENE DURANTE LA DURANTE LA MADURACIÓN ESTÁ PRESENTE APLICANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE PLASTICIDAD	149
5.3.12.	EL CAMBIO DE LTD A LTP ESTÁ PRESENTE <i>IN VIVO</i> .....	150
6.	CONCLUSIONES (Español).....	153
6.1.	CONCLUSIONS (English) .....	155
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	157
8.	ANEXOS.....	173



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. RECEPTORES DE GLUTAMATO.

Glutamato es el neurotransmisor excitador más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos. Este neurotransmisor participa en sinaptogénesis, en maduración neuronal y en transmisión sináptica; además de un déficit en la transmisión glutamatérgica podría derivar en alteraciones y enfermedades del SNC como epilepsia, isquemia cerebral, hipoglicemia, Alzheimer, Parkinson, Corea de Huntington o Esclerosis Lateral Amiotrófica (Meador-Woodruff y Healy, 2000; Lerma et al., 2001; Negrete-Díaz et al., 2022).

La transmisión glutamatérgica es fundamental para la plasticidad sináptica, participando en los procesos denominados potenciación de larga duración (LTP, long-term potentiation) y depresión de larga duración (LTD, long-term depression) que se consideran como los correlatos biológicos que podrían sustentar los procesos de aprendizaje, memoria, neurodesarrollo etc (Anwyl, 1999; Kandel et al., 2000; Citri y Malenka, 2008; Kreitzer y Malenka, 2008; Neves et al., 2008; Butz et al., 2009; Abraham et al., 2019; Josselyn y Tonegawa, 2020). Existen dos grandes familias de receptores, los cuales median las acciones fisiológicas producidas por glutamato cuando se activan:

### Receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs)

Se caracterizan por participar en la transmisión sináptica rápida del sistema nervioso, están compuestos por un conjunto de cuatro grandes proteínas (tetrámeros). Los receptores están integrados en la membrana celular formando un canal catiónico, que deja en el centro un poro por el que pueden pasar iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y en ocasiones  $\text{Ca}^{2+}$ ) a través de la célula, con diferente selectividad iónica según el tipo de receptor. Se clasifican en tres tipos, en función del agonista que los activa con mayor afinidad: receptores de tipo NMDA (ácido Nmetil-D-aspartico), de tipo AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores de tipo kainato (Gruber y Ametamey, 2017; Reiner y Levitz, 2018).

### Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs)

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) participan en la neurotransmisión sináptica lenta en el sistema nervioso central (SNC), se dividen en ocho tipos (mGluR 1-8) y están acoplados a proteínas G. Se clasifican en 3 grupos de receptores:

Grupo I: Constituido por receptores mGluR1 y mGluR5. Están acoplados de forma positiva a fosfolipasa C (PLC), la cual promueve la conversión de inositol difosfato (PIP2) a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). DAG activa una proteína quinasa C (PKC) que puede fosforilar receptores ionotrópicos de glutamato. IP3 tiene numerosos efectos intracelulares, incluyendo la estimulación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde almacenes intracelulares.

Grupo II: Constituido por los receptores mGluR2 y mGluR3. Están acoplados de forma negativa a la formación de AMPc mediada por adenilato ciclasa.

Grupo III: Constituido por los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Están acoplados de forma negativa a la formación de AMPc mediada por adenilato ciclasa.

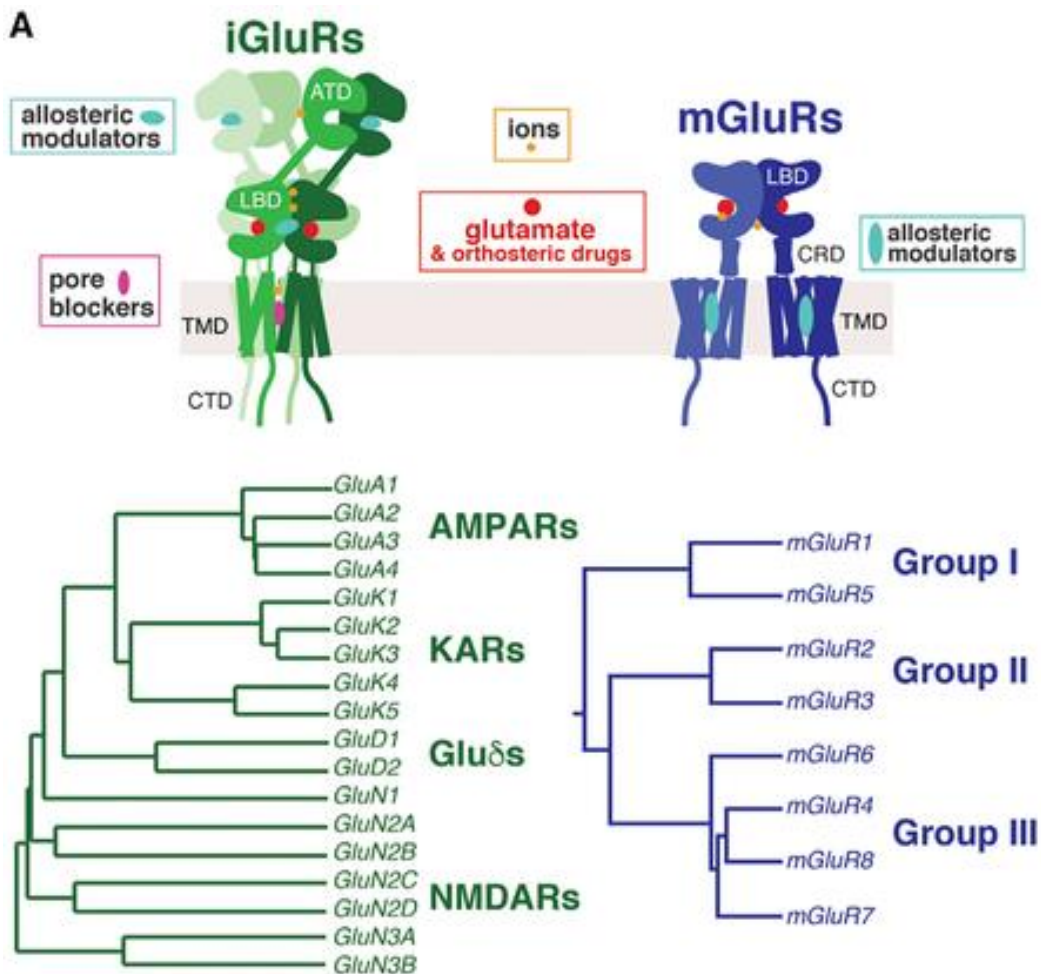


Figura 1: Clasificación de los tipos de receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos. Tomada Reiner y Levitz, 2018.

### 1.1.1. RECEPTORES DE TIPO NMDA

Los receptores de tipo NMDA (NMDAR) están formados por cuatro subunidades, dos GluN1 y dos que pueden ser GluN2A-D y/o GluN3A-B. Las diferentes combinaciones de dichas subunidades es lo que determina las propiedades funcionales de los receptores de tipo NMDA (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Yashiro y Philpot, 2008; Reiner y Levitz, 2018).

Los NMDAR poseen propiedades que los hacen únicos; cuentan con varios sitios de regulación alostérica, que son blancos de sustancias tanto endógenas como exógenas. Estos sitios de unión incluyen un sitio en la luz del canal para fenciclidinas (PCP), ketamina y para el bloqueante MK-801, y un sitio de unión al  $Zn^{2+}$ , que inhibe las

respuestas producidas por el agonista de forma independiente del voltaje (Westbrook y Mayer, 1987). Además, las poliaminas espermina y espermidina potencian las respuestas de estos receptores, que también son sensibles a altas concentraciones extracelulares de  $H^+$  (Traynelis y Cull-Candi, 1990) y a estados de oxidación y reducción (Aizenman et al., 1989; Paoletti et al., 2013; Park et al., 2014).

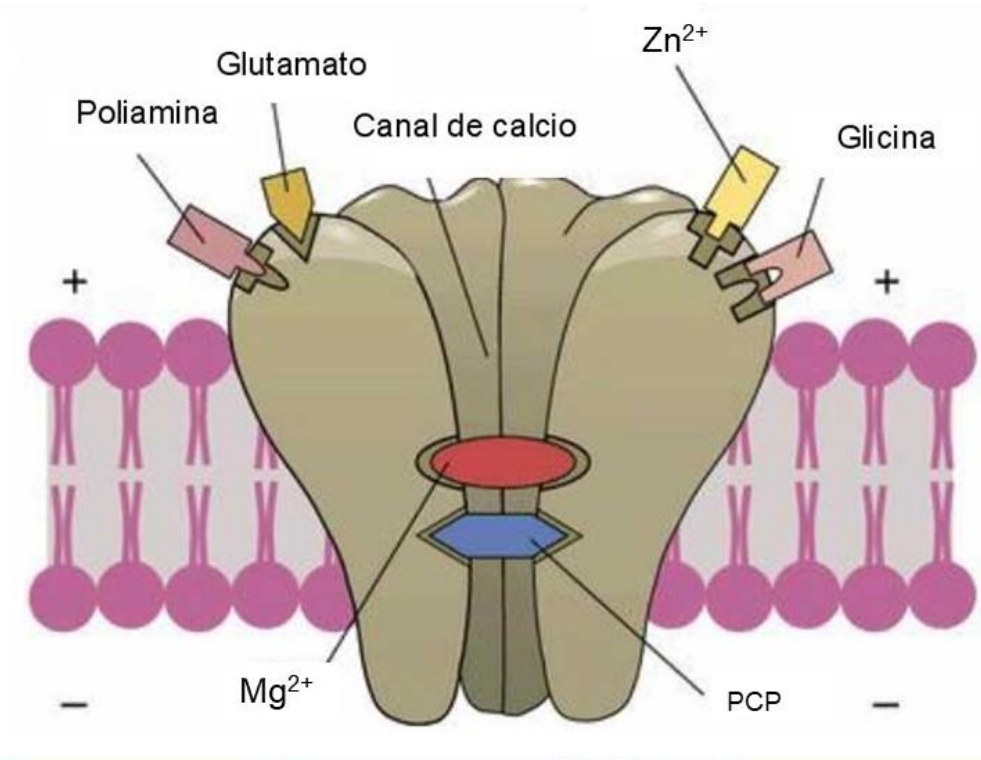


Figura 2: Figura esquemática del receptor ionotrópico de tipo NMDA. Muestra los sitios de unión del ligando, del co-agonista glicina y de reguladores alostéricos. Tomado de Tanovic y Alfaro., 2006

La activación de receptores de tipo NMDA puede modificar al alza o a la baja la actividad y el tráfico intracelular de otros receptores como los de tipo AMPA, y así, se producen cambios de larga duración en las sinapsis que pueden ser potenciadores (potenciación a largo plazo o LTP) o depresores (depresión a largo plazo o LTD) de dichas sinapsis y que podrían estar relacionados con determinados procesos de memoria y aprendizaje (Fei, 2013; Sanderson et al., 2016)

## 1.1.2. RECEPTORES DE TIPO AMPA

Los receptores de tipo AMPA en el SNC son tetrámeros compuestos por cuatro subunidades denominadas GluA1-4 que presentan una homología entre ellas del 68 al 75%. Cada una de estas subunidades presenta dos variantes, denominadas “flip” o “flop”, generadas por procesamiento alternativo de los mRNA. La composición de subunidades varía dependiendo de la región del cerebro, tanto las propiedades funcionales de los AMPAR como su tráfico, dependen de las subunidades que los integran (Dingledine et al., 1999; Collingridge et al., 2004).

Los AMPAR median la transmisión sináptica rápida en el SNC. El receptor fue inicialmente identificado como el "receptor de quisqualato" por Watkins y colaboradores (Honore T et al., 1982), tras identificar al quisqualato como su agonista natural, siendo más tarde denominado "receptor AMPA" tras haber sido desarrollado su agonista selectivo por Tage Honore y colegas en la Real Escuela Danesa de Farmacia en Copenhague. (Honore T et al., 1982; Greger y Watson, 2017).

Un determinante molecular importante para las propiedades de canal de los AMPARs es el aminoácido situado en la posición 586 (sitio Q/R). En tres de las cuatro subunidades de los AMPARs (GluR1, 3 y 4) esta posición está ocupada por una glutamina (Q) y los canales formados por cualquiera de estas subunidades presentan una característica: dejan pasar más corriente en sentido entrante que en sentido saliente y son significativamente permeables a  $Ca^{2+}$  (Hollman et al., 1991). AMPARs se distribuyen por todo el cerebro, existiendo cambios de expresión según la etapa del desarrollo y el tipo de subunidad. La subunidad GluR2 es fenotípicamente dominante, determinando el comportamiento del canal. Por ejemplo, en el cerebro adulto, la subunidad GluA2 está sometida a edición del mRNA de modo que el codón de glutamina (Q) para el residuo 607, puede ser reemplazado por la arginina (R), (Jonas et al., 1995; Kask et al., 1998; Greger y Watson, 2017). Este cambio hace que estos receptores presenten rectificación saliente y que no permeen  $Ca^{2+}$ . Por lo tanto, la forma editada de GluA2 controla ciertas propiedades de los receptores, como la permeabilidad a  $Ca^{2+}$ , la conductancia del canal, la cinética y la afinidad del receptor para glutamato, y el ensamblaje de la subunidad al receptor funcional.



Los AMPARs se encuentran altamente expresados en diferentes regiones cerebrales. Además de participar en la transmisión rápida de la información sináptica, estos receptores también han sido involucrados de manera importante en algunas formas de plasticidad sináptica. En condiciones patológicas, una excesiva entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos receptores contribuye a la muerte neuronal.

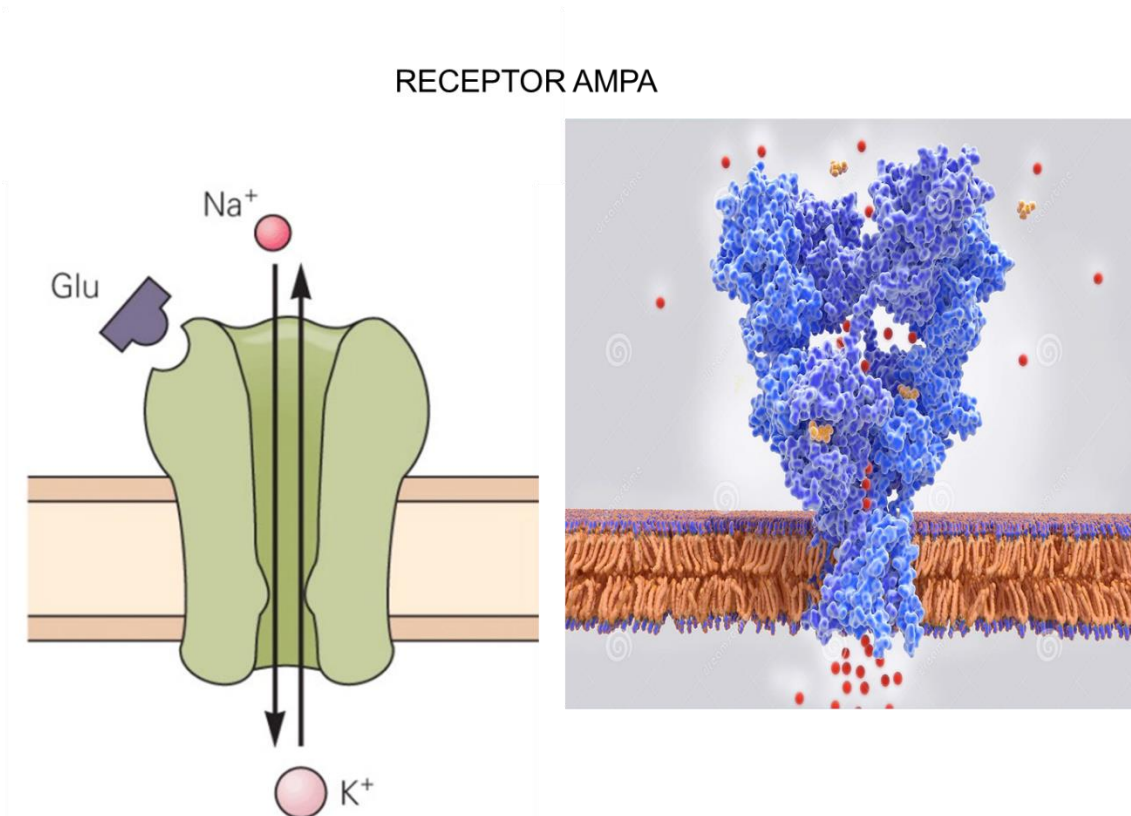


Figura 3: Figura esquemática del receptor ionotrópico de tipo AMPA mostrando el sitio de unión del glutamato al receptor (Derecha), y una representación 3D del receptor (Izquierda). Tomado de Tanovic y Alfaro., 2006.

### 1.1.3. RECEPTORES DE TIPO KAINATO

Los receptores de tipo kainato (KARs) fueron originalmente propuestos por Watkins y Evans (1981). La despolarización selectiva de fibras aisladas de la raíz dorsal del nervio espinal en ratas, causada por kainato (KA), llevó a proponer un receptor único para este compuesto, que podría ser distinto de los sitios de unión activados por los agonistas NMDA y AMPA (Agrawal y Evans, 1986). Trabajos posteriores confirmaron la existencia de tres subtipos diferentes de receptores (Hollmann y Heinemann, 1994; Dingledine et al, 1999), aunque también se ha reconocido que algunas sustancias

excitadoras, incluyendo KA y AMPA, no son completamente selectivos para un solo tipo de receptor; de modo que kainato activa también receptores AMPA y produce corrientes sostenidas duraderas (Kiskin et al., 1986; Patneau y Mayer, 1991), y AMPA puede activar algunos tipos de receptores de KA (Herb et al., 1992).

Los KARs, junto con los AMPARs y NMDARs, comprenden la familia de receptores ionotrópicos de glutamato. Además, existe evidencia considerable de que los KAR tienen acciones metabotrópicas/no canónicas (Rodríguez-Moreno y Lerma, 1998; Negrete-Díaz et al., 2018). Dado que también se han descrito acciones metabotrópicas para AMPAR, y recientemente para los NMDAR (Rin et al., 1998; Bouvier et al., 2018), la distinción entre la señalización mediada por receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos es cada vez más difusa. Los KAR están compuestos específicamente por subunidades GluK1-GluK5. En los sistemas de expresión, GluK1, GluK2 y GluK3 pueden formar receptores homoméricos, mientras que GluK4 y GluK5 forman receptores heteroméricos junto con las subunidades GluK1–3. Los KAR nativos están ampliamente distribuidos en el cerebro (Bahn et al., 1994)

Las acciones de kainato están mediadas en gran medida por la activación de KARs en los que KA es un agonista de alta afinidad. KA es una potente neurotoxina derivada del alga *Digenea simplex*. La palabra “Kainic” se deriva del japonés “Kaininso” (“Makuri”), que significa “el fantasma del mar”.

Con altas densidades de KARs localizados en el hipocampo, estos contienen subunidades GluK1 se expresan principalmente en las interneuronas, donde la reducción de la liberación de GABA da como resultado una mayor excitabilidad de las neuronas glutamatérgicas principales (Nadler, 1981; Clarke et al, 1997; Rodríguez-Moreno et al, 1997, 2000; Rodríguez-Moreno y Lerma, 1998; Rodríguez-Moreno y Sihra, 2007;Valbuena y Lerma, 2021), o potenciar la inhibición aumentando la liberación de GABA (Cossart et al, 1998; Frerking et al, 1998; Jiang et al., 2001; Negrete-Díaz et al., 2018). Los KAR que contienen la subunidad GluK2 se encuentran principalmente en las neuronas excitadoras, donde modulan la liberación de glutamato presinápticamente (Chittajallu et al, 1996; Vignes et al, 1998; Contractor et al, 2000, 2001, 2003, Kamiya y Ozawa, 2000; Schmitz et al, 2000, 2001; Lauri et al, 2001; Rodríguez-Moreno y Sihra, 2004, 2013; Negrete-Díaz et al., 2006, 2007, 2012, Pinheiro et al, 2007; Scott et al, 2008; Fernandes et al, 2009; Lyon et al, 2011; Andrade-Talavera et al, 2012, 2013; Sihra y Rodríguez-Moreno, 2013; Negrete-Díaz et al., 2018), y postsinápticamente, sustentan

parte del componente sináptico de transmisión excitadora (Castillo et al., 1997; Vignes et al., 1997; Bureau et al., 2000).

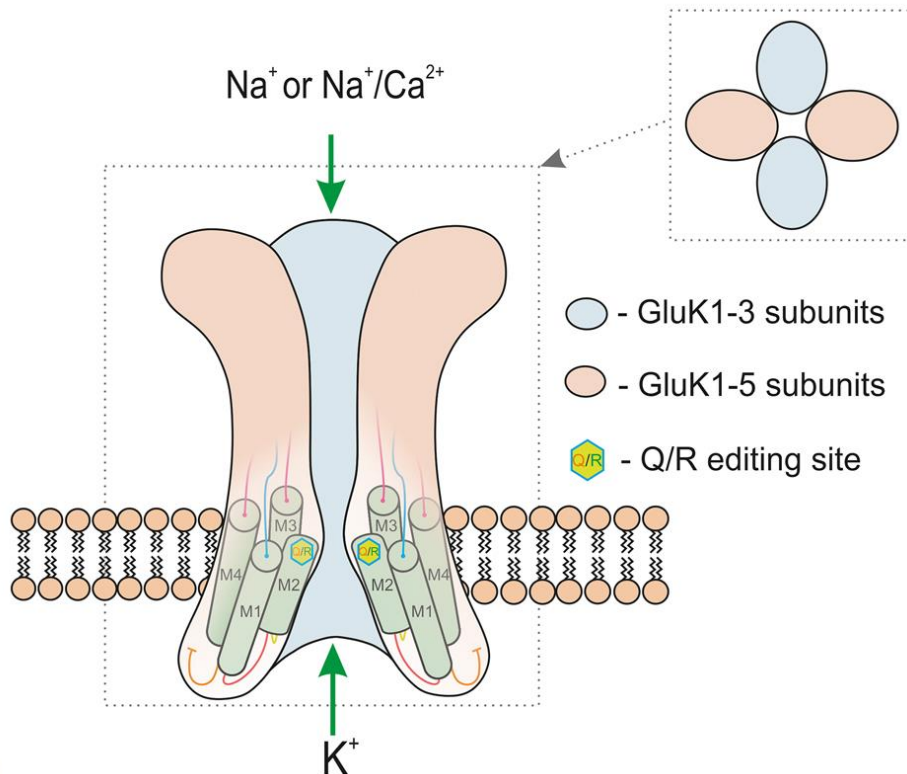


Figura 4: Figura esquemática del receptor ionotrópico de tipo Kainato, mostrando la disposición de las subunidades (GluK1-5) que forman un tetrámero y su posible combinación. Tomado de Sergei and Kosenko, 2021.

## 1.2. EL CEREBELO

El cerebelo, o cerebellum (cerebro pequeño en latín) es una estructura presente en el SNC de todos los vertebrados. Esta estructura se ubica en la parte posterior del cráneo, de forma que se encuentra situado en la línea media de la región dorsal del tallo y encima del techo del cuarto ventrículo (García et al, 2009). El Cerebelo se divide en dos hemisferios cerebelosos, así como dos flóculos situados bilateralmente con una parte central, denominada Vermis.

Esta estructura es la única que puede recibir información todas las regiones del SNC prácticamente en su totalidad, incluyendo la médula espinal, con una densidad neuronal mayor que el resto de las regiones cerebrales (Manto y Bastian, 2007). El cerebelo es una estructura que ejerce una función fundamental en procesos de control motor, de coordinación muscular final, de equilibrio y de aprendizaje a nivel motor

(Schmahmann et al., 2019). Así mismo, cada vez existen más evidencias de que el cerebelo participa en numerosos procesos cognitivos y de aprendizaje (Bellebaumet al., 2012; Habas, 2021; De Zeeuw et al., 2021).

### 1.2.1.CITOARQUITECTURA DEL CEREBELO

La citoarquitectura de la corteza del cerebelo forma parte de las estructuras del Sistema Nervioso que se conocen en más profundidad. Inicialmente, su organización neuronal fue descrita por Santiago Ramón y Cajal utilizando la tinción de Golgi (técnica de tinción desarrollada por Camilo Golgi en 1873 y mejorada por Cajal), alcanzando un mayor nivel de detalle posteriormente mediante el uso de técnicas más modernas de microscopía (García et al., 2009; De Zeeuw et al., 2021).

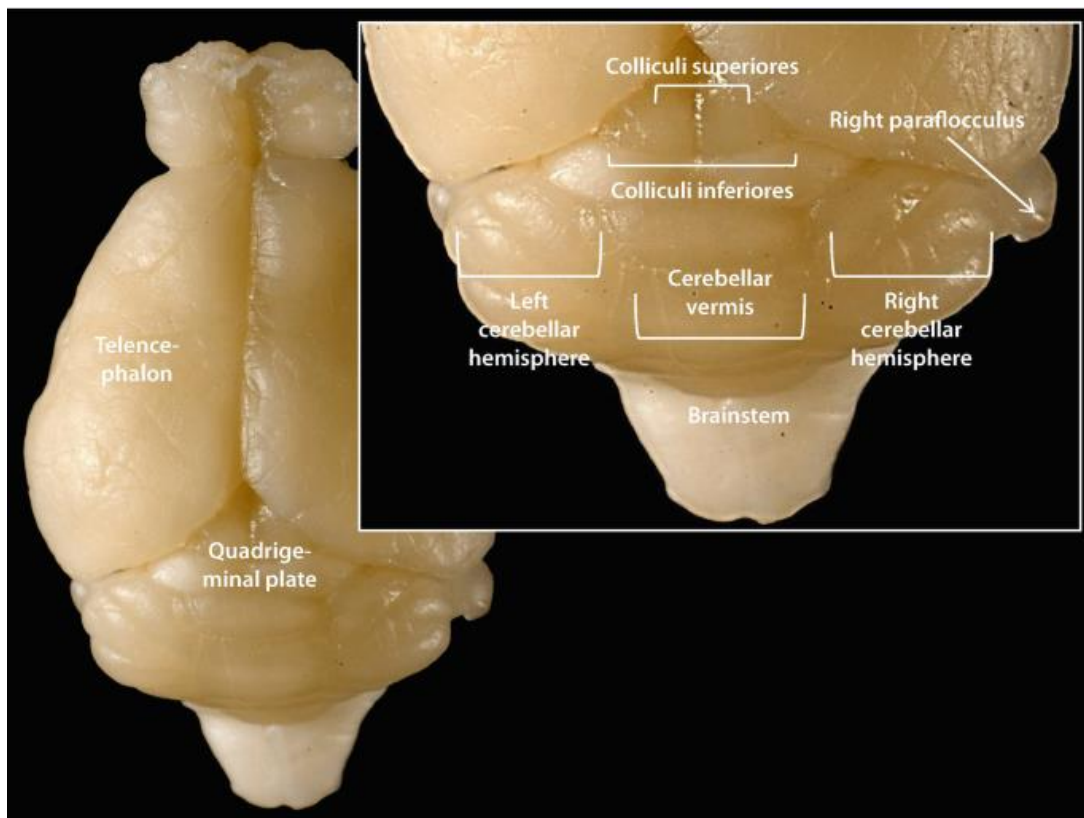


Figura 5: Anatomía del cerebelo. Cerebelo de ratón que muestra las distintas partes anatómicas que lo componen. Tomada De Apps, 2015.

Así, en el cerebelo de mamíferos y aves se puede observar, en primer lugar, la presencia de un gran número de fisuras paralelas y transversales que van de un extremo

a otro, surgiendo de esta manera las folias cerebelosas (Dubbeldam, 1998). Si se realiza un corte sagital del cerebelo, se puede apreciar lo que se conoce como “arbor vitae” (Haines, y Dietrichs, 2011), que se trata de una ramificación típica en forma de árbol que surge debido a que la corteza cerebelar rodea a la sustancia blanca, que se introduce dentro de cada una de las folias, dando lugar a esta característica forma.

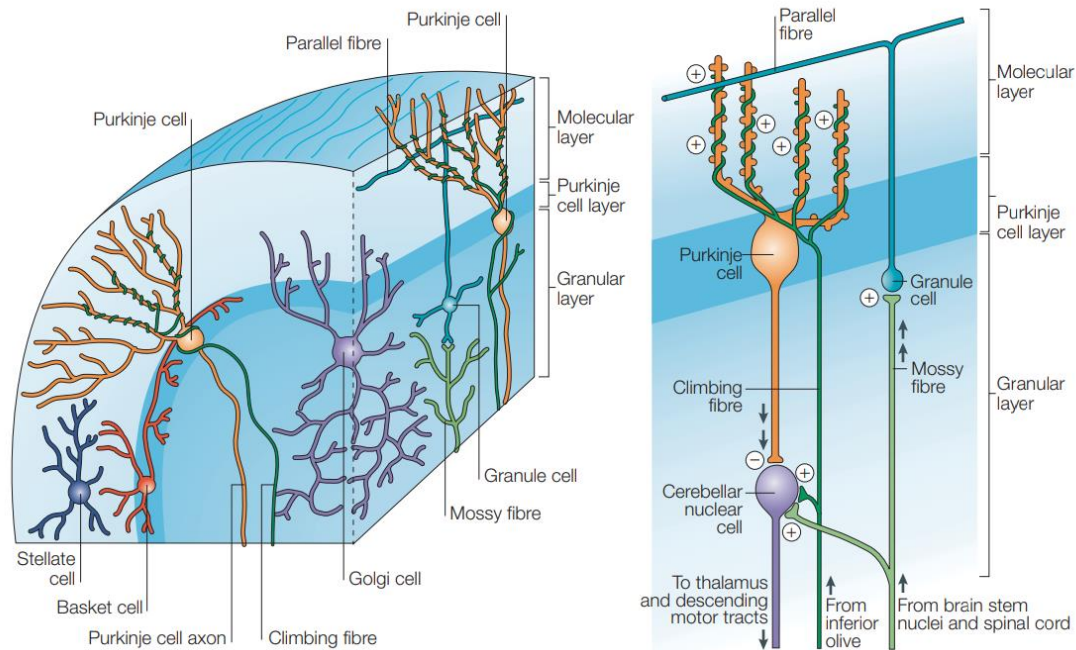


Figura 6: Estructura ortogonal del cerebelo. se puede observar que el árbol dendrítico de las células de Purkinje, las células estrelladas y las células en cesto se extienden en el eje translobular, mientras que las fibras paralelas se sitúan alineadas de forma paralela en el plano parlobular. Las Sinapsis establecidas entre las distintas capas del cerebelo donde se aprecia la sinapsis entre las fibras paralelas proveniente de las células granulares y las células de Purkinje, mientras que estas últimas reciben a su vez aferencias de las fibras trepadoras o enredadera. Tomada de De Apps, 2005

En cuanto a la corteza del cerebelo, se divide de forma clara en tres capas: la capa molecular, que es la más externa y que contiene de forma mayoritaria axones de las células granulares (conocidas como fibras paralelas); la capa de las células de Purkinje, que es la capa intermedia, es donde se encuentran las dendritas de dichas células, así como las células en cesto y estrelladas en menor medida; y la capa granular, que es la más interna y que contiene en su mayoría células granulares, y en menor cantidad células de Golgi, y otras células (Voogd y Glickstein, 1998). Así mismo, la corteza cerebelar recibe información aferente de, por una parte, las fibras musgosas, que provienen de diversos núcleos (como pontinos, espinales, vestibulares, etc..) así como de áreas



auditivas y visuales, y transmiten potenciales de acción de alta frecuencia, produciendo en las células de Purkinje, a través de las fibras paralelas, frecuencias de disparo de entre 50 y 100 Hz (De Zeeuw et al., 2021).

Por otra parte, recibe información de las fibras trepadoras, que provienen del bulbo raquídeo, concretamente de la oliva inferior. Estas fibras conectan con las células de Purkinje a través de su árbol dendrítico, transmitiendo potenciales de acción de baja frecuencia, en torno a 1 Hz (Brodal, 1992). Por tanto, las células de Purkinje son las grandes receptoras de información de las fibras musgosas por medio de las fibras paralelas (hasta 175.000 contactos sinápticos), y de las fibras trepadoras (con 300 contactos aproximados solo de una fibra). Además de ser receptoras de información de las fibras musgosas y las fibras trepadoras, las células de Purkinje actúan inhibiendo los núcleos profundos del cerebelo, así como los núcleos vestibulares (Ito, 2001). La sustancia blanca, situada debajo de la corteza, contiene tres núcleos cerebelares profundos: El núcleo medial (o fastigiado), el intermedio (o interpósito) y el lateral (o dentado) (Brodal, 2004; De Zeeuw et al., 2021).

El núcleo medial obtiene información de la vermis, y la proyecta hacia núcleos vestibulares y la formación reticular, por lo que actúa directamente sobre las neuronas motoras situadas en la médula espinal, influyendo en la regulación de componentes motores gruesos, como el tono, la postura y los reflejos dependientes de la médula espinal (García et al., 2009). Así mismo, el núcleo intermedio recibe información de la zona intermedia del cerebelo, proyectando hacia el núcleo rojo situado contra lateralmente, influyendo directamente sobre las motoneuronas flexoras de la médula espinal, implicadas en la ejecución de la motricidad fina (López-Antúnez, 2000; Bostan et al., 2018). En cuanto al núcleo lateral, este recibe información de los hemisferios cerebrales, y proyecta a la corteza premotora y corteza motora a través del núcleo ventrolateral del tálamo contralateral, ejerciendo influencia en la activación de órdenes motoras activadas por la corteza cerebral (Kandel et al., 2001).

La corteza cerebelosa, como ya se ha mencionado, se encuentra dividida en tres capas: capa molecular, capa intermedia o de las células de Purkinje y la capa granular.

## 1.2.2. CAPA MOLECULAR

La capa más superficial de todas es la capa molecular. En esta capa, tiene una densidad baja de cuerpos celulares, estando los somas celulares ampliamente distribuidos, con una gran la presencia de axones y dendritas (Haines, y Dietrichs, 2011). En esta capa están presente las células estrelladas y las células en cesto, situadas de manera que las estrelladas se encuentran de forma más superficial que las células en cesto, que se sitúan en la región más profunda, cerca de los somas de las células de Purkinje. Esta disposición se debe a que las células estrelladas y en cesto integran inputs procedentes del córtex, enviándolos directamente a las células de Purkinje (Haines, y Dietrichs, 2011; Habas, 2021). Así mismo, esta capa se ve alcanzada por las arborizaciones de las dendritas de las células de Purkinje (en el plano ortogonal al eje longitudinal). Estos árboles dendríticos se extienden ampliamente en el plano sagital, siendo reducido en el eje transversal. (De Zeeuw et al., 1997). Concretamente, células estrelladas y células en cesto despliegan sus axones en el plano sagital, sin embargo, las células estrelladas realizan sinapsis con las dendritas más alejadas de las células de Purkinje, a diferencia de las células en cesto, que se extienden de forma lateral por encima de los somas de las células de Purkinje, ramificándose sobre estos, formando unos “cestos” que los rodean casi al completo (López-Antúnez, 2000; Bostan et al., 2018). En esta capa se encuentran las fibras paralelas, que se extienden en el mismo plano de la folia. Estas fibras son los axones de las células granulares, que se extienden de forma ramificada.

Se pueden localizar los somas de las células granulares en la capa granular, cuyos axones suben de manera perpendicular a la superficie del cerebelo, ramificándose en la capa molecular en las dos direcciones al eje longitudinal de la folia. De este modo, cada una de las fibras paralelas se prolonga de forma perpendicular entre los huecos dejados por los árboles dendríticos de las células de Purkinje, haciendo un gran número de sinapsis en su recorrido. Mientras esto ocurre, cada célula de Purkinje recibe una enorme cantidad de sinapsis procedentes de miles de fibras paralelas (Kandel et al., 2001; Habas, 2021;).

En la capa molecular también se pueden observar las fibras trepadoras, que terminan en esta capa a través de las ramificaciones que muestran las dendritas de las células de Purkinje, realizando cientos de contactos sinápticos con estas a su paso,

además de llevar a cabo sinapsis colaterales a las células de Golgi, en cesto y las estrelladas.

En referencia a las células cuyos somas se encuentran en la capa molecular, se sitúan en la parte más inferior de la capa molecular donde se encuentran las células en cesto, cuyos árboles dendríticos se encuentran dispuestos de manera aplanada y según el eje más pequeño de la folia, por lo que se expanden de manera perpendicular a la disposición de las fibras paralelas con las que hacen sinapsis. Dichas células poseen un axón muy alargado que se prolonga de forma paralela a la superficie de la folia según el eje más pequeño de esta. Las células en cesto destacan por las ramificaciones colaterales que surgen de sus axones de forma descendente, así como por la disposición de estos envolviendo al soma de las células de Purkinje, como si fuera un cesto, de ahí su nombre. Por otra parte, en la parte más superior de la capa molecular se sitúan las células estrelladas. Estas células, al igual que las células en cesto, aunque más pequeñas, muestran axones y árboles dendríticos que se expanden a lo largo del eje más pequeño de la folia, y sus axones terminan en la propia capa molecular, haciendo sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje. Así mismo, sus árboles dendríticos reciben aferencias excitadoras procedentes de las fibras paralelas de las células granulares (Habas, 2021).

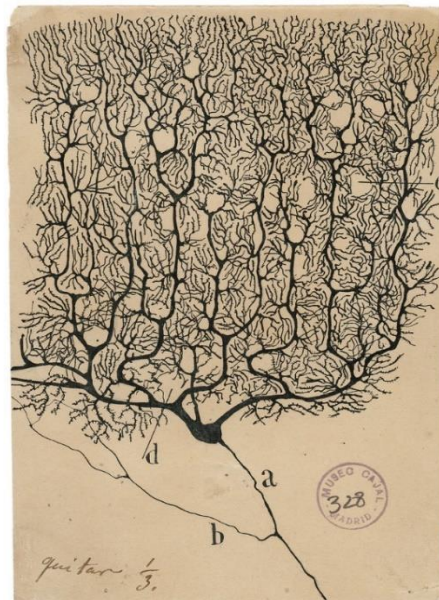


Figura 7: Dibujo de la morfología de una célula de Purkinje. La imagen muestra un dibujo de Santiago Ramón y Cajal, premio Nobel español de Fisiología y Medicina. El dibujo muestra el soma de la célula de Purkinje y su densa arborización dendrítica que caracteriza a este tipo de células.



### 1.2.3. CAPA DE LAS CÉLULAS DE PURKINJE

Justo debajo de la capa molecular se encuentran situados en línea los grandes y ovalados somas de las células de Purkinje (entre 50 y 80  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Kandel et al., 2001; García et al., 2009), dispuestos totalmente en fila. Las dendritas de estas células se ramifican y se insertan profundamente en la capa molecular, mostrando un enorme árbol dendrítico que, al contrario de lo que ocurre con muchas otras neuronas, se extiende en un solo plano casi en su totalidad, coincidiendo con el eje más pequeño de la folia cerebelosa. A medida que se van ramificando las ramas de las dendritas, van mostrando más espinas dendríticas, de manera que las ramas terciarias están totalmente recubiertas. Este detalle muestra la enorme cantidad de sinapsis que puede realizar una sola célula de Purkinje, principalmente con las fibras paralelas procedentes de las células granulares (de Solages et al., 2008).

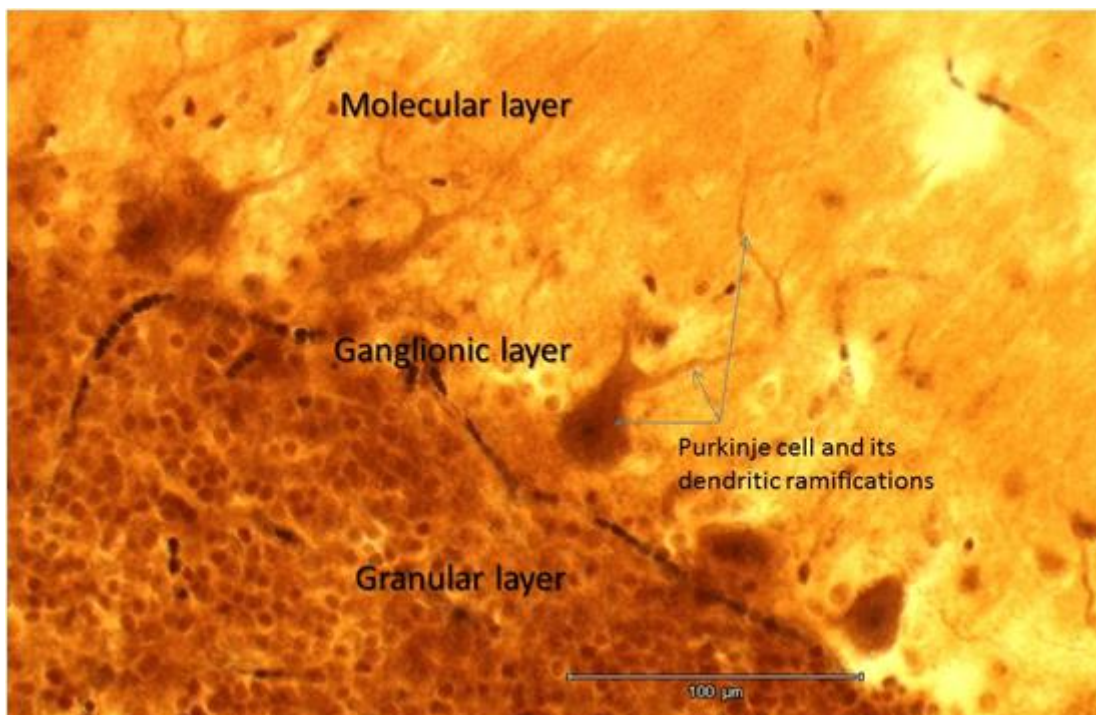


Figura 8: Célula de Purkinje. La imagen muestra una célula de Purkinje al microscopio y su disposición en la capa de células de Purkinje, situada entre la capa molecular y la capa granular. Tomada de Ana Calderon et al 2008.

La única información eferente proveniente de la corteza del cerebelo se realiza a través del axón de las células de Purkinje, que una vez que nace del soma de la célula, atraviesa la capa granular y recorre la sustancia blanca en dirección a los núcleos

profundos del cerebelo (Kandel et al, 2014; De Zeeuw et al., 2021). Estas sinapsis son características propias de los axones de casi todas las células de Purkinje, excepto para las que están situadas en el lóbulo floculonodular (concretamente, en el vestíbulo-cerebelo). Las células de Purkinje situadas en esta zona llevan a cabo sinapsis con los núcleos vestibulares localizados en el tronco encefálico, por lo que salen del cerebelo sin hacer sinapsis con los núcleos profundos (De Zeeuw et al., 1997). Los axones de estas células son originalmente amielínicos, pero una vez que han atravesado la sustancia blanca, se recubren de una capa de mielina (De Zeeuw et al., 2021)

#### **1.2.4. CAPA GRANULAR**

Justo debajo de la capa de las células de Purkinje se encuentra la capa granular, siendo la capa más profunda de la corteza cerebelar. En ella se encuentran las células granulares, junto con los grandes somas de las células de Golgi (de Solages et al., 2008). Las células granulares se caracterizan por ser de muy pequeño tamaño, con un soma bastante redondeado del que surgen entre tres y cinco dendritas cortas que terminan en forma de garra. Estas dendritas establecen sinapsis con las terminaciones de las fibras musgosas, así como con los axones de las células de Golgi, formando una estructura donde se realizan sinapsis múltiples conocida como glomérulos (Rodríguez et al., 2000).

En cuanto a los axones de estas células, ascienden atravesando la capa granular y la capa de las células de Purkinje, hasta llegar a la capa molecular, donde se dividen en dos, formando un ángulo recto con respecto al axón del que proceden. De esta manera, estas dos divisiones se sitúan de forma paralela al eje mayor de la folia, por lo que son conocidas como fibras paralelas. Dichas fibras paralelas atraviesan de forma perpendicular las enormes ramificaciones de las dendritas de las células de Purkinje, que se expanden por el plano corto de la folia cerebelosa. Es por ello que, debido al largo recorrido que realizan, las fibras paralelas establecen un gran número sinapsis excitadoras con las células de Purkinje, de manera que, aunque una fibra paralela solo establece un solo contacto con una sola célula de Purkinje, cada célula de Purkinje puede estar recibiendo información a su vez de un enorme número de fibras paralelas (Voogd y Glickstein, 1998; De Zeeuw et al., 2021).

Además de realizar sinapsis con las células de Purkinje, las fibras musgosas y las células de Golgi, las células granulares también ejercen contactos sinápticos con los árboles dendríticos de las células estrelladas y las células en cesta. En cuanto a las células de Golgi (cuyos somas se localizan en las zonas más cercanas a los somas de las células de Purkinje), se caracterizan por mostrar ramificaciones tanto de las dendritas como de los axones en todas las direcciones, al contrario de lo que ocurre con el resto de células situadas en el cerebelo (Brodal, 1992).

En cuanto al axón, este se ramifica de manera intensa cerca del propio soma celular y extendiéndose por la capa granular también intensamente. Sus terminales axónicos ejercen contactos sinápticos en los glomérulos (inhibiendo), así como con las dendritas de las células granulares y las terminaciones de las fibras musgosas (Ito, 2001; D'Angelo, 2018).

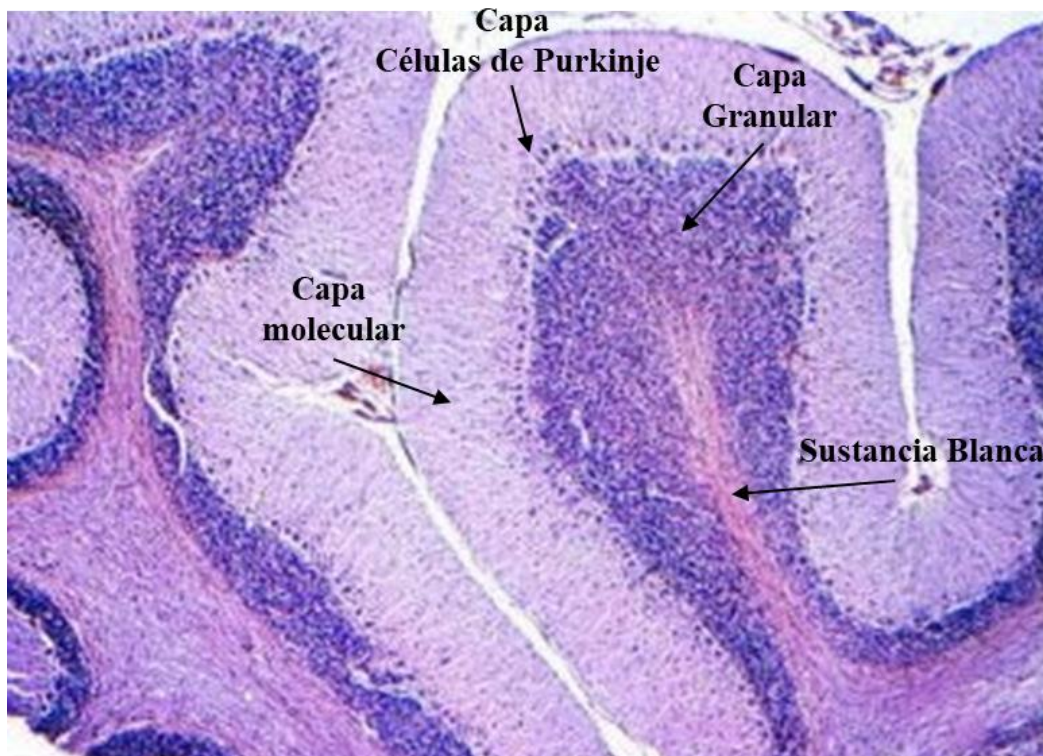


Figura 9: Corte sagital de cerebelo de rata teñido con la técnica de Nissl. Se puede apreciar la ramificación típica en forma de árbol formada por la unión de la sustancia gris y la sustancia blanca. Se distinguen las hendiduras cerebelosas en la superficie, donde se pueden identificar las diferentes capas que caracterizan esta estructura, la capa molecular, la capa de células de Purkinje y la capa granular. Tomado de Ana Calderon et al 2008.

## **1.2.5. RECEPTORES DE KAINATO EN EL CEREBELO**

Los receptores de kainato (KAR) se expresan en la corteza del cerebelo (Pemberton et al., 1998; Smith et al., 1999; Spiliopoulos et al., 2009). El cerebelo participa en la modulación del movimiento modificando los patrones de actividad de las neuronas motoras. Estructuralmente el cerebelo está compuesto por la corteza cerebelosa y los núcleos cerebelosos profundos y presenta cinco tipos de células: las células de Purkinje, las células estrelladas, las células en cesta, las células de Golgi y las células granulares. Las células de Purkinje están alineadas una frente a la otra y sus árboles dendríticos forman dos capas bidimensionales a través de las cuales pasan las fibras paralelas de las células granulares ubicadas en la capa granular. Estas fibras paralelas establecen sinapsis excitadoras entre las células granulares y las espinas de las dendritas de las células de Purkinje, así como las fibras trepadoras (originadas en el núcleo de la oliva inferior) con las dendritas cercanas y el soma celular. Las fibras paralelas pasan ortogonalmente a través del árbol dendrítico de la neurona de Purkinje; Hasta 200,000 fibras paralelas forman una sinapsis con una sola célula de Purkinje. Cada célula de Purkinje recibe hasta 500 sinapsis por parte de las fibras paralelas, todas originadas a partir de una sola fibra. Tanto las células en cesta como las células estrelladas proporcionan una entrada inhibitoria (GABAérgica) a las células de Purkinje, con células en la sinapsis en cesta hasta el segmento inicial del axón de la célula de Purkinje, y con las células estrelladas a las dendritas (Tyrrel y Willshaw, 1992; Wadiche y Jahr, 2001; D'Angelo, 2018).

Los KAR presinápticos participan en la plasticidad del cerebelo, de manera que en las sinapsis de las fibras paralelas con las células de Purkinje median una forma de LTD que se ve afectada por la activación pareada con las fibras trepadoras (Crépel, 2009). De estos dos tipos de fibras (fibras paralelas y fibras trepadoras) solo las fibras paralelas muestran KAR presinápticos (Crépel, 2009), de manera similar a otras regiones cerebrales como las cortezas somatosensoriales y visuales en las que las fibras que contienen y no contienen receptores de glutamato ionotrópicos presinápticos se sincronizan en la misma célula postsináptica e inducen LTD (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Banerjee et al., 2009; Rodríguez-Moreno, Banerjee y Paulsen, 2010; Rodríguez-Moreno et al., 2011; Buchanan et al., 2012; Rodríguez-Moreno et al., 2013; Banerjee et al., 2014). El papel exacto y el mecanismo de acción de los KAR que median la LTD en el cerebelo aún no se conoce bien y se necesita una mayor investigación. El

desarrollo adecuado del cerebelo depende de una secuencia coordinada precisa de eventos postnatales, algunos de los cuales están mediados por los receptores de glutamato. Por ejemplo, los receptores de NMDA se han implicado en la migración de células granulares (Komuro y Rakic, 1993) así como en la poda sináptica de fibras trepadoras (Rabacchi et al, 1992; De Zeeuw et al., 2021).

Aunque recientemente se ha demostrado que los KAR están involucrados en la transmisión sináptica, poco se sabe sobre su papel en el desarrollo. Sin embargo, la expresión de subunidades del receptor de glutamato de tipo kainato en células granulares inmaduras de la capa germinal externa del cerebelo en desarrollo sugiere que los KAR también pueden tener un papel en la maduración neuronal. A lo largo del proceso de maduración del cerebelo, la cantidad, la composición y la función de los KAR varían.

Inicialmente, las células granulares del cerebelo tienen una cantidad mínima de AMPAR en el período postnatal en comparación con los KAR, que son predominantes en células granulares inmaduras. Diferentes estudios han demostrado que los KAR compuestos por las subunidades GluK1, GluK2 y GluK5 predominan, y durante el período de desarrollo se observa un aumento en el número de KAR y una vez que se alcanza la etapa adulta, el número de KAR que contienen subunidades GluK1 sufre una reducción en su expresión en la capa granular, mientras que GluK2 y GluK5 permanecen constantes, en contraste con los AMPAR que aumentan su número, constituyendo una mayoría muy notable en comparación con los KAR. Todos estos hallazgos sugieren que los KAR tienen un papel importante en el proceso de desarrollo del cerebelo. Algunas indicaciones sugieren que los KAR que contienen GluK1 participan en el desarrollo del cerebelo al comienzo de la diferenciación de las células granulares. Además, los KARs se han visto involucrados en algunas alteraciones cerebrales en el cerebelo y existe una relación directa entre la inyección de KA y la ataxia cerebelosa. Por lo tanto, el cerebelo es un objetivo importante para estudiar las funciones de los KAR y su posible papel en el origen de la ataxia (Yamaguchi et al., 1984; Maiti et al., 1986; De Vera et al., 2002; Andoh et al., 2008; D'Angelo, 2018).

En pacientes con esquizofrenia, se observa un aumento en los KAR que contienen subunidades GluR6 y K2, lo que mediaría una reducción en la transmisión GABAérgica (Harrison et al; 1990; Bullock et al., 2008). En la neurodegeneración, los KAR pueden tener un papel en la calcificación del tejido cerebral, ya que se ha encontrado que la aplicación local de KA en algunas áreas del cerebelo produce cambios en diferentes



niveles de iones, aumentando los niveles de  $Ca^{2+}$  durante más de 8 semanas, lo que media la calcificación. (Korf y Postema, 1984). Así mismo, se ha observado que los KAR producen aumentos en el calcio intracelular (Korf y Postema, 1984; Savidge et al., 1997) y parece indicar que este aumento del calcio intracelular no pone a la célula en riesgo debido a la excitotoxicidad, gracias a su baja conductancia en contraste con los AMPAR.

Debido a la falta de conocimiento sobre el tema, es necesario realizar más exploraciones para determinar el papel de los KAR en el desarrollo del cerebelo y las alteraciones del cerebelo. Se sabe que los KAR se expresan en la corteza del cerebelo en los axones de las células granulares que forman fibras paralelas y que hacen sinapsis excitadoras con las células de Purkinje (Smith, Wang y Howe., 1999). Así mismo, se han reportado las transcripciones del ARN mensajero que codifican para diferentes subunidades KAR y la expresión funcional de los subtipos KAR (Bettler et al., 1990; Herb et al., 1992; Bahn et al., 1994; Petralia et al., 1994). Los estudios biofísicos con registros de un solo canal han demostrado la actividad de GluK1 (Swanson et al., 1996), lo que sugiere que estos KAR son permeables al  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, las acciones moduladoras de los KAR en el cerebelo y los mecanismos intracelulares involucrados son mayoritariamente desconocidos.

### 1.3. EL HIPOCAMPO

El hipocampo forma parte de un grupo de estructuras cerebrales que se conoce con el nombre de formación hipocámpal, a la que pertenecen, además del hipocampo, el giro dentado, el subículo, presubículo y parasubículo (Andersen et al, 2007).

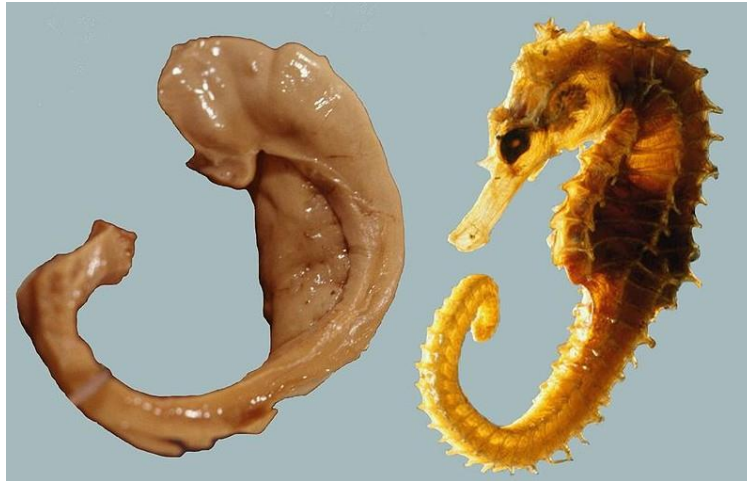


Figura 10: Imagen de Hipocampo. Se muestra la comparativa y parecido entre el hipocampo y fórnix con el caballito de mar. Finger, 2001.

El hipocampo y las estructuras asociadas han atraído la atención de numerosos científicos provenientes de varias de las disciplinas que componen la neurociencia. Tanto es así, que muchos estudios se han centrado en las neuronas con forma piramidal tan características que podemos encontrar en el mismo. Gracias a estos estudios, hoy se conoce mucho acerca del desarrollo, sinaptogénesis, neurotransmisores, receptores y canales iónicos asociados, y la biología celular de estas neuronas. También se conoce una parte de por qué y cuándo se activan estas neuronas en un cerebro vivo. Registros obtenidos de animales vivos en movimiento, por ejemplo mientras exploran un espacio que les resulta familiar, han mostrado que células piramidales individuales del hipocampo disparan en localizaciones concretas de ese espacio (Andersen et al, 2007). Esto planteó nuevas posibilidades para desarrollar herramientas comportamentales para estudiar el mecanismo de la memoria en animales. A lo largo de las extensas arborizaciones dendríticas que se pueden encontrar en las neuronas piramidales que conforman el hipocampo, pueden distinguirse cientos de espinas dendríticas donde parece residir la mayoría de las sinapsis excitadoras. Es más, la eficiencia con la que estas sinapsis excitadoras transmiten los mensajes, puede variar en función de la actividad

neuronal. Poco a poco se va conociendo más acerca de la plasticidad sináptica en el hipocampo y los mecanismos bioquímicos subyacentes, y todo apunta a que la plasticidad sináptica es la clave en el mecanismo de la memoria, así como en otros procesos.

Otra característica que atrae la atención de los investigadores hacia la formación hipocampal es el hecho de que las células granulares del giro dentado se multiplican a lo largo de su vida. Esto hace que el giro dentado sea un área potencialmente importante para estudiar neurogénesis incluso en adultos, así como procesos de reparación neuronal.

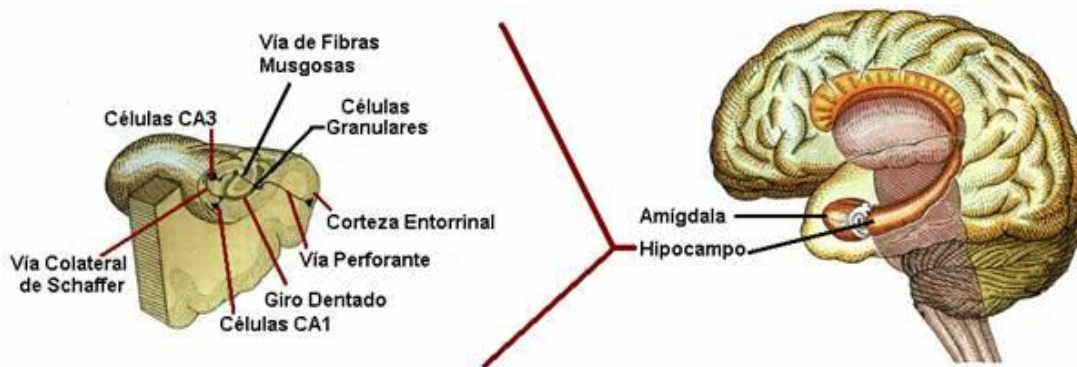


Figura 11: El Hipocampo. El hipocampo está localizado en la parte medial del lóbulo temporal del cerebro. Esquema más detallado de la localización del hipocampo y los distintos tipos de estructuras que podemos encontrar en él. Tomado de Henry G., 2000.

Por lo tanto, una característica que hace enfocar hacia el hipocampo numerosos trabajos de investigación es el papel específico que parece tener en los procesos de memoria y plasticidad. Hoy en día está comprobado que existen muchos tipos de memoria y que el hipocampo participa en algunas de ellas, en concreto en las que consisten en recordar información que se puede describir de una forma declarativa (Andersen et al., 2007). Además, la peculiar anatomía de esta estructura, con las células principales localizadas en capas y las entradas sinápticas definidas en una capa dendrítica, ofrece numerosas ventajas, como por ejemplo, una fácil colocación de electrodos para poder hacer registros tanto de campo como de células individuales. Las rodajas de hipocampo pueden sobrevivir durante horas, y presentan una estratificación estricta de las sinapsis en el árbol dendrítico, lo que no ocurre en otras zonas del cerebro.

Gracias a estudios realizados en el hipocampo fue posible describir por primera vez el principio básico de transmisión excitadora unidireccional y descubrir el fenómeno de potenciación de larga duración (LTP; long-term potentiation) (Bliss y Lomo, 1973).



El trabajo realizado en hipocampo ha sido la mayor contribución a conocer el funcionamiento de varios tipos de sinapsis y receptores para diversos aminoácidos excitadores e inhibidores, mecanismos de recaptación de neurotransmisores, plasticidad sináptica dependiente de actividad y las consecuencias de la excitotoxicidad en las células del cerebro.

El hipocampo está involucrado en numerosos desórdenes neurológicos como epilepsia, enfermedad de Alzheimer y enfermedades cerebrovasculares. De esta forma, la actividad eléctrica propia de pacientes de epilepsia puede detectarse fácilmente en el hipocampo. O, por ejemplo, los cambios patológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer se manifiestan inicialmente en la corteza entorrinal, y de aquí los cambios se van extendiendo al hipocampo y finalmente a toda la corteza cerebral.

### **1.3.1. NEUROANATOMÍA DEL HIPOCAMPO.**

El hipocampo se encuentra organizado en capas de células con una disposición laminar por la que se distribuye toda la información que procesa, siendo la entrada de información unidireccional (Amaral y Lavenex, 2007). No existe un consenso global acerca de la nomenclatura utilizada para describir las distintas partes que se pueden diferenciar en el hipocampo, a pesar de las múltiples investigaciones que se han ocupado de él. Pero se suelen admitir tres subdivisiones: CA3, CA2 y CA1 -CA deriva de Cornu Ammonis- que se repiten en ratas, monos y humanos de forma similar, aunque con diferencias en cuanto, por ejemplo, al espesor de las capas celulares o al tamaño y número de las subdivisiones.

La entrada de información neocortical alcanza la formación hipocampal a través de la corteza entorrinal (EC). Las células de las capas superficiales de esta corteza entorrinal proyectan sus axones al giro dentado, entre otros destinos, formando parte de la principal entrada de información al hipocampo. Estos axones que contactan con el giro dentado forman lo que se denomina vía perforante.

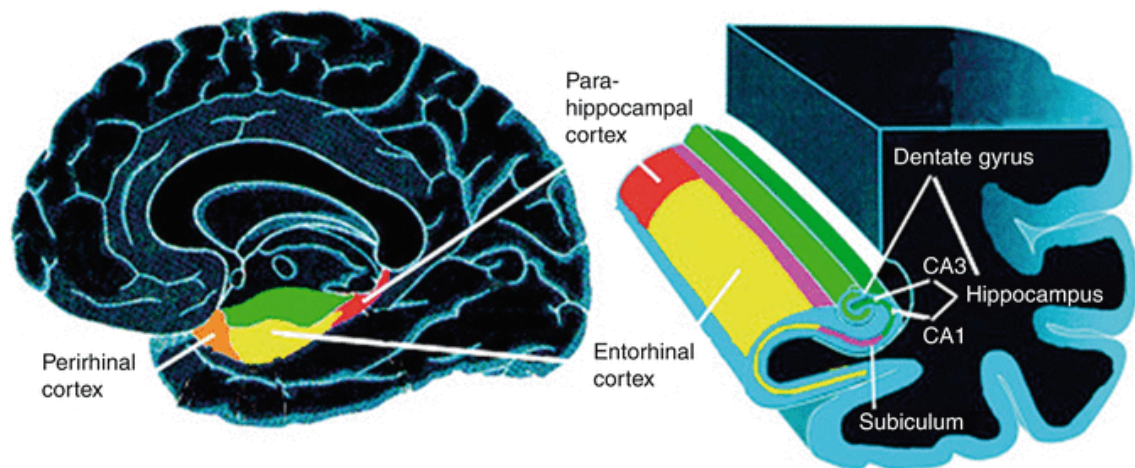


Figura 12: El hipocampo. El hipocampo está localizado en la parte medial del lóbulo temporal del cerebro, se observa la disposición del circuito trisináptico en un corte sagital. En esta vista lateral del cerebro. Tomado de humano Tracey et al, 2013.

Las principales células del giro dentado (DG), las células granulares, proyectan sus axones, las fibras musgosas, hacia la región de CA3, conectando con las células piramidales de CA3, que son, a su vez, la fuente de entrada a la región CA1 (los axones de CA3 que proyectan a CA1 se denominan colaterales de Schaffer). Las células de la región CA1 proyectan al subículo, proporcionando la mayor salida de información excitadora del hipocampo. A partir de aquí el patrón de conexiones intrínsecas empieza a ser un poco más elaborado, de tal forma que las células de CA1 proyectan no sólo al subículo sino también a la corteza entorrinal. El subículo también proyecta al presubículo y el parasubículo (Amaral y Lavenex, 2007). En cuanto al circuito trisináptico excitador del hipocampo se podría decir que está constituido, en este orden, por las sinapsis EC-DG (sinapsis 1), DG-CA3 (sinapsis 2) y CA3-CA1 (sinapsis 3).

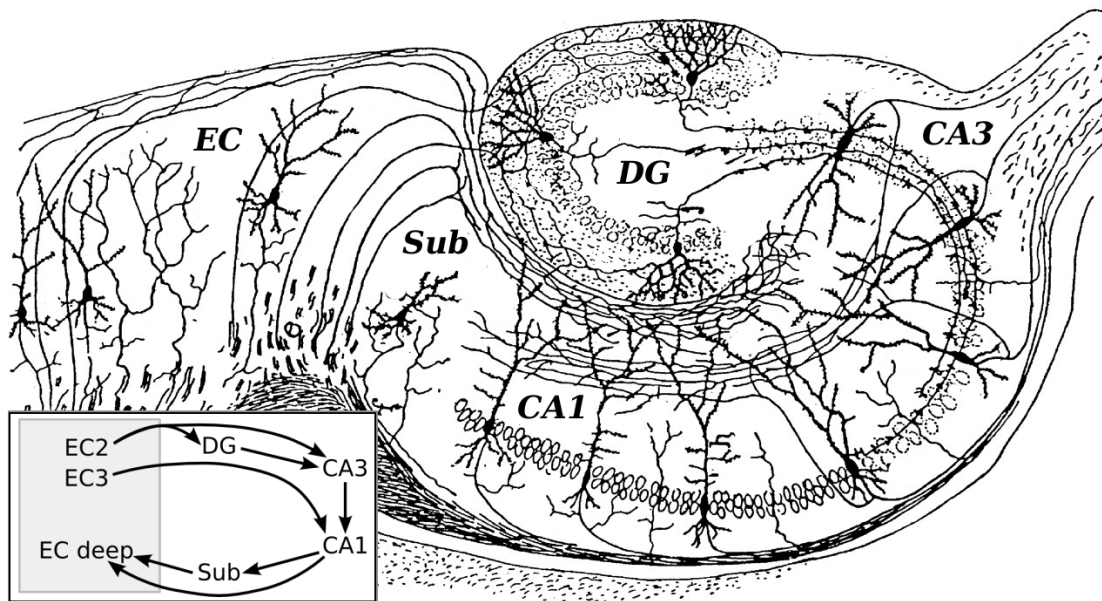


Figura 13: Circuito básico del hipocampo, según un dibujo de Santiago Ramón y Cajal. Siglas: DG: dentate gyrus (circunvolución dentada). Sub: subiculum. EC: corteza entorrinal. Conexiones en la formación hipocampal.

### 1.3.2. FUNCIONES DEL HIPOCAMPO

El hipocampo y las estructuras asociadas han atraído la atención de numerosos científicos provenientes de varias de las disciplinas que componen la neurociencia. Tanto es así, que muchos estudios se han centrado en las neuronas con forma piramidal tan características que podemos encontrar en el mismo. Gracias a estos estudios, hoy se conoce mucho acerca del desarrollo, sinaptogénesis, neurotransmisores, receptores y canales iónicos asociados, y la biología celular de estas neuronas. También se conoce una parte de por qué y cuándo se activan estas neuronas en un cerebro vivo. Registros obtenidos de animales vivos en movimiento, por ejemplo, mientras exploran un espacio que les resulta familiar, han mostrado que células piramidales individuales del hipocampo disparan en localizaciones concretas de ese espacio (Andersen et al, 2007). Esto planteó nuevas posibilidades para desarrollar herramientas comportamentales para estudiar el mecanismo de la memoria en animales. A lo largo de las extensas arborizaciones dendríticas que se pueden encontrar en las neuronas piramidales que conforman el hipocampo, pueden distinguirse cientos de espinas dendríticas donde parece residir la mayoría de las sinapsis excitadoras. Es más, la eficiencia con la que estas sinapsis excitadoras transmiten los mensajes puede variar en función de la actividad

neuronal. Poco a poco se va conociendo más acerca de la plasticidad sináptica en el hipocampo y los mecanismos bioquímicos subyacentes, y todo apunta a que la plasticidad sináptica es la clave en el mecanismo de la memoria, así como en otros procesos.

Otra característica que atrae la atención de los investigadores hacia la formación hipocampal es el hecho de que las células granulares del giro dentado se multiplican a lo largo de su vida. Esto hace que el giro dentado sea un área potencialmente importante para estudiar neurogénesis incluso en adultos, así como procesos de reparación neuronal.

Por lo tanto, una característica que hace enfocar hacia el hipocampo numerosos trabajos de investigación es el papel específico que parece tener en los procesos de memoria y plasticidad. Hoy en día está comprobado que existen muchos tipos de memoria y que el hipocampo participa en algunas de ellas, en concreto en las que consisten en recordar información que se puede describir de una forma declarativa (Andersen et al., 2007). Además, la peculiar anatomía de esta estructura, con las células principales localizadas en capas y las entradas sinápticas definidas en una capa dendrítica, ofrece numerosas ventajas, por ejemplo, una fácil colocación de electrodos para poder hacer registros tanto de campo como de células individuales. Mediante el procedimiento de extracción y corte correcto se pueden obtener rodajas de cerebro vivas, las rodajas de hipocampo pueden sobrevivir durante horas, y presentan una estratificación estricta de las sinapsis en el árbol dendrítico, lo que no ocurre en otras zonas del cerebro. Gracias a estudios realizados en el hipocampo fue posible describir por primera vez el principio básico de transmisión excitadora unidireccional y descubrir el fenómeno de potenciación de larga duración (LTP; long-term potentiation) (Bliss y Lomo, 1973).

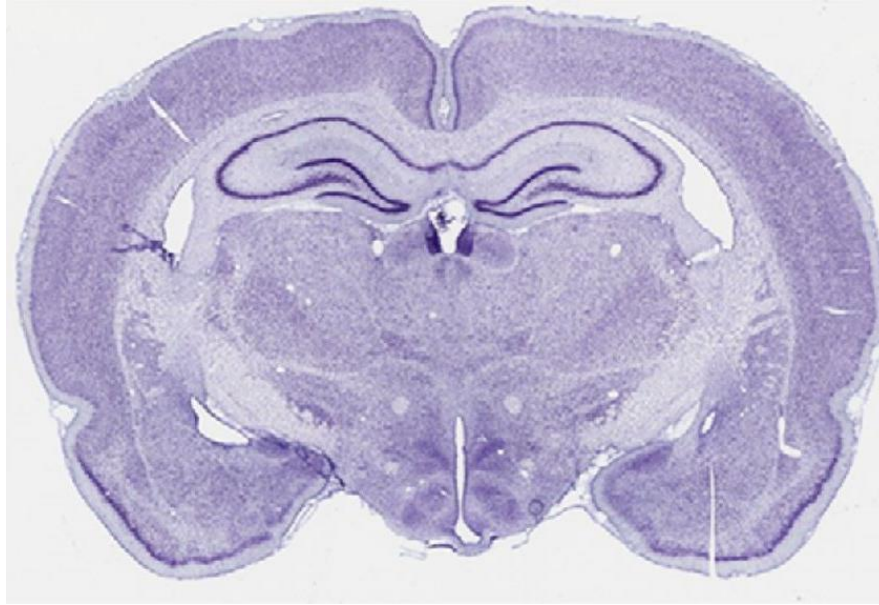


Figura 14: Imagen de una rodaja de cerebro cortado coronalmente donde se puede apreciar el hipocampo. Tomado de Rohan et al., 2013

El trabajo realizado en hipocampo ha sido la mayor contribución para conocer el funcionamiento de varios tipos de sinapsis y receptores para diversos aminoácidos excitadores e inhibidores, mecanismos de recaptación de neurotransmisores, plasticidad sináptica dependiente de actividad y las consecuencias de la excitotoxicidad en las células del cerebro. El hipocampo está involucrado en numerosos desórdenes neurológicos como epilepsia, enfermedad de Alzheimer y enfermedades cerebrovasculares. De esta forma, la actividad eléctrica propia de pacientes de epilepsia puede detectarse fácilmente en el hipocampo. O, por ejemplo, los cambios patológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer se manifiestan inicialmente en la corteza entorrinal, y de aquí los cambios se van extendiendo al hipocampo y finalmente a toda la corteza cerebral.

## 1.4. PLASTICIDAD SINÁPTICA

El término “plástico” se origina de la palabra latina “plasticus”, que en última instancia proviene del término griego “plastikós” o “plastos”, que originalmente significa “moldeado, formado”. Sin embargo, las raíces del concepto moderno de plasticidad en neurociencia aún están por establecerse por completo (Berlucchi, 2002; Stahnisch y

Nitsch, 2002; Jones, 2004; DeFelipe, 2006; Berlucchi y Buchtel, 2009; Markram et al., 2011; Rozo y Rodríguez-Moreno, 2015). Antes del siglo XIX, el cerebro fue contemplado principalmente por los filósofos (Markram et al., 2011) y, en consecuencia, no fue hasta finales del siglo XIX y principios del XX cuando se sentaron las bases de la neurociencia moderna.

En la última década de ese siglo, varios científicos hicieron contribuciones clave a nuestra comprensión moderna de la plasticidad sináptica, incluido el neuroanatomista español Santiago Ramón y Cajal, quien definió por primera vez a la neurona como la unidad anatómica, fisiológica, genética y metabólica del sistema nervioso en su Doctrina de la neurona (Ramón y Cajal, 1888/1904; Shepherd, 1991; Jones, 1994a).

En 1893, el neuropsiquiatra italiano Eugenio Tanzi propuso que mediante un aprendizaje o práctica específica, la actividad repetitiva en una vía neuronal podía producir hipertrofia, reforzando así las conexiones ya existentes (Berlucchi y Buchtel, 2009). El término “sinapsis” (anteriormente llamado “unión” por Cajal) fue acuñado por primera vez en 1897 por Foster y Sherrington en Cambridge, aunque a diferencia de Tanzi, no profundizaron en la posible relación entre la plasticidad sináptica y el aprendizaje (Berlucchi y Buchtel, 2009; Markram et al., 2011). Más tarde fue el discípulo de Tanzi Ernesto Lugaro quien sugirió la naturaleza química de la transmisión sináptica, y quien formuló el vínculo entre las teorías de Tanzi y las ideas de neurotropismo de Cajal en 1906 y 1909 (Berlucchi y Buchtel, 2009). Es importante señalar que tanto Tanzi como Lugaro se declararon partidarios de las ideas de Cajal (DeFelipe, 2006; Berlucchi y Buchtel, 2009; Rozo y Rodríguez-Moreno, 2015). Así, aunque no esté claro quién acuñó por primera vez el término plasticidad, el trabajo de Cajal indudablemente estimuló e influyó en las primeras teorías sobre sinapsis, transmisión y plasticidad sináptica.

Durante el siglo XX, la cuestión de cómo se almacena la información en el cerebro estimuló una enorme cantidad de trabajo que se centró en las propiedades de la transmisión sináptica. Con la publicación en 1949 de “La organización del comportamiento”, el psicólogo canadiense Donald Olding Hebb articuló una teoría sobre los posibles mecanismos neuronales del aprendizaje y la memoria (Hebb, 1949). En su libro, declaró los llamados “postulados de Hebb” que desde entonces han tenido una enorme influencia en los estudios de neurofisiología. En él se recoge el famoso postulado



de Hebb: “Cuando un axón de una célula A está lo suficientemente cercano de una célula B como para estimularla, y participa repetida o persistentemente en su disparo, ocurre algún proceso de crecimiento o cambio metabólico en una o en ambas células de modo tal que aumenten tanto la eficiencia de A como la capacidad de estimulación de la célula B”.

La plasticidad sináptica se puede definir como la capacidad de una sinapsis de cambiar su eficacia en la transmisión sináptica. Hay numerosos mecanismos subyacentes a la plasticidad sináptica como pueden ser tanto cambios en la liberación de neurotransmisor como cambios en la efectividad de las respuestas a la liberación. Tradicionalmente se ha considerado que la plasticidad sináptica podría ser la base celular del aprendizaje y memoria además de otros procesos (Götz and Hutter, 2005; Ming and Song, 2011). A lo largo del desarrollo se dan lo que serían ventanas de plasticidad, cambios plásticos dependientes de la actividad sensorial ocurren durante los períodos críticos y permisivos de plasticidad, y las influencias ambientales posteriormente dan forma a los circuitos cerebrales, reordenando y refinando las conexiones neuronales en los circuitos adultos definitivos. El cierre de tales ventanas permisivas está asociado con la pérdida de plasticidad en sinapsis particulares, produciendo efectos funcionales específicos (Ernst y Song, 2015).

La primera evidencia que relaciona la plasticidad de corta duración con las modificaciones del comportamiento provino de estudios en *Aplysia* (Kandel y Tauc, 1965). La facilitación de corta duración y la depresión sináptica que dura desde milisegundos hasta minutos pueden provocarse mediante diferentes protocolos, como la estimulación de pulsos emparejados o la estimulación repetitiva de alta frecuencia (Zucker y Regehr, 2002).

La plasticidad de corta duración se considera importante en las respuestas de corta duración a las entradas sensoriales, la modificación transitoria de los estados de comportamiento y la memoria de corta duración (Citri y Malenka, 2008).

Casi dos décadas después de que apareciera la teoría de Hebb, la evidencia experimental que respaldaba sus ideas llegó con el descubrimiento de la potenciación duradera en la circunvolución dentada del hipocampo del conejo llamada potenciación a de larga duración o LTP en 1973 ( Bliss y Lømo, 1973; Lømo, 2003).

Estos hallazgos se obtuvieron gracias a un desarrollo técnico clave que ocurrió en paralelo en el laboratorio de Paul Andersen: el uso de la preparación de rodajas vivas de cerebro (Skrede y Westgaard, 1971). De hecho, la investigación que utiliza la preparación de rodajas de hipocampo ha seguido mejorando nuestra comprensión de la plasticidad sináptica a lo largo de los años. Otra forma de plasticidad de larga duración, depresión de larga duración o LTD, se propuso por primera vez en 1977 (Lynch et al., 1977). Estos avances, junto con el desarrollo de registros intracelulares en rodajas de cerebro y en las técnicas de *Patch clamp*, condujeron a la identificación de diferentes formas de plasticidad a corto y largo plazo en distintas sinapsis en todo el cerebro. Por ejemplo, en los años 80 se demostró que los NMDAR estaban involucrados en la plasticidad sináptica (Herron et al., 1986; Collingridge et al., 1988) y se observó que los AMPAR postsinápticos son importantes durante la LTP (Kauer et al., 1988), hallazgos importantes en los esfuerzos por comprender la plasticidad sináptica.

En la última década del siglo XX, se demostró la importancia de la coincidencia temporal entre la actividad generada entre las neuronas presinápticas y postsinápticas en las conexiones monosinápticas (Markram et al., 1997, 2011), lo que representa un nuevo marco para estudiar la plasticidad. La elegancia y sencillez de este paradigma experimental, *Spike timing-dependent plasticity* (STDP), atrajo la atención de la comunidad neurocientífica. Sin embargo, estudios posteriores sobre las reglas que rigen la STDP en diferentes tipos de neuronas y sinapsis revelaron un panorama mucho más complejo (Markram et al., 2011). Además, en ese momento se sugirió otra forma de plasticidad sináptica persistente, llamada metaplasticidad (Abraham y Bear, 1996).

La metaplasticidad, también conocida como "la plasticidad de la plasticidad sináptica", es un fenómeno que involucra los cambios dependientes de la actividad en la función neuronal que modulan la plasticidad sináptica. El papel de la metaplasticidad aún no está claro, pero puede servir para mantener las sinapsis dentro de un rango dinámico de actividad, permitiendo que las sinapsis y las redes respondan a un entorno cambiante. A fines del siglo XX, se descubrió una nueva forma de plasticidad que opera en escalas de tiempo más largas, llamada plasticidad homeostática (Turrigiano et al., 1998; Turrigiano y Nelson, 2004). La plasticidad homeostática implica una serie de fenómenos que equilibran los cambios en la actividad neuronal para mantener la homeostasis en una amplia gama de escalas temporales y espaciales (Turrigiano, 2012). El ejemplo mejor estudiado de plasticidad homeostática se conoce como escalamiento sináptico



(Turrigiano et al., 1998), que permite a las neuronas detectar cambios en sus propias tasas de disparo a través de un conjunto de sensores dependientes del calcio que luego regulan el tráfico de receptores, aumentando o disminuyendo así el número de receptores de glutamato en los sitios sinápticos (Turrigiano, 2012).

Los procesos plásticos que tienen lugar en las sinapsis pueden ser divididos en función de la duración del propio evento plástico en: Plasticidad de corta duración o STP (por sus siglas en inglés Short-Term Plasticity) y en Plasticidad de larga duración.

### **1.4.1. PLASTICIDAD DE CORTA DURACIÓN**

El rango de acción de la STP abarca desde la potenciación a la depresión, y su escala temporal va desde los milisegundos hasta minutos. Uno de los tipos de plasticidad de corta duración más conocidos es la facilitación por pares de pulsos (PPF, por sus siglas en inglés paired-pulse facilitation), que se atribuye normalmente a los efectos del incremento del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) residual en el terminal presináptico, o a la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a diana moleculares presinápticas que pueden afectar a la probabilidad de liberación (Markram, 2011; Whitlock et al., 2014; Jackman and Regehr 2017). Por otro lado, también se encuentra una depresión por pares de pulsos (PPD, por sus siglas en inglés paired-pulse depression), la cual se atribuye normalmente al vaciado del conjunto de vesículas preparadas para la liberación (RRP o Readily Releasable Pool) (Jackman, and Regehr, 2017). Además, la depresión puede también surgir de la activación de receptores.

### **1.4.2. PLASTICIDAD DE LARGA DURACIÓN**

Las modificaciones de la eficacia sináptica de larga duración se proponen como sustrato neuronal de los procesos de memoria, aprendizaje y procesos de desarrollo, entre otros (Nabavi et al, 2014., Malinow, 1990.). La plasticidad de larga duración se ha utilizado de como base teórica para intentar explicar la formación de recuerdos y procesos de desarrollo (Malinow, 1990).

La plasticidad de larga duración puede expresarse pre y postsinápticamente y se han indicado tres hipótesis principales sobre la naturaleza de los cambios asociados con

la plasticidad, los cuales no son excluyentes entre sí: - Cambios en la probabilidad de liberación (Malinow, 1990). - Inserción o internalización de receptores de tipo AMPA en la membrana de la neurona postsináptica (Huganir y Nicoll., 2013). - Fosforilación y de-fosforilación de los receptores de tipo AMPA que dan lugar a cambios en la conductancia (Lee, et al, 2000). Se ha descrito un amplio rango de mecanismos de inducción de plasticidad que dependen del tipo de sinapsis, del paradigma experimental, e incluso, en la misma especie, de la edad o la temperatura. Sin embargo, algunos de los mecanismos de inducción más frecuentes dependen de la activación de receptores de glutamato de tipo NMDA.

### **1.4.3. SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY (STDP)**

El descubrimiento de la STDP a principios de este siglo generó interés en la influencia del tiempo y la frecuencia en los parámetros necesarios para inducir la plasticidad sináptica (Lisman y Spruston, 2005, 2010; Markram et al., 2011). La denominada *spike timing-dependent plasticity* (STDP) es una forma hebbiana de plasticidad sináptica de larga duración detectada en todas las especies examinadas hasta la fecha, desde insectos hasta humanos. Este proceso es un fuerte candidato para subyacer en la remodelación de circuitos durante el desarrollo, así como en el aprendizaje y la memoria subsiguientes. En la STDP, el orden y el tiempo relativo en milisegundos de los potenciales de acción presinápticos y postsinápticos determina la dirección y la magnitud de los cambios sinápticos. Así, de forma general, la *spike timing-dependent plasticity* LTP (t-LTP) se produce cuando a una espiga presináptica le sigue una pica postsináptica, mientras que la *spike timing-dependent LTD* (t-LTD) se induce cuando se invierte este orden (Ishizuka., 1990; Martinez-Galleto et al., 2022).

El gran interés por esta forma de plasticidad se debió en parte a que las formas tradicionales de plasticidad se provocan con protocolos basados en frecuencias de estimulación que a veces están lejos de ser fisiológicas y, por lo tanto, es poco probable que ocurran in vivo. Por otro lado, hay una evidencia cada vez mayor que muestra que STDP puede ser inducido por el apareamiento de un solo potencial de acción generado oportunamente en relación con el EPSP (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Andrade-

Talavera et al., 2016; Pérez-Rodríguez et al., 2019). De hecho, la mayoría de las reglas y propiedades de la STDP se han definido in vitro, pero STDP se detectó in vivo (Markram et al., 2011). Por lo tanto, un desafío futuro clave será determinar los mecanismos, reglas y roles de STDP in vivo (Schulz, 2010). En este sentido, será importante definir la influencia precisa de los neuromoduladores en STDP (Pawlak et al., 2010).

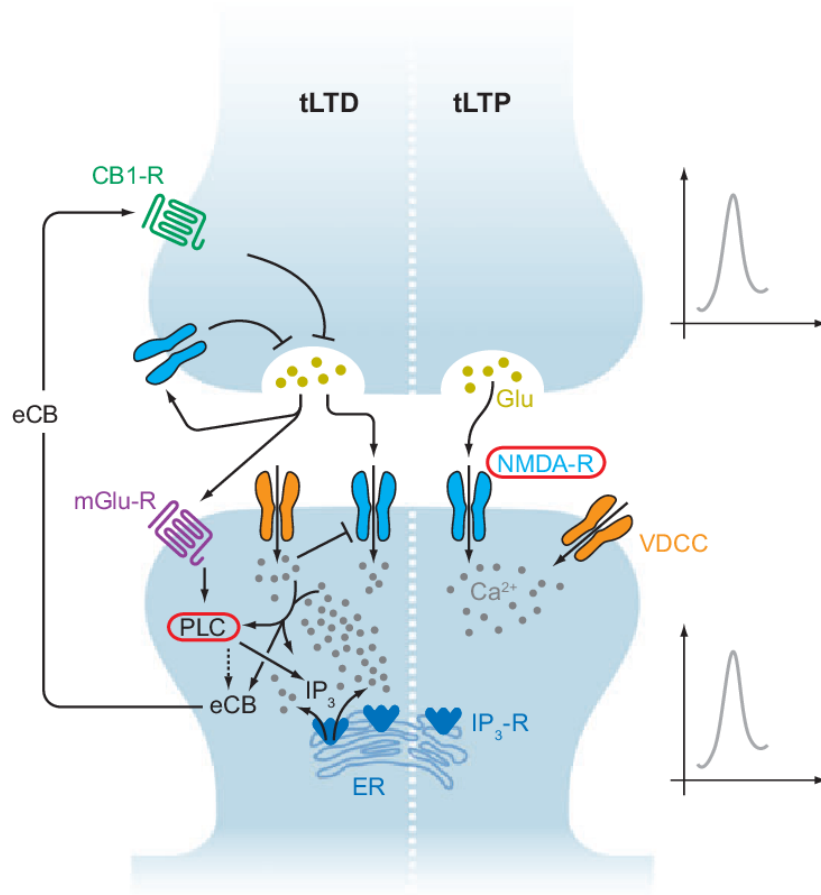


Figura 15: Representación esquemática de las vías de señalización involucradas en la inducción de STDP. En la inducción de t-LTP (derecha), los NMDAR actúan como detectores de coincidencia entre actividad presináptica y postsináptica. En la inducción de t-LTD (izquierda), el detector de coincidencias puede variar entre las sinapsis. El diagrama incluye varias vías que se han sugerido para desempeñar un papel en t-LTD. El óvalo rojo indica posibles detectores de coincidencia. La flecha indica activación/potenciación. La línea de extremos romos indica inhibición/supresión. Abreviaturas: eCB, endocannabinoides; RE, retículo endoplásmico; Glu, glutamato; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; PLC, fosfolipasa C; VDCC, canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje. Tomada de Coporale y Dan., 2008.

## **1.5. ASTROCITOS**

Los astrocitos son células localizadas en el sistema nervioso central (encéfalo y médula espinal). Forman, junto con los oligodendrocitos, células de Schwann y la microglía, el grupo de células gliales del sistema nervioso. Los astrocitos son el tipo de célula glial más abundante en los mamíferos.

### **1.5.1. MORFOLOGÍA Y TIPOS**

Los astrocitos contienen una proteína específica en su citoesqueleto denominada proteína glial fibrilar ácida (GFAP). El nombre de astrocito viene de la forma estrellada que tienen estos filamentos intermedios del citoesqueleto cuando se ponen de manifiesto en su citoplasma, aunque la forma celular real puede ser muy variable, dependiendo además de si se encuentran en la sustancia gris, denominados astrocitos protoplásmicos, o en la sustancia blanca, denominados astrocitos fibrosos (Ben Haim y Rowitch, 2017).

Los astrocitos protoplásmicos emiten muchas prolongaciones que se pueden ramificar varias veces. Los extremos de estas ramificaciones se denominan pies terminales, los cuales recubren vasos sanguíneos, superficie pial y a las sinapsis (un astrocito puede englobar varios miles de sinapsis). Los astrocitos fibrosos se encuentran en la sustancia blanca y tienen prolongaciones mucho más delgadas y casi sin ramificar. Los pies terminales de los astrocitos fibrosos envuelven a los nodos de Ranvier de los axones y a los vasos sanguíneos de los tractos de fibras donde se encuentran.

### **1.5.2. FUNCIÓN- SINAPSIS TRIPARTITA.**

Hace años se propuso el término “sinapsis tripartita” para conceptualizar la evidencia obtenida por muchos laboratorios durante la década de 1990 que revelaba la existencia de comunicación bidireccional entre neuronas y astrocitos. Representa un nuevo concepto en fisiología sináptica en el que, además del flujo de información entre las neuronas pre y postsinápticas, los astrocitos intercambian información con los elementos neuronales sinápticos, respondiendo a la actividad sináptica y regulando la transmisión sináptica. La biología de la interacción astrocito-neurona se ha convertido en un campo en rápida expansión y se ha convertido en uno de los temas más interesantes de la neurociencia actual que está cambiando nuestra visión de la fisiología del sistema

nervioso. El paradigma aceptado clásicamente de que la función cerebral resulta exclusivamente de la actividad neuronal está siendo desafiado por la evidencia acumulada que sugiere que la función cerebral en realidad podría surgir de la actividad concertada de una red de neuronas y glía.

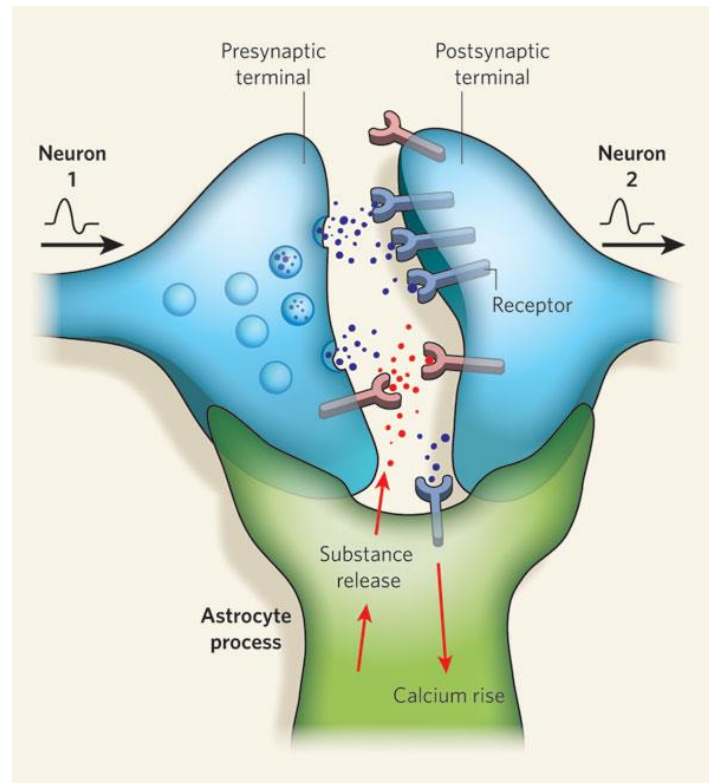


Figura 16: Esquema de sinapsis tripartita. La sinapsis tripartita se refiere a la integración funcional y la proximidad física de la membrana presináptica, la membrana postsináptica y su asociación con la glía circundante, así como las contribuciones combinadas de estos tres componentes sinápticos a la producción de actividad en la sinapsis. Tomada de Allen & Barres., 2009.

La capacidad de los astrocitos para modular la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica se describió originalmente en preparaciones de cultivos celulares (Araque y Perea, 2004) y ha sido ampliada considerablemente por estudios posteriores en rodajas de cerebro (Haydon y Araque, 2002; Newman, 2003; Volterra y Steinhauser, 2004), más recientemente, también se ha investigado el papel de los gliotransmisores en la actividad cerebral compleja, como las oscilaciones corticales lentas (Fellin et al., 2009), así como en el comportamiento animal (Halassa et al., 2009).

Además de la excitabilidad neuronal, los astrocitos también pueden modular la actividad sináptica a través de la activación de receptores pre y postsinápticos por gliotransmisores liberados de astrocitos adyacentes. Se ha demostrado que el glutamato astrocítico puede provocar una potenciación de la transmisión sináptica en diferentes sinapsis a través de diferentes mecanismos, como puede ser la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I presinápticos (mGluR) por el glutamato astrocítico, provocando un aumento de la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSC) espontáneas y evocadas (Fiacco y McCarthy, 2004; Perea y Araque, 2007), potenciando la probabilidad de liberación de neurotransmisores en las sinapsis del hipocampo CA3-CA1 (Perea y Araque, 2007), la facilitación sináptica mediada por el glutamato astrocítico a través de la activación de los receptores de kainato presinápticos (Liu et al., 2004a) y los NMDAR (Jourdain et al., 2007).

Por el contrario, se ha informado que neurotransmisores liberados por el astrocito puede inducir una depresión de la transmisión sináptica, por ejemplo cuando el glutamato activa los mGluR del grupo II/III de las terminales inhibitoras del hipocampo (Liu et al., 2004b). El ATP o la adenosina (un producto metabólico del ATP), también pueden influir en la transmisión sináptica. El ATP liberado por los astrocitos aumenta la amplitud de las EPSC en miniatura a través de la activación de los receptores postsinápticos P2X7 en el núcleo paraventricular hipotalámico (Gordon et al., 2005). además, el ATP/adenosina astrocítico en el hipocampo contribuye a la depresión heterosináptica de la transmisión sináptica (Andersson et al., 2007; Serrano et al., 2006; Zhang et al., 2003)

En el presente trabajo se han estudiado las acciones de los receptores presinápticos de glutamato de tipo kainato en el hipocampo y cerebelo de ratón y los mecanismos celulares que subyacen a dichas acciones. De un modo particular, se describe la facilitación de la liberación de glutamato mediada por la activación de estos receptores en las sinapsis PF-PuC de Cerebelo, y por otro lado la depresión en la liberación mediada por estos mismos receptores en la sinapsis SC-CA2 de hipocampo y PF-PuC de cerebelo. En las sinapsis descritas se ha estudiado el papel del calcio en el mecanismo tanto de facilitación como de depresión observada y las cascadas de señalización intracelular involucradas en dichos fenómenos. Asimismo, se han estudiado los cambios plásticos que ocurren durante el desarrollo, concretamente el cambio que ocurre de t-LTD a t-LTP con la edad, en la sinapsis SC-CA1 de hipocampo de ratón. Se ha demostrado que el cambio efectivamente se produce con el desarrollo y no depende

del protocolo de plasticidad, el papel de los receptores metabotrópicos de glutamato y la dependencia de la adenosina y la D-serina, así como el rol protagonista que desarrolla el astrocito en este fenómeno, el cual se activa probablemente por acción del óxido nítrico proveniente de la célula postsináptica.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GENERALES

1. Estudiar el papel de los receptores de glutamato de tipo kainato en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica en el cerebelo de ratón.
2. Estudiar el papel de los receptores de glutamato de tipo kainato en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica en el hipocampo de ratón.
3. Estudiar el papel de los receptores de glutamato en la modulación de la transmisión sináptica y la plasticidad en el hipocampo de ratón.
4. Estudiar los mecanismos celulares y moleculares que están implicados en los cambios que experimenta la spike timing-dependent plasticity durante el desarrollo postnatal en la sinapsis SC-CA3 del hipocampo de ratón.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si la activación de los KAR facilita la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las células granulares y las células de Purkinje en el cerebelo de ratón.
2. Determinar si la activación de los KAR deprime la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las células granulares y las células de Purkinje en el cerebelo de ratón.
3. Determinar el mecanismo de acción de los KAR para facilitar la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las células granulares y las células de Purkinje en el cerebelo de ratón.
4. Determinar el mecanismo de acción de los KAR para deprimir la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las células granulares y las células de Purkinje en el cerebelo de ratón.
5. Determinar si la activación de los KAR facilita la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células de piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón.



6. Determinar si la activación de los KAR deprime la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida colaterales de Shaffer y las células de piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón.
7. Determinar el mecanismo de acción de los KAR para deprimir la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las colaterales de Shaffer y las células de piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón
8. Determinar los mecanismos celulares y moleculares que median la inducción y la expresión de t-LTD a P13-21 en la sinapsis establecida entre las colaterales de Shaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratón.
9. Determinar los mecanismos celulares y moleculares que median la pérdida de t-LTD a P22-30 en la sinapsis establecida entre las colaterales de Shaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratón.
10. Determinar los mecanismos celulares y moleculares que median la inducción y la expresión de t-LTP a P35-42 en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratón.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos descritos en la presente memoria se han llevado a cabo en rodajas obtenidas del cerebro de ratones C57Bl/6 de edades comprendidas entre 13 y 60 días (p10 – p60, tomando como p0 el día de nacimiento). Los experimentos se realizaron de acuerdo con la directiva de la Unión Europea para el uso de animales de laboratorio en experimentos y fueron aprobados por el Comité de Ética local (Junta de Andalucía y Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España), referencia número: 18/01/2017/002.

### 3.1. OBTENCIÓN DEL TEJIDO

Los animales se anestesiaron con isoflurano y se sacrificaron por decapitación para posteriormente extraer el cerebro, colocándolo en una solución ringer fría (0-4 °C) cuya composición es similar a la del líquido cerebroespinal.

Esta solución fue burbujeada continuamente con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Se extrajo el cerebro y se fijó a la plataforma de un vibratomo (Leica, modelo VT 1000S), manteniendo el tejido en todo momento en ringer frío. En los experimentos de hipocampo y cerebelo se obtuvieron rodajas coronales de 350 µm de grosor. Las rodajas se colocaron para su recuperación en una cámara de incubación con ringer a temperatura ambiente continuamente oxigenado, donde permanecieron al menos 1 hora antes de su uso (figura 17). Posteriormente se colocó en un microscopio (Olympus, modelo BX51WI) con el cual se localizó la zona de interés en la rodaja (Figura 18).

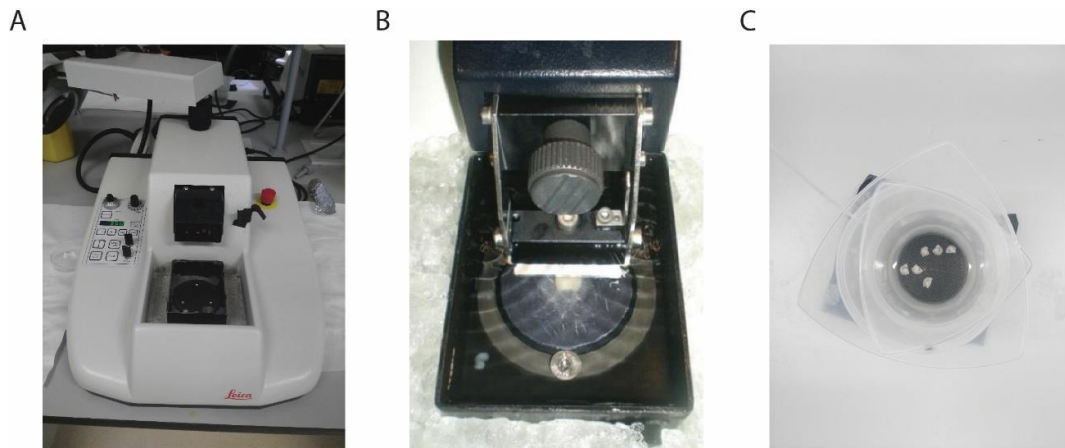


Figura 17: Preparación de rodajas. A: Vibratomo utilizado, Leica, modelo VT 1000S. B: El cerebro se fijó a la plataforma del vibratomo y se cortó en rodajas de 350  $\mu\text{m}$  de grosor. C: Las rodajas se mantuvieron en una cámara a temperatura ambiente y continuamente oxigenadas durante una hora antes de su uso.

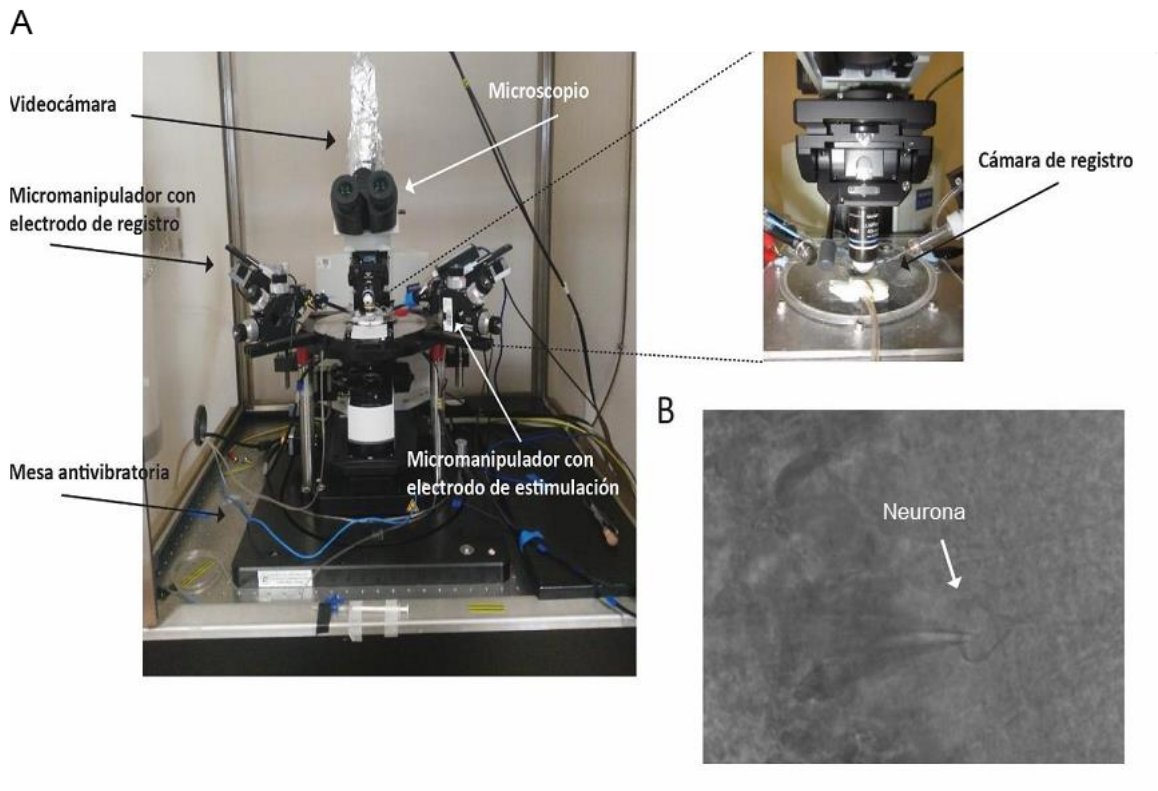


Figura 18: Microscopio y sus elementos. A) Microscopio con los distintos elementos que hicieron posible la colocación de la rodaja y su mantenimiento, la sujeción de los electrodos, y la localización de las zonas de estimulación y registro, se localizaron las zonas de estimulación y registro y se colocaron los electrodos con ayuda del microscopio, o de la videocámara y el monitor. B) Imagen de alta resolución de la rodaja.

## 3.2. SOLUCIONES

### SOLUCIÓN EXTRACELULAR

Solución extracelular, o ringer, que se utilizó para conservar las rodajas y permitir su recuperación antes de su registro, la composición consistente en (en mM) 124 NaCl, 2.69 KCl, 1.25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 26  $\text{NaHCO}_3$  y 10 glucosa (pH 7,2, 300 mOsm). Se prepararon dos stocks a partir de los cuales se elaboró diariamente solución extracelular. La composición del stock 1 y del stock 2 se especifican en las tablas 1 y 2 respectivamente.

SUSTANCIA	PESO MOLECULAR	mM	X1	X10
			g/l	g/l
NaCl	58,44	126,00	7,363	73,63
KCl	74,56	3,00	0,224	2,24
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	156,01	1,25	0,195	1,95
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,50	2,00	0,493	4,93
$\text{CaC}_2\text{H}_2\text{O}$	147,00	2,00	0,294	2,94
Glucosa	180,20	10,00	1,802	18,02

Tabla 1: Composición del stock 1 empleado para fabricar solución extracelular.

SUSTANCIA	PESO MOLECULAR	mM	X1	X10
			g/l	g/l
$\text{NaHCO}_3$	84,01	24,00	2,016	20,162

Tabla 2: Composición del stock 2 empleado para fabricar solución extracelular.

La solución extracelular se empleó tanto en el mantenimiento de las rodajas como para llenar la pipeta de vidrio que contiene el electrodo de registro en experimentos extracelulares.

### 3.2.1. SOLUCIÓN INTERNA

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa, para la cual se utilizó una solución interna diferente a la solución extracelular. Las soluciones internas se caracterizan por tener una composición similar al líquido intracelular, permitiendo así poder sellar la célula y posteriormente abrir el sello y conectar el electrodo de registro, con el medio intracelular. Cuando los experimentos fueron realizados en “voltage-clamp” la solución utilizada estuvo compuesta por los elementos de la tabla 3.

SUSTANCIA	PROV./CÓDIGO	PM	[ ]	PESO(mg) (Para 20mL)
CsCl	Sigma C-303- 25g	168.4	140m M	471.52
Ethylene glycol-bis(2- aminoethylether)	Sigma E4378- 25mg	380.4	0.2mM	1.521
N,N,N',N' tetraacetic acid 99.5%				
HEPES.99.5% (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Sigma H3375- 500g	238.3	10mM	47.66
ATP-Mg	Sigma A-9187	507.18	2mM	20.287
GTP Disodium salt	Sigma G- 8877-100mg	523	0.3mM	3.138
QX-314	Sigma L- 5783-50mg	343.3	5mM	34.33

Tabla 3: Composición de la solución interna empleada para llenar la pipeta de vidrio cuando se realizaron experimentos en voltage-clamp.

Se realizaron además experimentos en current-clamp, la solución interna, cuya composición se indica en la tabla 4.

SUSTANCIA	PROV./CÓDIGO	PM	[ ]	PESO(mg) (Para 50mL)
Potassium D-gluconate (C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> KO <sub>7</sub> )	Sigma C-303- 25g	168.4	140mM	471.52
HEPES.99.5% (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Sigma H3375- 500g	238.3	40mM	476.66
ATP-Mg	Sigma A-9187	507.18	4mM	101.436
GTP Disodium salt	Sigma G- 8877-100mg	523	0.3mM	3.138
GTP Disodium salt	Sigma G- 8877-100mg	523	0.3mM	7.845
NaCl	Sigma AMRESCO	58.44	4mM	11.688

Tabla 4: Composición de la solución interna empleada para llenar la pipeta de vidrio cuando se realizaron experimentos en Current-clamp.

### 3.3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

En función de los experimentos se obtuvieron distintos tipos de registros electrofisiológicos. Para registros de una única célula, *Patch-Clamp*, se obtuvieron registro de corrientes postsinápticas excitadoras evocadas (eEPSC) o de potenciales postsinápticos excitadores evocados (eEPSP) en función del tipo de experimento; mientras que para registros a nivel multicelular, conjunto de múltiples células, se obtuvieron registros de potenciales postsinápticos excitadores de campo (fEPSP), este tipo de registro se utilizó para la realización de experimentos *in vivo*, con el animal fijado y anestesiado para la realización de cirugías estereotáxicas.

#### 3.3.1. REGISTRO DE CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EXCITADORASEVOCADAS.

Una vez que la rodaja se colocó en la cámara de registro (Fig. 15), ésta estuvo en contacto continuo con la solución extracelular, a una tasa de perfusión que dependió del

experimento en curso. Cada región a registrar (CA1 y CA2 del hipocampo, Capa células de Purkinje del cerebelo) se localizó con ayuda del microscopio (Olympus, modelo BX51WI). En los experimentos realizados utilizando la técnica de patch-clamp, una vez que se localizaron las células de la zona de interés, se eligió la célula a registrar de forma visual, atendiendo a su posición y a su forma característica, con ayuda de un objetivo 40X (Fig.18). Adicionalmente, las células se identificaron según su patrón de disparo característico.

Para poder registrar corrientes postsinápticas excitadoras evocadas (eEPSCs) se realizaron experimentos empleando la técnica de *Patch-Clamp* en su configuración de célula completa (whole cell), fijando el potencial de membrana (voltage-clamp) a +40 mV (para registrar corrientes de tipo NMDA) o -70 mV (para registrar corrientes de tipo AMPA). Se aplicaron pulsos eléctricos a través de un electrodo monopolar para lo cual se empleó un estimulador (Master 8, A.M.P.I.), que controla la duración y la frecuencia del pulso eléctrico, y una unidad de aislamiento (ISOflex, A.M.P.I.) que controla la amplitud de dicho pulso (Figura 19).

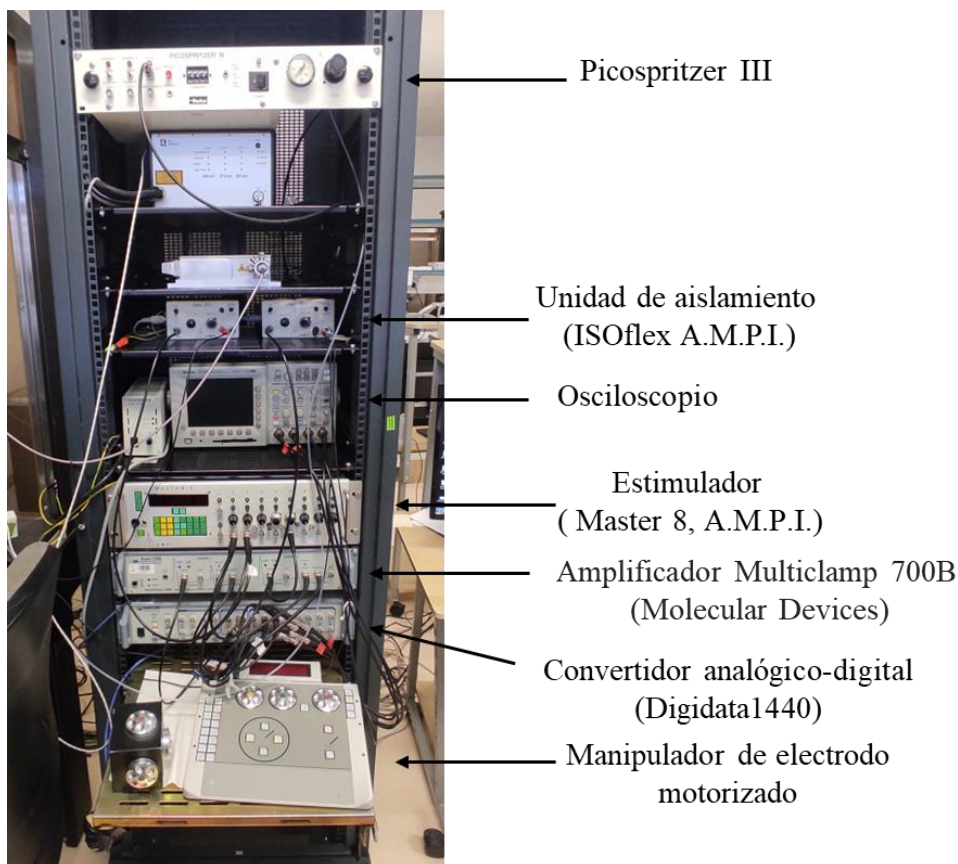


Figura 19: Equipamiento experimental. Distintos equipos que fueron utilizados para la realización de los experimentos.

Los electrodos de se fabricaron con pipetas de vidrio de borosilicato a través de un puller, o estirador de pipetas horizontal (Flaming/Brown Micropipette Puller modelo P97, Sutter Instruments Co.) y se rellenaron con solución interna de “voltaje clamp”.

Para los potenciales postsinápticos excitadores evocados (eEPSPs) el procedimiento fue similar al anterior descrito, solo que la solución interna en este caso fue la adecuada para los registros de potenciales evocados, y el potencial de membrana de la célula no se fijó. Para cada sinapsis el electrodo de estimulación se colocó como se describe a continuación:

- Hipocampo: Sobre las fibras Schaffer colaterales de CA3.
- Cerebelo: Sobre las fibras paralelas aferentes hacia las neuronas de Purkinje.

Los electrodos de registro para patch-clamp se fabricaron con pipetas de vidrio borosilicato (con un puller, o estirador de pipetas horizontal, P-97, Sutter Instruments) y tuvieron una resistencia de 5-10 MΩ cuando se llenaron con la solución interna. La resistencia del sello fue >1 GΩ.

Cuando se realizaron experimentos de “whole-cell”, se observó en todo momento la resistencia en serie, y se descartaron todos aquellos experimentos en los que se produjo un cambio de resistencia superior al 15% a lo largo del mismo.

Para determinar si el mecanismo de acción fué de naturaleza presináptica o postsináptica, se utilizaron las siguientes aproximaciones:

Análisis del coeficiente de variación: Se representó gráficamente el cociente  $1/CV^2$  frente a la amplitud media de las respuestas y se determinó si los valores experimentales se ajustaron a una línea diagonal (sugerente en general de un mecanismo de acción presináptico) o a una línea horizontal, (sugerente en general de un mecanismo de acción postsináptico). Donde,  $\sigma^2(\text{EPSC})$  y  $\sigma^2(\text{ruido})$  son la varianza de las eEPSCs y de la línea base, respectivamente.

$$CV = \frac{\sqrt{\sigma^2(\text{EPSC}) - \sigma^2(\text{ruido})}}{\text{Amplitud}_{(\text{EPSC})}}$$



Análisis de pulsos pareados: Se aplicó un protocolo de estimulación por pares de pulsos separados entre sí 40 ms. Se calculó la razón de dicha facilitación (PPR, “Pair Pulse Ratio”) obteniéndose el cociente de la amplitud (para eEPSCs) o de la pendiente (para eEPSPs) del segundo pulso entre la amplitud o pendiente del primero. Se evaluó el PPR en situación control y después de aplicado el compuesto. Un cambio en el PPR es en general sugerente de un mecanismo presináptico.

Número de fallos: Se determinó el número de fallos en la transmisión sináptica. Se evaluó el cambio en el número de fallos en situación control y después de la aplicación de algún compuesto o protocolo.

EPSP miniatura: Se monitorizaron tanto la frecuencia como la amplitud de los minis antes y después del experimento, si se apreciase alguna variación en dicha frecuencia o amplitud tras la exposición de algún fármaco o aplicación de un protocolo de plasticidad, podría indicar un posible un mecanismo presináptico.

### **3.3.2. REGISTRO DE CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EXCITADORAS DE CAMPO EN RODAJAS**

Para registrar los fEPSPs se aplicaron pulsos eléctricos a través de un electrodo bipolar que se colocó en la región de CA1 en los experimentos de hipocampo y en el paso de las colaterales de Schaffer. La pipeta de vidrio borosilicato que contiene el electrodo se llenó con solución extracelular. La distancia entre los electrodos de estimulación y registro fue de 200-300  $\mu\text{m}$ . Los equipos utilizados fueron los mismos que para registrar eEPSCs.

### **3.3.3. REGISTRO DE POTENCIALES POSTSINÁPTICOS EXCITADORES DE CAMPO *IN VIVO*.**

Inicialmente, el ratón fue anestesiado con uretano (1.8 g/Kg). Para comprobar el nivel correcto de anestesia del ratón se utilizaron pruebas, como ejercer presión sobre el dedo del pie, la oreja o la cola y toque corneal para observar la respuesta del ratón a los estímulos físicos. Una vez aprobado, se rasuró del ratón con una recortadora y se colocó completamente anestesiado sobre una almohadilla térmica a 32°C con una sonda de

temperatura insertada en el recto. Los dos dientes frontales se fijaron en el orificio del instrumento estereotáxico y el cráneo del ratón se fijó firmemente por las orejas. Al observar bajo una lupa, se cortó la piel del ratón y se expuso el cráneo lo suficiente como para ver las marcas bregma y lambda. La duramadre se secó con un bastón de algodón.

Mediante un atlas estereotáxico se marcaron las áreas donde se abrirían ventanas en el cráneo del animal (centro 2.06 mm anterior de bregma, 1.90 mm lateral para el electrodo de estimulación y 2.06 mm anterior de bregma, 2.15 mm lateral para el electrodo de registro). Ambas ventanas tuvieron 2–3 mm de diámetro. Para el electrodo de referencia, se abrió una ventana similar en el hemisferio opuesto en las coordenadas (centro 2.06 mm versus bregma, 1.90 mm lateral). Se utilizó un microtaladro con una cabeza de 0.5 mm de diámetro y pinzas para extraer fragmentos óseos y duramadre, se limpió la zona con líquido cefalorraquídeo artificial y se mantuvo húmeda en todo momento. Se localizaron ambos electrodos (1.60-1.80 mm de profundidad), y se introdujo una aguja metálica en la pata trasera del ratón se estableció como tierra.

Para registrar los fEPSPs se aplicaron pulsos eléctricos a través de un electrodo monopolar para lo cual se empleó un estimulador (Master 8, A.M.P.I.), que controla la duración y la frecuencia del pulso eléctrico, y una unidad de aislamiento (ISOflex, A.M.P.I.) que controla la amplitud de dicho pulso (Figura 17). Los electrodos de registro para los experimentos de potenciales de campo se fabricaron con pipetas de vidrio de borosilicato a través de un puller, o estirador de pipetas horizontal (Flaming/Brown Micropipette Puller modelo P97, Sutter Instruments Co.).

Tras obtener la pipeta, y con el fin de conseguir una resistencia y un diámetro adecuados de la misma para el registro extracelular, se rompió la punta de la pipeta mediante papel y de manera muy delicada. A continuación, la pipeta de vidrio de borosilicato que contenía el electrodo de registro se llenó con solución extracelular. Los electrodos de registro se situaron en el stratum piramidale de CA1 (capa de células piramidales).

A



B



C

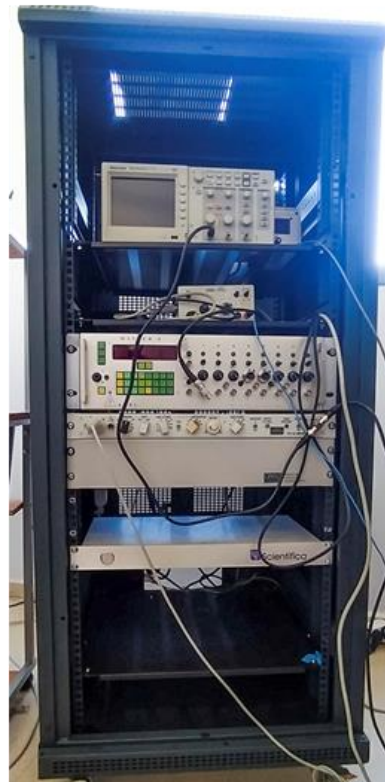


Figura 20: Equipamiento para la realización de los experimentos *in vivo*. A) Disposición del set up de trabajo, sobre una mesa antivibratoria se dispone la lupa, el estereotáxico y el instrumental de cirugía. B) Zona de fijación del ratón y manta térmica. C) Instrumental utilizado para la obtención de los registros.

### **3.4. PROTOCOLOS EMPLEADOS**

A continuación, se indican los protocolos utilizados para los experimentos realizados.

#### **3.4.1. PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA ESTUDIAR LOS MECANISMO DE ACCION DEL KAINATO SOBRE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO**

Efectos de KA sobre la amplitud de las eEPSCs.

Se aplicó el protocolo de la siguiente manera:

- Se monitorizaron eEPSCs durante 10 minutos de línea base, a una frecuencia de estimulación de 0.2 Hz.
- Se aplicó de KA durante 4 minutos.
- Se lavó 20 minutos tras la aplicación de KA.

En los experimentos en los que se registraron corrientes mediadas por los receptores de tipo NMDA, se estableció el potencial de membrana a +40 mV, y se añadió a la solución GYKI53655 (25  $\mu$ M) para bloquear a los receptores AMPA, así como bicuculina (20  $\mu$ M) para bloquear a los receptores de GABA<sub>A</sub>. En los experimentos en los que los que se registraron corrientes mediadas por los receptores AMPA, se estableció el potencial de membrana a -70 mV, se añadió D-AP5 (50  $\mu$ M) para bloquear los receptores de NMDA y bicuculina (20  $\mu$ M) para bloquear los receptores GABA.

**Efectos de KA sobre la amplitud de las eEPSCs + NBQX, Rp- Br-cAMP, H-89, Forscolina, Filantotoxina, Rianodina, Tapsigarguina, Nimodipina, toxina pertúsica, Calmidazolium, Calphostina-C y W-7:**

En los experimentos que incluían toxina pertúsica, phillantotoxina, y forscolina, las rodajas se incubaron durante una hora en el compuesto correspondiente, permaneciendo en el baño durante toda la duración del experimento. El resto de sustancias se añadió al baño una vez que se inició el experimento. Así mismo, en todos los casos, fue aplicado el siguiente protocolo:

- Registro celular durante 10 minutos de línea base, a una frecuencia de estimulación de 0.2 Hz.

- Aplicación de KA durante 4 minutos.
- 20 minutos de lavado de KA.

En todos los experimentos realizados en este apartado, se registraron corrientes mediadas por los receptores de tipo NMDA, a un potencial de membrana de +40 mV, y añadiendo a la solución GYKI53655 (30  $\mu$ M) para bloquear los receptores AMPA, así como bicuculina (10  $\mu$ M) para bloquear los receptores de GABA<sub>A</sub>.

### **3.4.2. PROTOCOLOS DE PLASTICIDAD**

Para los experimentos de plasticidad, la aplicación de protocolos de plasticidad se utilizó un estimulador (Master 8, A.M.P.I.), que controla la duración y la frecuencia del pulso eléctrico, los experimentos de plasticidad siguieron el siguiente esquema:

- Se registró a una frecuencia de estimulación de 0.2 Hz, el tiempo necesario hasta obtener un periodo mínimo de 10 minutos donde conservase una estabilidad en la amplitud y la pendiente
- Posteriormente se aplicó el protocolo de plasticidad
- Tras la aplicación del protocolo se registró un mínimo de 30 minutos.

Para los experimentos de plasticidad se aplicaron distintos protocolos de plasticidad, independientemente de si la célula, la rodaja o el baño estuvo expuesto a algún fármaco. Los protocolos de STDP (Spike timing-dependent plasticity) consistieron en modular uno o varios potenciales de acción postsinápticos en intervalos de tiempo determinados antes o después del evocado provocado por la estimulación presináptica. También se analizaron los protocolos clásicos de plasticidad que consisten en variar la frecuencia entre pulsos de estimulación.

Los protocolos de STDP utilizados fueron los siguientes:

- Parear el evocado con un potencial de acción postsináptico durante 100 veces a una frecuencia de 0.2 Hz, provocando el potencial de acción postsináptico a diferentes intervalos de tiempo respecto del evocado para diferentes, siendo: 150, 125, 100, 75, 50, 35, 25, 18ms antes del evocado y 5ms después del mismo.

- Protocolo consistente en aparear 100 veces dos EPSPs con un potencial de acción postsináptico.

- Protocolo consistente en aparear 100 veces un EPSP con dos potenciales de acción postsináptico.

El protocolo clásico de LTD consistió en aplicar un segundo pulso de estimulación 50ms después del a una frecuencia de 1 Hz durante 15 minutos.

### **3.5. ANÁLISIS DE LOS DATOS**

Tanto en los experimentos extracelulares como en los de patch-clamp, los registros se obtuvieron con un amplificador (Multiclamp 700B, Molecular Devices). Las señales se filtraron a 3 KHz, y se digitalizaron con un convertidor analógico-digital (Digidata 1440A, Molecular Devices), con el fin de almacenarlos en un ordenador y analizarlos posteriormente “off line”. Para ello se empleó el paquete de programas pClamp 10.2 (Molecular Devices).

Los datos fueron analizados con el software Clampfit 10.2 (Molecular Dispositivos) y los últimos 5 minutos de registro (amplitud o pendiente) se utilizaron para estimar los cambios en eficacia sináptica, comparándolo con los 5 minutos previos a la aplicación del fármaco o protocolo de plasticidad, la cual se estableció como línea base. Para los experimentos de PPR, dos EPSCs o EPSPs (corrientes o potenciales) fueron evocados durante 30 s a la frecuencia de referencia (0.2 Hz) al comienzo del experimento, con un intervalo de 40 ms entre ambos, y nuevamente 30 min después del final del protocolo de plasticidad. El PPR fue expresado como la amplitud o pendiente (corrientes o potenciales) del segundo evocado dividido por la pendiente del primero. El análisis del coeficiente de variación (CV) se realizó usando la amplitud o las pendientes de los evocados, en función si son corrientes o potenciales. El análisis de respuestas miniatura se realizó contabilizando durante 90s la frecuencia y la amplitud de los mismos, antes y después aplicar el fármaco o protocolo de plasticidad. Los gráficos fueron hechos usando Sigmaplot 11.0.

Para comparaciones entre dos grupos se usó la prueba t de Student. Para análisis de múltiples con el mismo control, análisis unidireccional de se realizó una varianza

seguida de la prueba post hoc de Holm-Sidak (ANOVA). Los datos se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. y los valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



## 4. RESULTADOS

### 4.1. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EXCITADORA.

#### 4.1.1. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (FP-PuC) DE CEREBELO DE RATÓN

##### 4.1.1.1. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UN AUMENTO DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO DE RATÓN

Se estudió el efecto de KA en las sinapsis PF-PuC de cerebelo de ratón, para ello se estimularon los axones de fibras paralelas mientras se registraron los eEPSCs mediados por receptores de tipo NMDA en las células de Purkinje, mediante la técnica de *pach clamp* en su configuración de célula completa, con el potencial de membrana fijado a +40 mV, (Figura 21).

Los registros se realizaron en presencia de GYKI53655 (30  $\mu$ M), para prevenir la activación de los AMPAR, así como en presencia de bicuculina (20  $\mu$ M), para prevenir la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>.

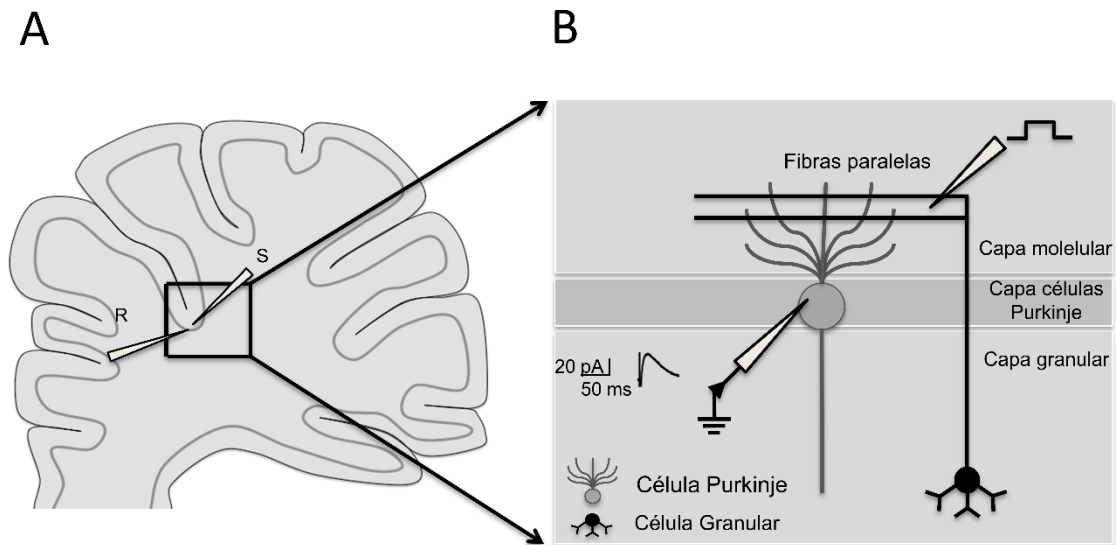


Figura 21: A) Esquema de una rodaja con corte parasagital de cerebelo de ratón, y como fueron colocados los electrodos de registro (R) y de estimulación (S). B) Esquema de la sinapsis entre fibras paralelas-células de Purkinje y la disposición de los electrodos de registro (R) y de estimulación (S).

Se observó una facilitación de la amplitud de las corrientes mediadas por los receptores NMDA al aplicar KA ( $3\mu\text{M}$ ) en rodajas de en ratones de 4-6 semanas ( $138 \pm 11\%$ ,  $n = 10$ , Figura 22A, B, y al aplicar concentraciones de KA de  $0,3\mu\text{M}$  y  $1\mu\text{M}$  ( $115 \pm 2\%$ ,  $n = 6$ ,  $117 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , Figura 22A, B) respectivamente. Con KA  $3\mu\text{M}$ , la facilitación sináptica fue seguida por una disminución del  $36 \pm 8\%$  (hasta el  $64 \pm 8\%$  del valor inicial,  $n = 10$ ) en la amplitud (Figura 22B). Para analizar los efectos de facilitación de la transmisión glutamatergica mediada por KAR, de ahora en adelante se utilizó KA  $3\mu\text{M}$  en experimentos electrofisiológicos posteriores, ya que KA  $3\mu\text{M}$  produjo el nivel máximo de facilitación observable (Figuras 22A, B).

Para determinar si el efecto de KA registrado sobre neuronas de Purkinje en rodajas de cerebelo estuvo mediado por la activación de KAR, se realizaron experimentos en presencia de NBQX. Mostramos que el efecto bifásico de KA de ( $3\mu\text{M}$ ) en la amplitud de las eEPSC se eliminó en presencia de NBQX ( $10\mu\text{M}$ ) antagonista de receptores AMPA y kainato ( $95 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ , Figuras 22A, B).

En estos experimentos, debido a que los receptores AMPA se antagonizan de forma selectiva en presencia de GYKI53655 en el baño, la observación del antagonismo

total por NBQX indica que la modulación que se debe específicamente a los receptores de kainato.

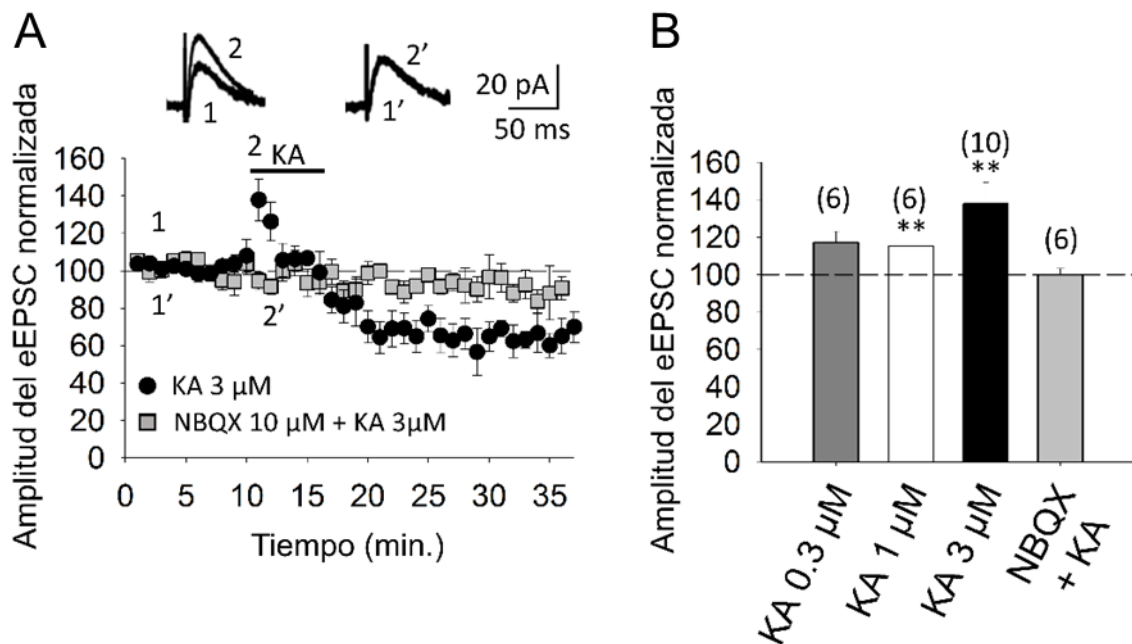


Figura 22: Kainato (KA) aumenta la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadora evocadas (eEPSC) en la sinapsis establecida entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (PF-PuC) del cerebelo. (A) Evolución temporal del efecto de KA (3  $\mu$ M) sobre la amplitud de eEPSCs en ausencia (círculos) y presencia de NBQX (cuadrados). Se muestran trazas antes y después de 4 min de la aplicación de KA en ausencia (1, 2) y en presencia de NBQX 10  $\mu$ M (1', 2'). (B) Cuantificación de la modulación observada en (A) efecto dosis-respuesta. El número de rodajas utilizadas (de dos a tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , prueba t de Student).

#### **4.1.1.2. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARS EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSI ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO ES PRESINÁPTICO**

Para determinar si el mecanismo de acción es presináptico o postsináptico se realizaron registros de pares de pulsos y se midió el ratio que existe entre ambos pulsos (se observó depresión de los pares de pulsos con un intervalo de 40 ms entre uno y otro). El ratio de pares de pulsos fue de  $1.9 \pm 0.4$  ( $n = 9$ ) en condiciones control. Después del tratamiento con KA, el ratio de pares de pulso disminuyó a ( $0.7 \pm 0.3$   $n = 9$ , Figura 23A), lo que sugiere un efecto sobre la probabilidad de liberación (Manabe et al., 1993), lo indicaría un posible locus presináptico de la regulación mediada por actuación de los KAR.

En segundo lugar, se determinó la proporción del número de fallos de liberación en ausencia y presencia de KA. El porcentaje de fallos en la transmisión sináptica fue de  $19 \pm 4$  %,  $n = 5$  después de la aplicación de KA, la tasa de fallos disminuyó considerablemente (a  $7 \pm 3$  %,  $n = 5$ , Figura 23B), lo que también sugiere un locus de acción presináptico para KA.

Finalmente, se comparó la modulación mediada por KA de las eEPSC mediadas por los receptores de tipo NMDA (con GYKI53655  $30\mu\text{M}$  presente) y los eEPSC mediados por receptores del tipo AMPA registrados a  $-70$  mV (sin GYKI53655, pero con D-AP5 y bicuculina  $20\mu\text{M}$ , para bloquear respectivamente los receptores del tipo NMDA y GABA<sub>A</sub>). KA produjo un aumento comparable de la amplitud de los eEPSCs mediados por los receptores de NMDA ( $135 \pm 7$  %,  $n = 6$ , Figura 23C) y los de AMPA ( $130 \pm 12$  %,  $n = 5$ , Figura 23C). Esta facilitación similar de las amplitudes de los eEPSC mediadas por los receptores NMDA y AMPA sugiere que el efecto de KA es presináptico. En conjunto los resultados anteriores sugieren un locus de acción presináptico para los KARs en la modulación de la liberación de glutamato.

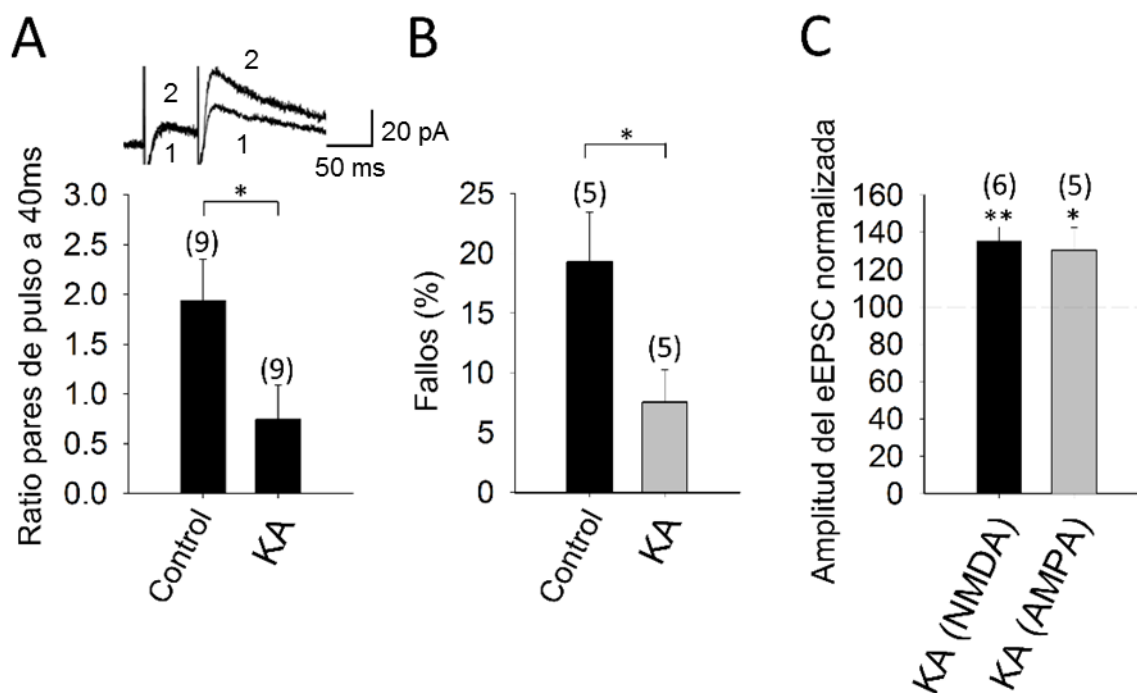


Figura 23: La facilitación de la transmisión sináptica excitadora se debe a la activación de KARs presinápticos. (A) KA (3  $\mu$ M) produce una disminución de facilitación por pares de pulso. Se muestran trazas representativas escaladas. (B) Efecto de KA sobre el número de fallos de la transmisión sináptica. (C) Efecto de KA (3  $\mu$ M) sobre las corrientes mediadas por los receptores NMDA y AMPA, respectivamente. Se observó que el efecto del kainato en estas corrientes es indistinguible. El número de rodajas utilizadas (de dos a tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, test t de Student).

#### **4.1.1.3. LA FACILITACIÓN DE TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRESINÁPTICOS EN LA SINAPSI ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) INVOLUCRA LA RUTA ADENILATO CICLASA/ AMP CÍCLICO/ PROTEÍNA QUINASA A**

Se examinó el mecanismo intracelular involucrado en el aumento de la amplitud de LAS eEPSC.

Para ello, primero, se determinó si la PKA estaba involucrada en el aumento de las eEPSC, para ello se realizaron experimentos en presencia de cAMP-Rp 100  $\mu$ M o H-89 2  $\mu$ M, en presencia de estos inhibidores de PKA se eliminó la facilitación de la amplitud eEPSC por KA 3  $\mu$ M ( $88 \pm 3$  %, n = 7 después de cAMP-Rp y  $92 \pm 6$  %, n = 7 después de H-89, frente a KA 3  $\mu$ M,  $131 \pm 9$ %, n = 13, Figura 24A,B). Estos datos juntos indican que la activación de la PKA juega un papel en la modulación mediada por KA observada de la transmisión glutamatérgica del cerebelo en las sinapsis PF-PuC.

Seguidamente, se examinó la facilitación de los eEPSC mediada por KA en presencia de forskolina. Dado que la forskolina produce efectos duraderos (Tong et al., 1996), en estos experimentos se preincubaron las rodajas durante 1 h en presencia del fármaco. La aplicación de KA en las rodajas tratadas con forskolina (30  $\mu$ M) previno el efecto de KA sobre el eEPSC ( $95 \pm 4$  %, n = 6, Figura 24B).

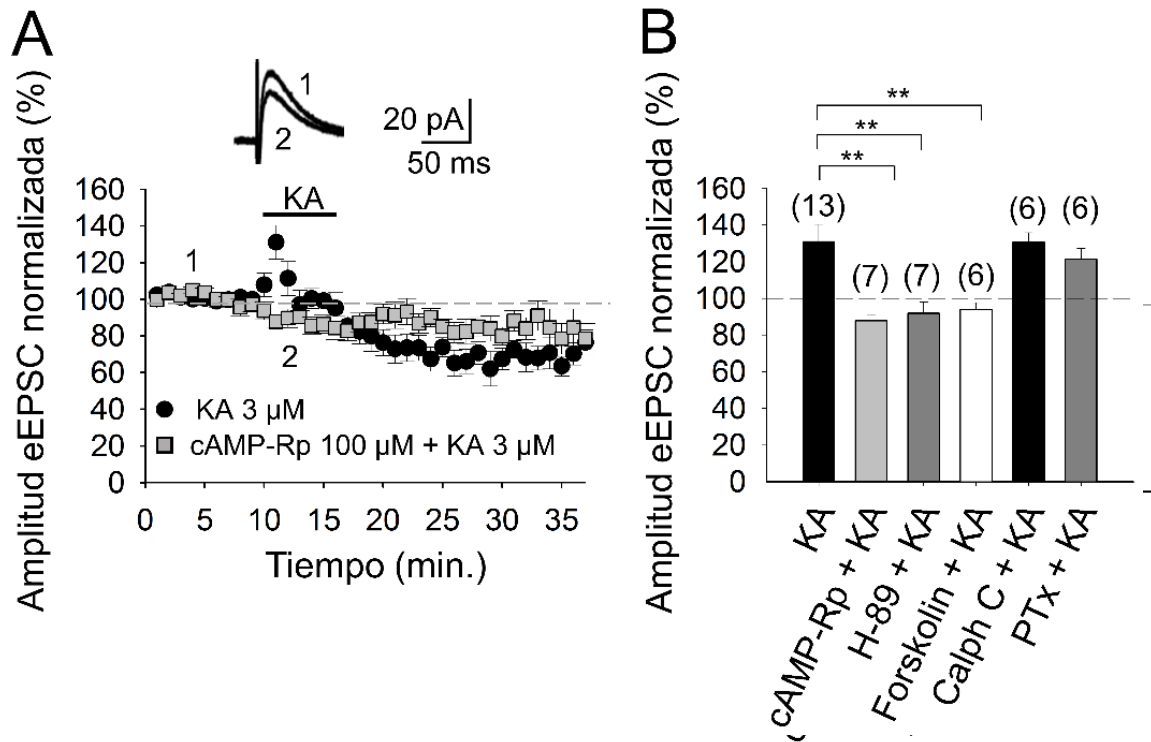


Figura 24: La activación de la adenilato ciclasa (AC) y la proteína quinasa A (PKA) participan en la facilitación mediada por kainato de la liberación de glutamato. (A) Evolución temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSC en rodajas tratadas con cAMP-Rp. Se muestran trazas representativas que muestran que KA (3  $\mu$ M) no aumenta la amplitud de las eEPSC en rodajas tratadas con cAMP-Rp. (B) La inhibición de la proteína quinasa A (PKA) por cAMP-Rp (100  $\mu$ M) o H-89 (2  $\mu$ M) y la activación de la adenilato ciclasa (AC) por forskolina (30  $\mu$ M) impidieron la acción facilitadora de KA. La inhibición de la proteína quinasa C (PKC) con calfofostina C (1  $\mu$ M) no tiene efecto sobre el efecto facilitador de KA de la amplitud de eEPSC. El efecto facilitador de KA no se ve afectado en rodajas tratadas con toxina pertúsica. El número de rodajas (de dos a tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , prueba ANOVA).

#### **4.1.1.4. LA PROTEÍNA QUINASA C Y LAS PROTEÍNAS G SE REQUIEREN EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE KARs EN LA SINAPSI ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC)**

La proteína quinasa C (PKC) se ha implicado anteriormente en aspectos de la modulación mediada por KAR (para revisiones ver Rodríguez-Moreno y Sihra, 2007a,b), para determinar si esta quinasa juega un papel en la modulación de la liberación de glutamato por la actuación de KARs de la sinapsis PF-PuC. Se realizaron experimentos tratando rodajas con calfostin C (1  $\mu$ M) para inhibir específicamente la PKC. En estas condiciones experimentales, no se previno el efecto de la facilitación mediada por KA ( $131 \pm 5$  %, n = 6, Figura 24B), este resultado indica que la PKC no se requiere para la modulación observada por KA.

A continuación, se determinó si el efecto facilitador de la activación presináptica de KAR involucra la función de proteínas G, para ello se examinó el efecto de KA en rodajas tratadas con toxina pertusica (PTx, 5  $\mu$ g/ml). Se observó que en presencia de PTx, KA no previno la facilitación de la transmisión sináptica ( $122 \pm 6$  %, n = 6, frente a  $131 \pm 9$  %, n = 13 sin PTx, Figura 24B) indicando que la acción de las proteínas G no se requiere para la facilitación mediada por la activación de KAR observada en rodajas no tratadas.

#### **4.1.1.5. LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO REQUIERE UN AUMENTO DE $Ca^{2+}$ EN EL CITOSOL EN SINAPSI PF-PuC**

El papel del  $Ca^{2+}$  en la facilitación sináptica mediada por KARs ha sido objeto de debate y controversia, por ejemplo, en las sinapsis de fibra musgosa-CA3 (FM-CA3) del hipocampo. Algunos estudios sugieren que la penetración de  $Ca^{2+}$  a través de los KAR y la posterior liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares es obligatoria para la plasticidad de corto y larga duración en las sinapsis FM-CA3 (Lauri et al., 2003; Scott et al., 2008). Otros antes no han observado ningún efecto de KA sobre el [ $Ca^{2+}$ ] citosólico



(Kamiya et al., 2002) y otros defienden que una disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sustenta la modulación debida a la activación de KAR (Kamiya y Ozawa, 1998, 2000).

Para examinar si los KAR que median esta facilitación son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  se investigó el efecto de KA sobre las amplitudes de las eEPSC en presencia de filantotoxina, una toxina que bloquea los KARs permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  no editados (Fletcher and Lodge, 1996; Scott et al., 2008).

Después del tratamiento de las rodajas con filantotoxina  $3 \mu\text{M}$ , la facilitación sináptica mediada por KA ( $3 \mu\text{M}$ ) se previno (al  $75 \pm 5 \%$  de la amplitud inicial,  $n = 7$  frente a  $147 \pm 17 \%$ ,  $n = 6$ , Figuras 25A, B). Estos resultados evidencian que los KARs que median esta facilitación son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  en las sinapsis PF-PuC.

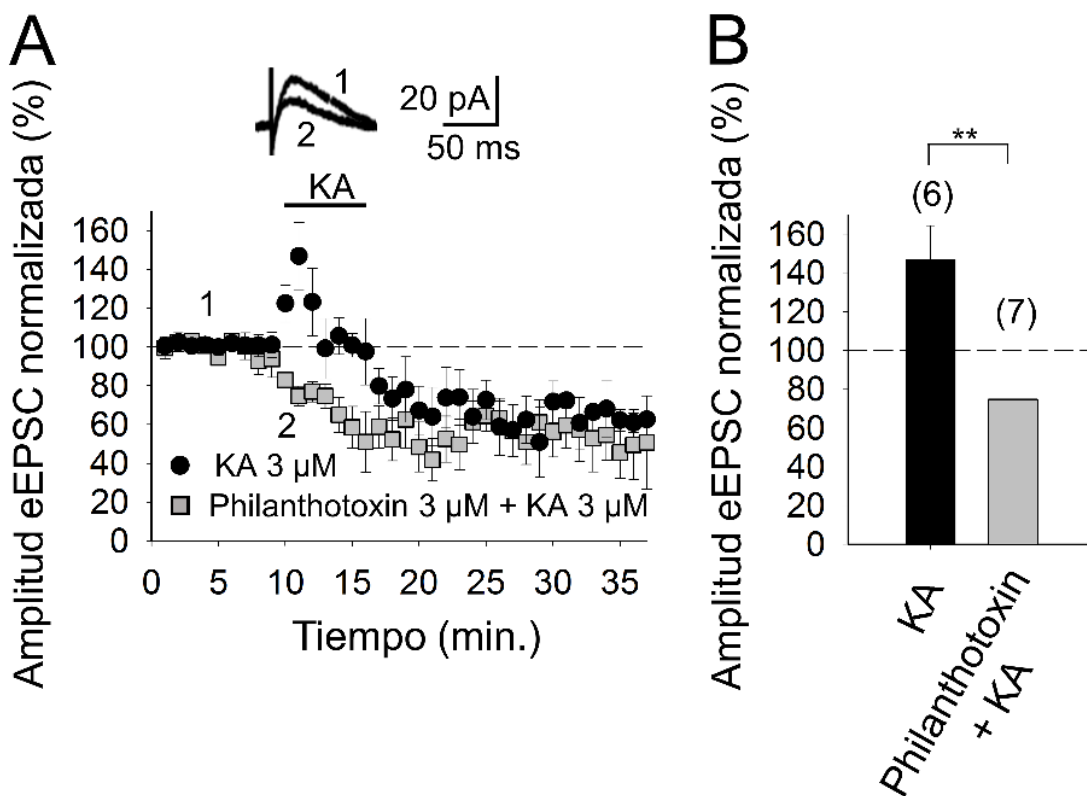


Figura 25: Los KARs son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . (A) Evolución temporal del efecto de KA ( $3 \mu\text{M}$ ) sobre la amplitud de las eEPSCs en condiciones control (círculos) y en rodajas tratadas con filantotoxina (cuadrados). (B) Cuantificación de la modulación observada en (A). El número de rodajas (de dos a tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0,01$ , prueba t de Student).

Se determinó si el  $\text{Ca}^{2+}$  también puede proceder de las reservas intracelulares usando thapsigargina para inhibir la bomba SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases) responsable de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. El tratamiento con tapsigargina ( $2 \mu\text{M}$ ) eliminó el efecto facilitador de KA  $3 \mu\text{M}$  ( $77 \pm 5 \%$ ,  $n = 6$ , con tapsigargina frente a  $138 \pm 13 \%$ ,  $n = 8$ , sin tapsigargina Figura 26A, B). Estos datos demuestran la necesidad de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la modulación mediada por KA. Para determinar si el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se libera por acción del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que entra a través de KAR, se investigó el efecto de KA en rodajas tratadas con rianodina, que inhibe la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge, 1998).

El tratamiento con rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ) eliminó la facilitación de la transmisión mediada por receptores de kainato en estas sinapsis FP-CPu ( $82 \pm 4 \%$ ,  $n = 7$ , con rianodina frente a  $138 \pm 13 \%$ ,  $n = 7$ , sin rianodina, Figura 26B). Tomados en conjunto, los resultados anteriores indican que los KAR presinápticos en las sinapsis FP-CPu son permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , y que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los mismos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadena la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  desde las reservas intraterminales de  $\text{Ca}^{2+}$  para producir la facilitación sináptica observada.

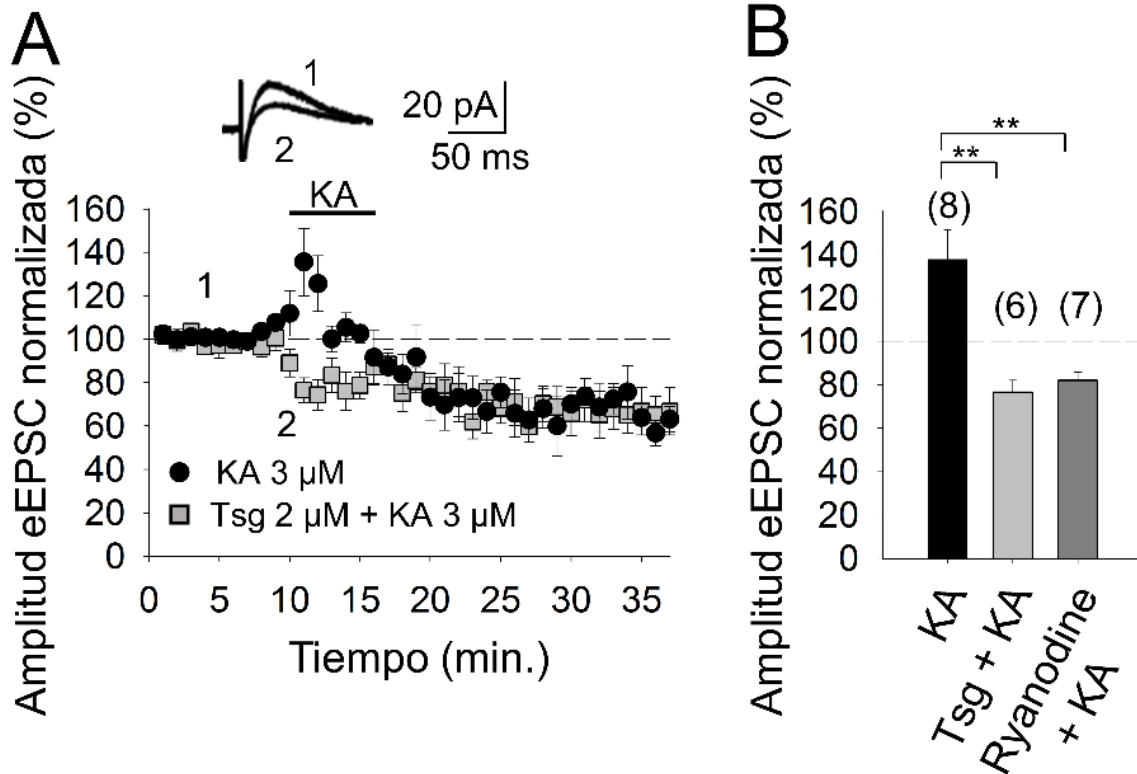


Figura 26: La facilitación de la liberación de glutamato mediada por KARs requiere de un aumento de  $Ca^{2+}$  en el citosol (A) Evolución temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSC en rodajas control (círculos) y en rodajas tratadas con tapsigargina (cuadrados). (B) En rodajas tratadas con thapsigargina o rianodina, se previene el aumento de la amplitud de las eEPSCs mediado por KA. El número de rodajas (de dos a tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , ANOVA).

#### **4.1.1.6. LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO (KARS) REQUIERE $Ca^{2+}$ -CALMODULINA EN LAS SINAPSIS PF-PuC**

A partir de los datos anteriores es evidente que una entrada de  $Ca^{2+}$  a través de KAR es obligatoria para la mediación de la facilitación invocada por KA. Dado que, en el hipocampo y la corteza, donde previamente se examinó la modulación mediada por KAR, se demostró que la activación de un complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina es obligatoria para la activación de AC (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), se examinó esta vía reguladora en la sinapsis cerebelosa PF-PuC mediante el tratamiento de rodajas con el antagonista de la calmodulina, W-7. Con W-7 (25  $\mu$ M) presente, la facilitación mediada por KA (3  $\mu$ M) se bloqueó ( $86 \pm 3$  %,  $n = 6$ , con W-7 frente a  $136 \pm 13$  %,  $n = 8$  sin W7, Figura 27A, B).

La corroboración de la dependencia de calmodulina también fue evidente a partir de experimentos realizados en presencia de calmidazolium (CMZ, 1  $\mu$ M), un bloqueante alternativo de calmodulina. Al igual que con W-7, en presencia de CMZ, se anuló la facilitación de la transmisión sináptica mediada por KA (3  $\mu$ M) ( $78 \pm 11$ ,  $n = 6$ , Figura 27B).

Estos indican el postulado de que un complejo presináptico  $Ca^{2+}$ -calmodulina es necesario para la regulación sináptica mediada por KARs.

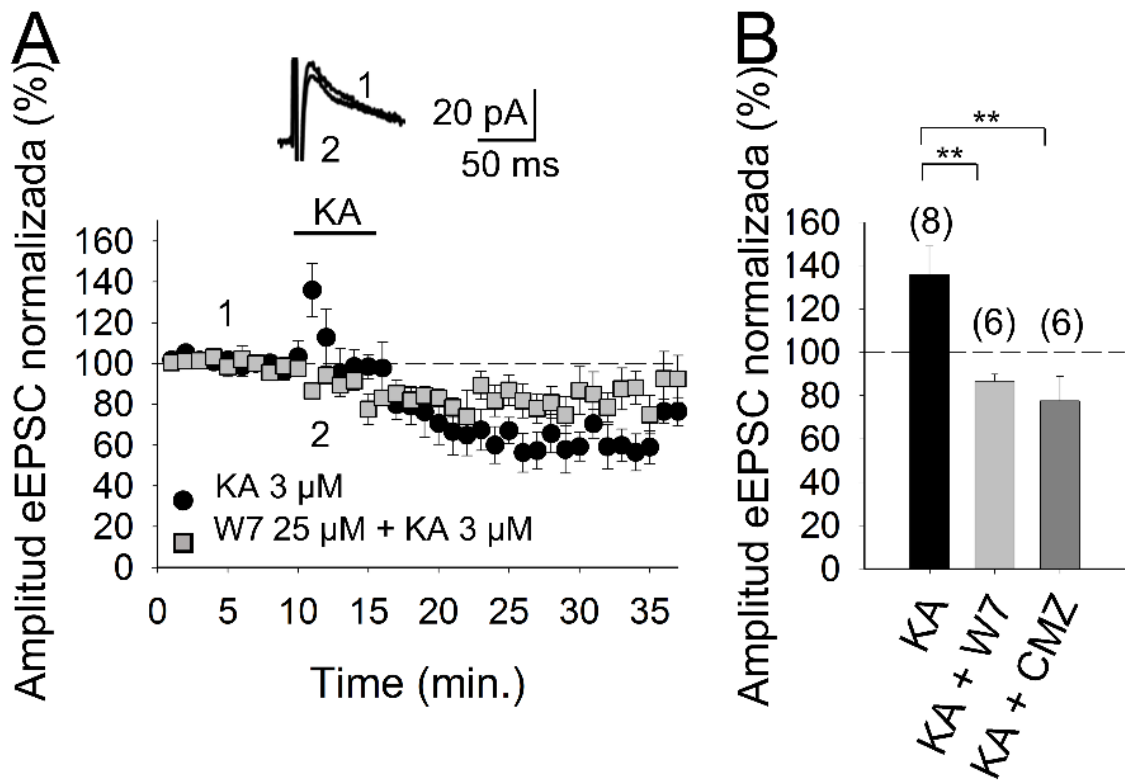


Figura 27: La facilitación de la liberación de glutamato mediada por KARs requiere de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina en las sinapsis FP-CPu. (A) Evolución temporal del efecto KA (3  $\mu\text{M}$ ) sobre la amplitud de las eEPSCs en condiciones control (círculos) y en rodajas tratadas con 25  $\mu\text{M}$  W-7 (cuadrados). (B) Cuantificación de la modulación observada en (A) y en presencia de CMZ 1  $\mu\text{M}$ . El número de rodajas (de dos a tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , prueba ANOVA).

## **4.1.2. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC DE CEREBELO DE RATÓN**

### **4.1.2.1 LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO POR 3 $\mu$ M KA PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA AMPLITUD DE LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EVOCADAS DE NMDA EN LAS SINAPSIS ENTRE FIBRAS PARALELAS Y CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DEL CEREBELO DE RATÓN**

Se estimularon axones de fibras paralelas mientras se registraron eEPSC mediados por NMDAR utilizando la técnica *patch clamp* en configuración de célula completa, con el potencial de membrana fijado a +40 mV. Los registros se realizaron en presencia de 30  $\mu$ M GYKI53655, para obviar la activación del receptor de AMPA, así como la presencia de los receptores GABA<sub>A</sub> con bicuculina (10 $\mu$ M). En presencia de GYKI53655, las corrientes AMPA fueron completamente bloqueadas desde 80  $\pm$ 7 pA en control hasta 3  $\pm$ 2 pA en presencia de 30  $\mu$ M GYKI53655, n = 6).

En presencia de bicuculina, las corrientes de GABA se bloquearon por completo (desde 130  $\pm$ 12 pA en control a 4  $\pm$  3 pA en presencia de bicuculina 10  $\mu$ M, n = 6). En presencia de GYKI53655 y bicuculina, la adición de 50 M D-AP5 bloqueó completamente la corriente restante indicando eso era una corriente NMDA (de 60  $\pm$ 8 pA en control a 4  $\pm$ 3 pA en presencia de 50  $\mu$ M D-AP5, n = 6).

Las sinapsis de ratones de 2-4 semanas mostraron una depresión de las amplitudes de los eEPSC mediadas por el receptor de tipo NMDA cuando se aplicó 3  $\mu$ M KA (61  $\pm$ 7 %, n = 8, Figura 28A,B), concentraciones de 0.3 y 1  $\mu$ M de KA tienen efectos de menor magnitud (75  $\pm$ 6 %, n = 6, 73  $\pm$ 9%, n = 6, respectivamente).

Para analizar el mecanismo de la depresión de la transmisión glutamatérgica mediada por la activación de KARs, se utilizó una concentración de 3  $\mu$ M de KA en los experimentos electrofisiológicos posteriores, ya que 3  $\mu$ M KA produjo el nivel máximo de depresión observable.

Para determinar si el efecto de KA observado está mediado por la activación de KAR, análogo a lo observado en otras regiones del cerebro, como el hipocampo y corteza, se realizaron experimentos en presencia de NBQX 10 $\mu$ M. Mostramos que la depresión en la amplitud del eEPSC por la aplicación de KA (3  $\mu$ M) fue abolido en presencia de NBQX (95  $\pm$ 3%, n = 6, Figura 28A,B).

En estos experimentos, debido a que los receptores AMPA fueron previamente bloqueados en presencia de GYKI53655 en el baño, la aplicación de NBQX que impide la depresión de las eEPSC demuestra que la modulación se debe específicamente a los KARs.

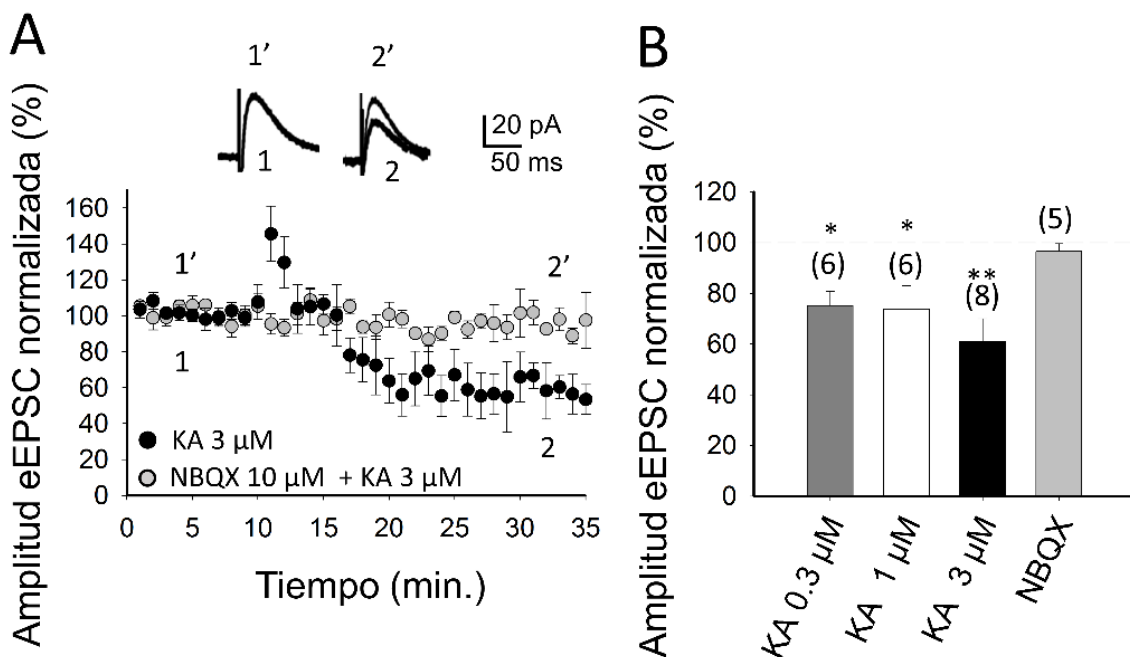


Figura 28: Curva dosis-respuesta del efecto de KA sobre las eEPSCs (A) El gráfico muestra el curso temporal del efecto de KA (0,3, 1 y 3  $\mu$ M) sobre la amplitud de las eEPSCs en ausencia (gris oscuro, blanco y negro) y presencia de NBQX. Se muestran trazas antes y después del tratamiento con KA 3  $\mu$ M en ausencia (1, 2) en presencia de NBQX 10  $\mu$ M (1', 2'). (B) Cuantificación de la modulación y la dependencia de la dosis del efecto KA en la amplitud de las eEPSCs y en ausencia y presencia de NBQX. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\*p < 0.01, prueba ANOVA)

#### **4.1.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARS EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO ES PRESINÁPTICO**

Se realizaron registros de pares de pulsos y se midió el ratio que existe entre ambos pulsos (se observó depresión de los pares de pulsos con un intervalo de 40 ms entre uno y otro). El ratio de pares de pulsos fue de  $1.9 \pm 0.4$  ( $n = 9$ ) en condiciones control. Después del tratamiento con KA, el ratio de pares de pulso disminuyó a  $0.7 \pm 0.3$  ( $n = 9$ ); lo que implica un efecto sobre la probabilidad de liberación (Manabe et al., 1993), lo que corrobora el origen presináptico de la regulación mediada por el receptor de KA.

En segundo lugar, se determinó la proporción del número de fallos de liberación sinápticos en presencia de KA. Bajo condiciones de control, la tasa de fallos sinápticos fue de  $19 \pm 4$  %,  $n = 5$ . Tras la aplicación de KA, la tasa de fallos disminuyó considerablemente (a  $7 \pm 3$  %,  $n = 5$ ), lo que nuevamente sugiere un locus presináptico para KA.

Finalmente, se comparó la modulación mediada por KA de las eEPSC mediadas por el receptor NMDA (con GYKI5365 presente) y eEPSC mediadas por AMPAR registradas a -70 mV (sin GYKI53655, pero con D-AP5 y bicuculina, para bloquear respectivamente los receptores NMDA y GABA<sub>A</sub>). KA medió una disminución comparable en las eEPSC mediadas por el receptor NMDA (67.5 %,  $n = 6$ ) y las eEPSC mediadas por el receptor AMPA (71.2%,  $n = 5$ , Figura 29A). Esta depresión similar de eEPSC mediada por los receptores de tipo NMDA y AMPA indica que la modulación KA se produce presinápticamente, a través de la disminución de la liberación de glutamato.

En conjunto, la estos datos sugieren un lugar de acción presináptico para KA en la modulación observada.



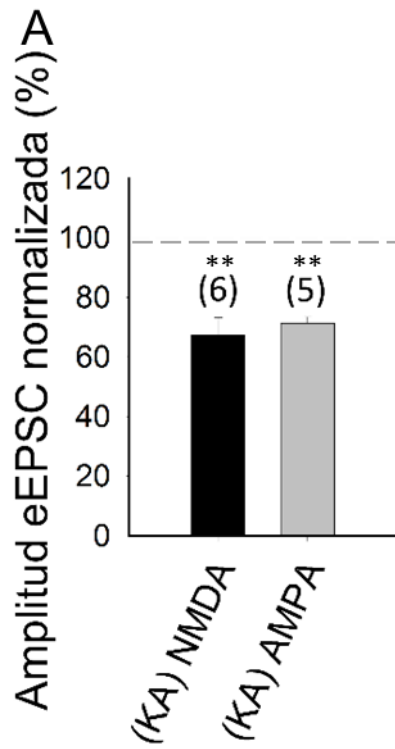


Figura 29: Efecto de KA (3  $\mu$ M) sobre las eEPSCs mediadas por NMDAR y las eEPSCs mediadas por AMPAR. El número de rodajas (de dos o tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (\*\*  $p < 0,01$ , t de Student).

#### **4.1.2.3. LA DEPRESIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA MEDIADA POR KAR EN LA SINAPSI PF-PuC DEPENDE DE LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE CAMP**

Con la selectividad de la acción de KA y el lugar de acción verificados, en experimentos posteriores se examinó el sistema de segundos mensajeros que media la depresión la transmisión sináptica. Primero, se determinó si la PKA estaba involucrada en la disminución de las eEPSC, al inhibir la actividad moduladora o catalítica de la quinasa, usando cAMP-Rp o H-89. Con la adición de 2  $\mu\text{M}$  H-89 o 100  $\mu\text{M}$  cAMP-Rp, se evitó la depresión de la amplitud de las eEPSC por 3  $\mu\text{M}$  KA ( $93 \pm 5 \%$ ,  $n = 7$  después de H-89 y  $91 \pm 8 \%$ ,  $n = 7$  después de cAMP-Rp, frente a KA 3  $\mu\text{M}$ ,  $60 \pm 7 \%$ , después de un aumento transitorio de eEPSC a  $126 \pm 5 \%$  de la amplitud inicial,  $n = 14$  Figura 30A,B). Los datos apuntan a que la PKA juega un papel obligatorio en la modulación de la transmisión glutamatérgica mediada por KAR en cerebelo (PF-PuC). Sin embargo, dado que en otras preparaciones de rodajas, la proteína quinasa C (PKC) también se ha implicado en aspectos de la modulación mediada por KAR (Rodríguez-Moreno y Sihra 2007a,b; Negete-Díaz et al 2018), se examinó si esta quinasa juega un papel en la modulación de la sinapsis PF-PuC. Se utilizó calfostina C (1  $\mu\text{M}$ ) para inhibir específicamente la PKC, que no previno la depresión mediada por KAR ( $64 \pm 9 \%$ ,  $n = 6$ , Figura 30B), por lo que se descarta la participación de la PKC en la modulación observada.

Los mecanismos que median la facilitación mediada por KAR de la liberación de glutamato implican la activación de calcio-calmodulina de AC. Se determinó si para la depresión de la transmisión opera el mismo mecanismo. Se examinó en la sinapsis PF-PuC al tratar rodajas con el antagonista de calmodulina, W-7. En presencia de W-7 (25  $\mu\text{M}$ ), la depresión mediada por KA (3  $\mu\text{M}$ ) no se vio afectada ( $75 \pm 7 \%$ ,  $n = 6$ , con W-7 frente a  $60 \pm 7 \%$ ,  $n = 8$  sin W7, Figura 30B). Adicionalmente, se realizaron experimentos en presencia de calmidazodiuim (CMZ, 1  $\mu\text{M}$ ), un antagonista alternativo de la calmodulina. Al igual que con W-7, en presencia de CMZ, la depresión de la transmisión sináptica mediada por KA (3  $\mu\text{M}$ ) no se anuló ( $52 \pm 10$ ,  $n = 6$ , Figura 30B). Estos datos muestran que un complejo presináptico  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina no es necesario para la depresión mediada por KAR de la liberación de glutamato en las sinapsis PF-PuC.

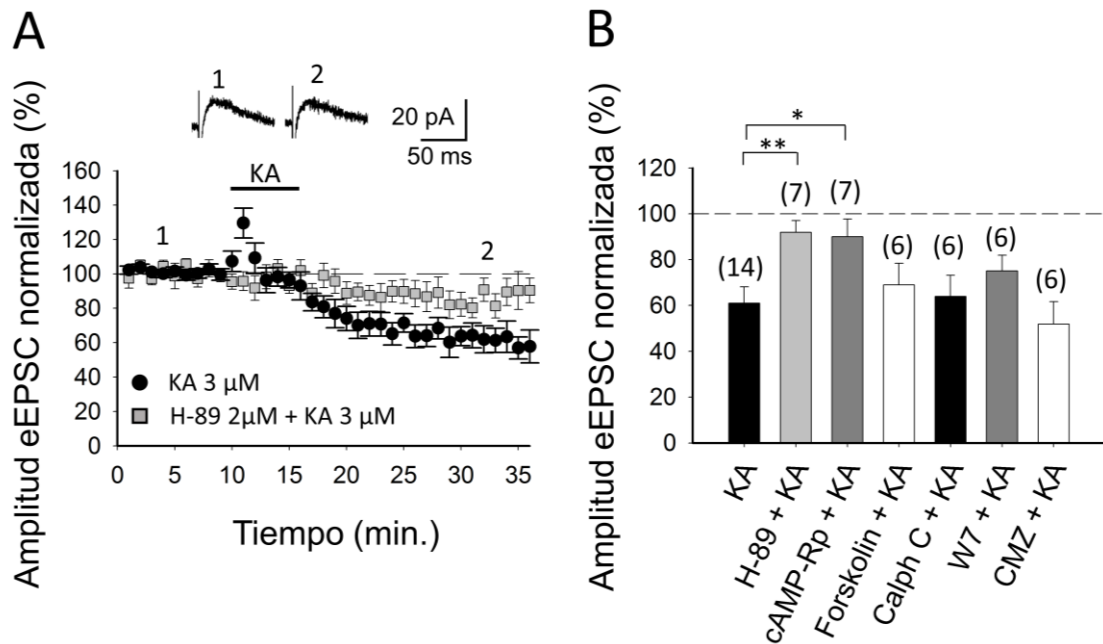


Figura 30: La adenilato ciclasa (AC) y la proteína quinasa A (PKA) son necesarias para la depresión mediada por KA de la liberación de glutamato en las sinapsis PF-PuC. (A) Curso temporal del efecto de KA en la amplitud de las eEPSC en rodajas control y tratadas con H-89. Trazas representativas que muestran que KA (3  $\mu$ M) no disminuye la amplitud de las eEPSC en rodajas tratadas con H-89. (B) Resumen de resultados. El bloqueo de PKA por H-89 (2  $\mu$ M) o cAMP-Rp (100  $\mu$ M) impidió la depresión de la transmisión por acción de KA. El bloqueo de la proteína quinasa C (PKC) con calfofostina C (1  $\mu$ M) no tuvo efecto sobre la disminución de la amplitud de eEPSC mediada por KA. Se observó una depresión en la amplitud de la eEPSC similar entre las rodajas no tratadas y las tratadas con W-7 25  $\mu$ M o CMZ 1  $\mu$ M. El número de rodajas (de dos a tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , prueba ANOVA).

#### 4.2.1.4. LA DEPRESIÓN DE LA AMPLITUD EN LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EVOCADAS DE NMDA MEDIADA POR KAR REQUIERE PROTEÍNA G EN LAS SINAPSIS PF-PuC

Se examinó el efecto de KA en rodajas tratadas con toxina Pertusica (PTx, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se observó que el efecto inducido de KA fué suprimido por PTx, lo que implica la participación de la proteína G en la modulación inhibitoria de los KAR ( $102 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; vs. control  $62 \pm 9\%$ , Figura 31A,B).

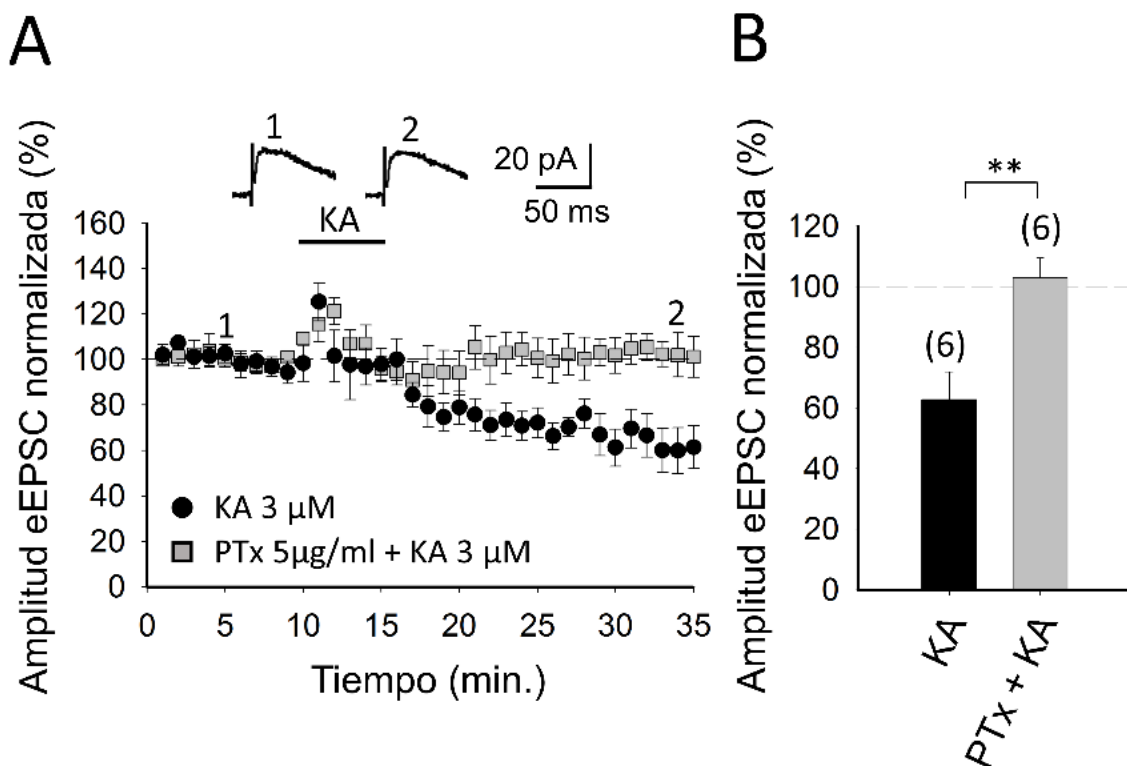


Figura 31: La depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR se previene en rodajas tratadas con toxina pertusica. (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSC en rodajas control y en rodajas tratadas con toxina pertusica. Las trazas representativas que muestran que KA (3  $\mu\text{M}$ ) no afecta a la amplitud de las eEPSC en rodajas tratadas con toxina pertusica. (B) Resumen de resultados. El número de rodajas (de dos a tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\*  $p < 0.01$ , t de Student).

#### **4.2.1.5. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LAS SINAPSIS PF-PuC NO ESTÁ MEDIADA POR KAR PERMEABLE AL CALCIO Y NO REQUIERE LA LIBERACIÓN DE CALCIO DE LAS RESERVAS INTRACELULARES**

Al igual que para el caso del aumento de la liberación de glutamato por KA, para determinar si para la inhibición se requiere  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se investigó el efecto de la rianodina, que inhibe selectivamente la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge, 1998). El tratamiento con rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ) no tuvo efecto sobre la depresión de la transmisión sináptica mediada por KAR en estas sinapsis FP-CP ( $69 \pm 9 \%$ ,  $n = 7$ , con rianodina frente a  $62 \pm 7 \%$ ,  $n = 6$ , sin rianodina, Figura 32A,B). En segundo lugar, para establecer si la activación de KAR requiere la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, se examinó el efecto de KA después del agotamiento de las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, utilizando thapsigargina para inhibir la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la bomba SERCA. El tratamiento con thapsigargina ( $2 \mu\text{M}$ ) no afectó a la depresión mediada por los KAR ( $68 \pm 9 \%$ ,  $n = 6$ , con thapsigargina frente a  $62 \pm 7 \%$ ,  $n = 6$ , sin thapsigargina, Figura 32B).

Por último, para corroborar los resultados anteriores y descartar que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  KAR permeable desempeñe algún papel en el mecanismo dependiente de KA en estas sinapsis, investigamos el efecto de KA en las amplitudes de eEPSC en presencia de filantotoxina, bloquea los KAR permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  (Fledcher y Lodge, 1996; Scott et al, 2008). Después del tratamiento de las rodajas con filantotoxina  $3 \mu\text{M}$ , no se evitó la depresión sináptica mediada por KA  $3 \mu\text{M}$  (a  $56 \pm 11 \%$  de la amplitud inicial,  $n = 7$  frente a  $62 \pm 7 \%$ ,  $n = 6$  Figura 32B).

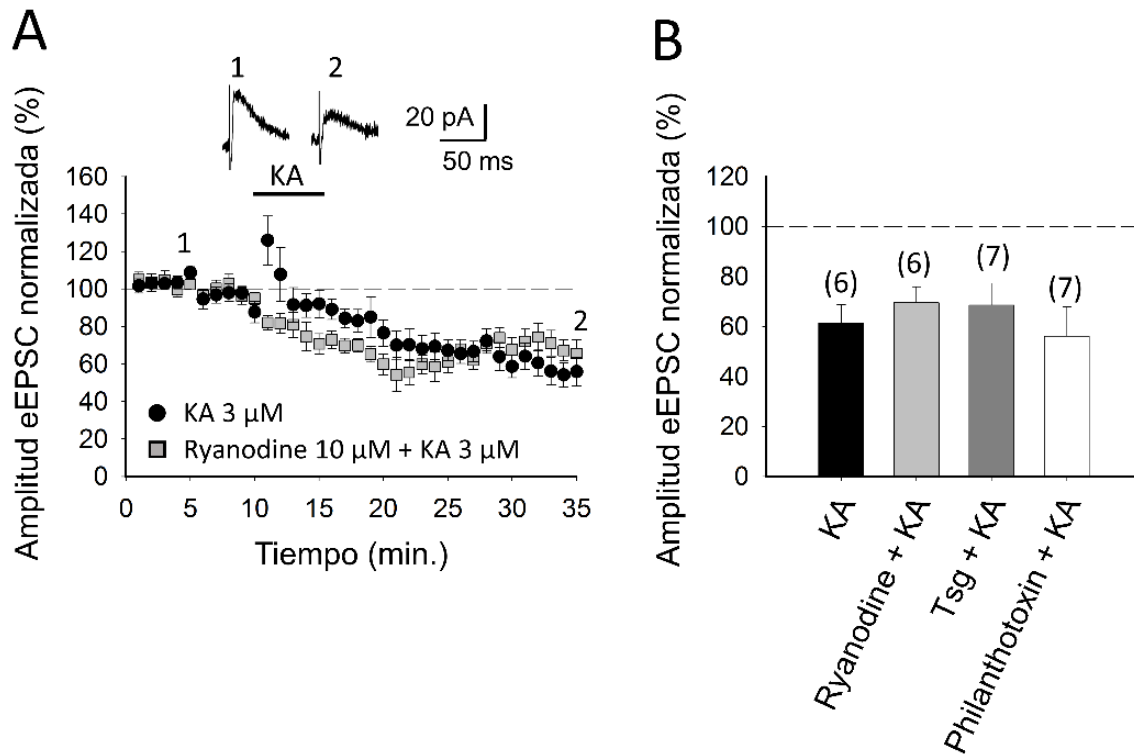


Figura 32. La depresión de la liberación mediada por KARs no requiere cambios en  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol. (A) Curso temporal del efecto de KA (3  $\mu\text{M}$ ) sobre la amplitud de las eEPSCs en condiciones control (círculos) y en rodajas tratadas con rianodina (cuadrados). (B) Cuantificación de resultados en rodajas tratadas con rianodina, tpsigarguina y filantotoxina. La disminución de amplitudes de las eEPSC mediadas por por KA no se previene en ningún caso. El número de rodajas (de dos a tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (t de Student y ANOVA).

### **4.1.3. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) DEL HIPOCAMPO DE RATÓN**

#### **4.1.3.1. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES SCHAFER Y LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA2 (SC-CA2) DEL HIPOCAMPO DE RATÓN**

En el hipocampo, la transmisión glutamatérgica en las sinapsis SC-CA1 se ve deprimida por la activación de los KAR, mientras que estos receptores median un efecto bifásico sobre la liberación de glutamato en las sinapsis fibras musgosas-CA3 (FM-CA3). Para estudiar la acción de KA sobre la liberación de glutamato en las sinapsis SC-CA2 del hipocampo de ratón. Se estimularon las colaterales de Schaffer y se registran las eEPSC mediadas por NMDARs en células piramidales de la región CA2 del hipocampo, utilizando la técnica de patch clamp en configuración de célula completa, con el potencial de membrana mantenido en +40 mV. Las células principales de CA2 se identificaron por su ubicación en el hipocampo y sus distintas propiedades electrofisiológicas intrínsecas (Chevalleyre y Siegelbaum, 2010; Sun et al., 2014). Así, en comparación con CA1, las neuronas piramidales CA2 disparan potenciales de acción a menor frecuencia y tienen una resistencia de entrada más baja (CA1 =  $102 \pm 12 \text{ M}\Omega$ ; CA2 =  $73 \pm 14 \text{ M}\Omega$ ) (Figura 33A).

A continuación, se caracterizaron electrofisiológicamente las células de CA2 y se compararon con las de CA1. En primer lugar, se realizaron curvas de entrada/salida en ambos tipos celulares (Figura 30B). El potencial de células de CA2 ( $-76.7 \pm 0.1 \text{ mV}$ ) es más negativo que el de las neuronas piramidales CA1 ( $-67.2 \pm 1.1 \text{ mV}$ ). Los registros se realizaron en presencia de GYKI53655  $30 \mu\text{M}$ , para evitar la activación de los receptores de AMPA, y picrotoxina o gabazina  $10 \mu\text{M}$ , para antagonizar los receptores GABA<sub>A</sub>. En

estas condiciones experimentales, se observó una depresión de las amplitudes de las eEPSCs mediadas por NMDAR cuando se aplicaron diferentes concentraciones de KA (20 nM:  $86 \pm 6$  %, n = 6; 100 nM:  $71 \pm 9$  %, n = 5; 1  $\mu$ M:  $66 \pm 4$  %, n = 6; 3  $\mu$ M:  $44 \pm 7$  %, n = 6; 10  $\mu$ M:  $44 \pm 8$  %, n = 5; Figura 33C,D).

A diferencia de lo observado en MF-CA3 y similar a lo observado en las sinapsis SC-CA1, ninguna de las concentraciones utilizadas produjo un aumento de amplitud de las eEPSCc como se puede observar en la curva dosis-respuesta que se muestra en la Figura 33D. Se utilizó KA 3  $\mu$ M en experimentos posteriores ya que KA 3  $\mu$ M produjo el nivel máximo de depresión observado sobre EPSCs.

Para determinar si el efecto de KA estaba mediado por la activación de KAR, se realizaron experimentos en presencia de NBQX. Se descubrió que el efecto de KA de 3  $\mu$ M en la amplitud de eEPSC se suprime en presencia de NBQX de 10  $\mu$ M ( $95 \pm 4$ %, n = 6, Figura 33C,D). En estos experimentos, como los receptores de tipo AMPA fueron previamente antagonizados por GYKI53655 en el baño, el bloqueo del efecto de KA en presencia de NBQX indica que la depresión observada se debió a la activación selectiva y específica de los KAR.



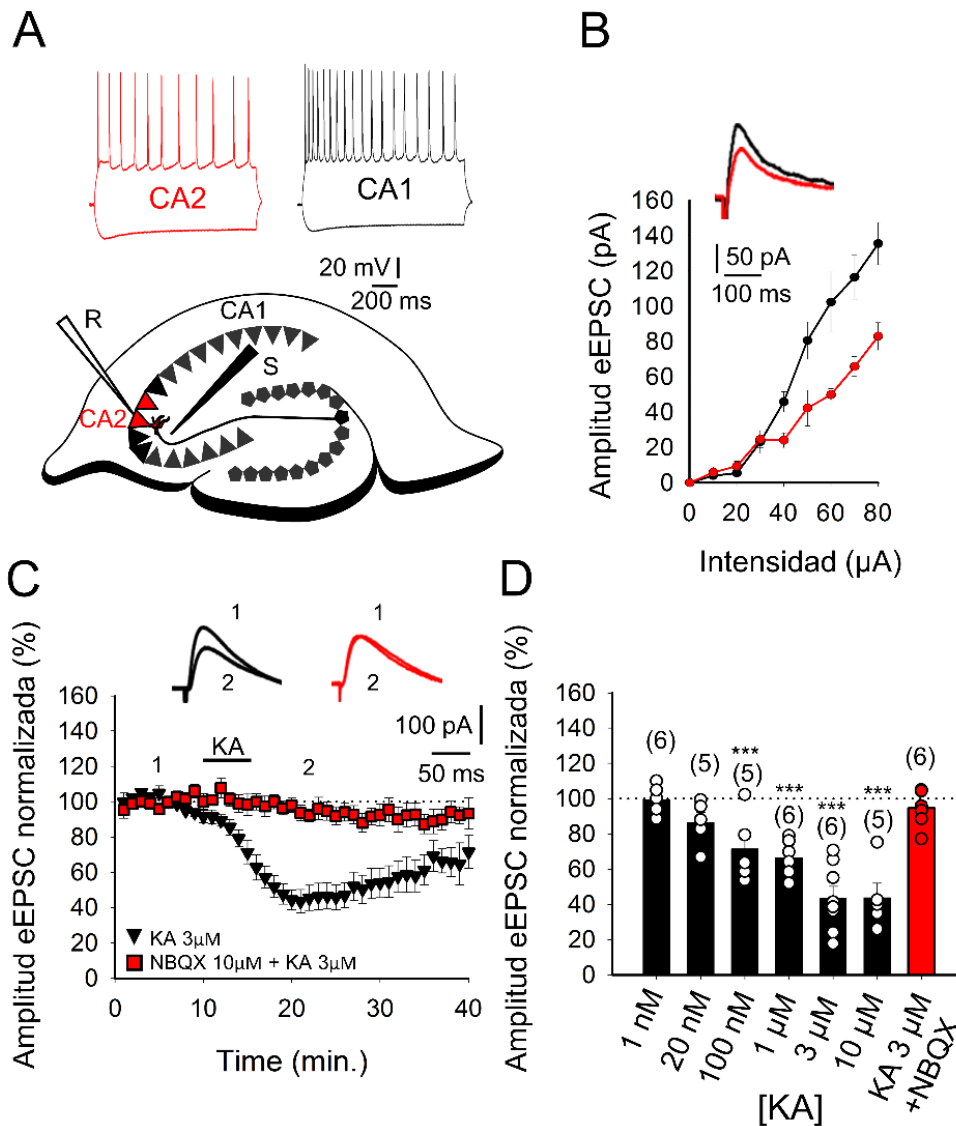


Figura 33: Kainato (KA) reduce la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras evocadas (eEPSC) en Schaffer-cornu ammonis 2 (CA2). (A) Esquema que muestra la configuración experimental general: R, electrodo de registro; S electrodo de estimulación. Los triángulos representan neuronas piramidales, que son rojos para CA2. (B) Curva que muestra amplitudes de EPSCs en función de la intensidad del estímulo aplicado, la amplitud de las sinapsis SC-CA2 (rojo) y las sinapsis SC-CA1 (negro). (C) Curso temporal del efecto KA (3 µM) sobre la amplitud de las eEPSCs en ausencia (negro) y presencia de NBQX (rojo). Se muestran trazas antes (1) y después (2) del tratamiento con KA, en ausencia (negro) y en presencia de NBQX 10 µM (rojo). (D) Curva dosis-respuesta de KA sobre la amplitud de las eEPSCs. El número de rodajas (de tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\*\*)  $p < 0.001$ , prueba ANOVA).

#### **4.1.3.2. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARs QUE MEDIAN DISMINUCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES SCHAFER Y LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) ES PRESINÁPTICO**

Para determinar el lugar de acción de los KAR, primero, se realizaron registros de pulsos pareados. El ratio de facilitación de pulsos fue de  $1.2 \pm 0.11$  ( $n = 8$ ) en condiciones de control. Después del tratamiento con KA, aumentó a  $1.6 \pm 0.16$  ( $n = 8$ ), lo que indica un efecto sobre la probabilidad de liberación (Manabe et al., 1993), lo que sugiere una acción presináptica de KA para deprimir la liberación de glutamato (Figura 31A). Se estudió el ratio de facilitación de pulsos en corrientes mediadas por receptores de tipo AMPA, eEPSC mediadas por el receptor AMPA registradas a  $-70$  mV (sin GYKI53655, pero con D-AP5 y picrotoxina, para, respectivamente, bloquea los receptores de tipo NMDA y GABA<sub>A</sub>). Se utilizó KA a una concentración baja ( $0,3 \mu\text{M}$ ) que activa los KARs pero no los receptores de AMPA. En esta condición experimental, KA produjo una disminución de la amplitud de las eEPSCs ( $64 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ ) y un aumento en el ratio de facilitación de pulsos ( $1.29 \pm 0.3$   $n = 5$ ) en condiciones de control. El tratamiento con KA, ( $1,43 \pm 0,05$ ,  $n = 5$ , Figura34A) sugiriendo un locus de acción presináptico para los KARs.

Adicionalmente se realizó un análisis del coeficiente de variación (CV) de las respuestas sinápticas antes y después de la aplicación de KA. Se graficó  $1/\text{CV}^{-2}$  versus la media de la amplitud del evocado (M) (la amplitud de los eEPSCs (M) antes y después de la aplicación de KA). Los resultados mostraron puntos principalmente debajo de la línea diagonal consistentes con un posible mecanismo presináptico para la modulación observada. (Figura 34B), Brock et al., 2020)

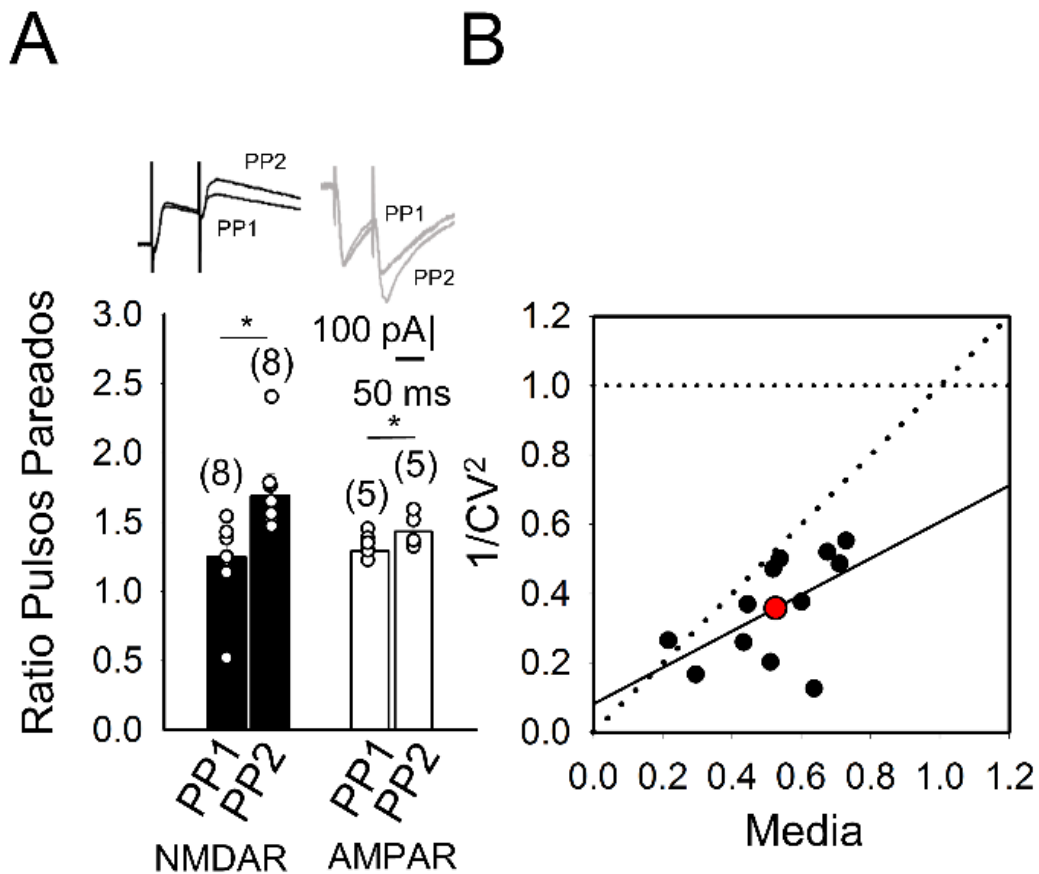


Figura 34: El mecanismo de acción de la depresión en la liberación de glutamato mediado por la activación de KARs es presináptico (A) La acción de KA muestra un aumento en la relación de pulsos pareados de corrientes mediadas por receptores de tipo NMDA y AMPA. Se muestran trazas escaladas (B) La gráfica normalizada de  $CV^2$  frente a la amplitud media de EPSC muestra los datos representados por puntos principalmente debajo de la diagonal tras la aplicación de KA. El número de rodajas (de tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , prueba t de student).

Finalmente, se registraron y analizaron respuestas en miniatura (mEPSC) en la presencia de 500 nM TTX, antes y después de la adición de KA. En esta condición experimental, se encontró que después de la aplicación de KA, la frecuencia de mEPSC disminuyó (línea base  $1.13 \pm 0.13$  Hz,  $n = 7$ ; después de KA  $0.70 \pm 0.16$  Hz,  $n = 8$ , Figura 35A) sin efecto en la amplitud de mEPSC (línea de base  $18.5 \pm 1$  pA,  $n = 7$ ; después de KA  $18.8 \pm 1.3$  pA,  $n = 6$ , Figura 35A). indicando de nuevo un locus presináptico para KA. Estos resultados indican que la disminución en la amplitud de las eEPSC se debe a una disminución en la liberación de glutamato mediada por la activación de los KAR presinápticos.

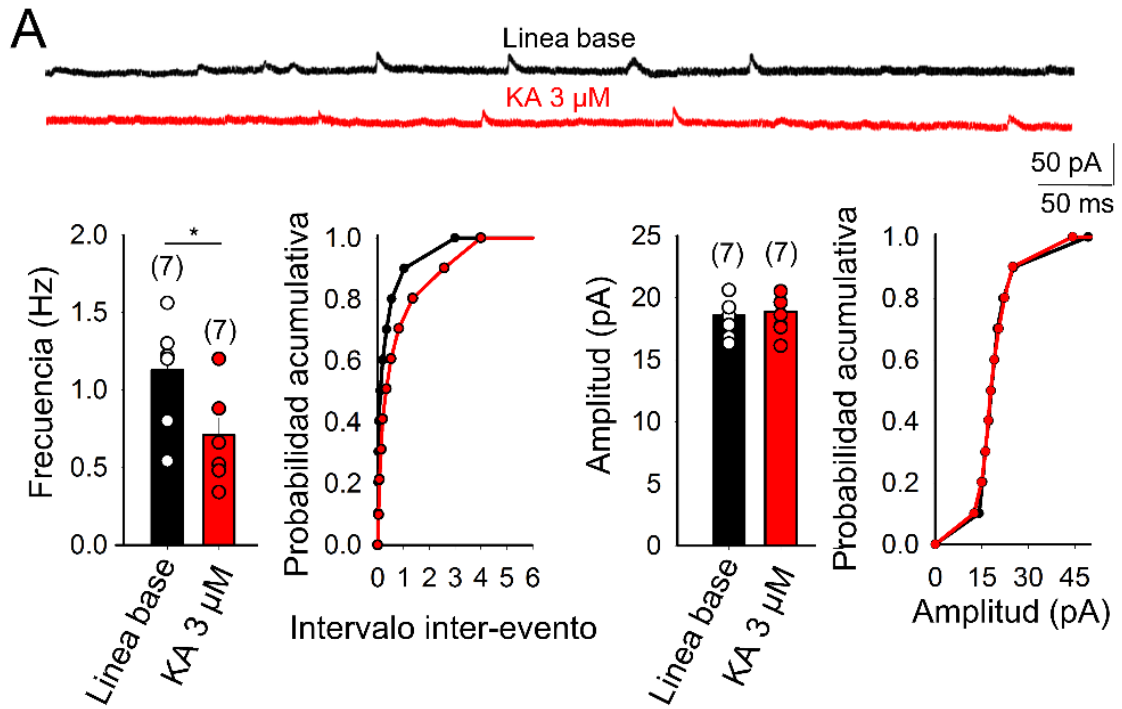


Figura 35: La activación de KARs provoca una disminución en la frecuencia de EPSCs miniatura (mEPSCs) (A) Se muestran mEPSCs monitorizados en presencia de TTX (500 nM) durante la línea base y después de aplicar KA (3  $\mu$ M). Los histogramas y las curvas acumulativas muestran que después de la aplicación de KA, la frecuencia de mEPSCs disminuye, mientras que la amplitud de mEPSCs permanece constante. El número de rodajas (de tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , t de student).

#### **4.1.3.3. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRESINÁPTICOS EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS COLATERALES SCHAFFER Y LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA2 (SC-CA2) MEDIAN LA DEPRESIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA A TRAVÉS DE LA RUTA ADENILATO CICLASA/ AMP CÍCLICO/ PROTEÍNA QUINASA A**

Se examinó la posible cascada intracelular que media la disminución observada en la liberación de glutamato por la activación de los KAR. Se determinó un posible papel de la proteína quinasa A (PKA) en la disminución de la liberación de glutamato observada por la activación de los KAR presinápticos. Para ello, primero se trataron rodajas con H-89 y Rp-cAMP, inhibidores de la PKA. En rodajas preincubadas con 2  $\mu$ M H-89 o 100  $\mu$ M Rp-cAMP, se eliminó el efecto depresor de 3  $\mu$ M KA ( $90 \pm 4$  %, n = 6 después de H-89 y  $92 \pm 4$  %, n = 7 después de Rp-cAMP, versus KA 3  $\mu$ M,  $49 \pm 9$  %, n = 8 en rodajas no tratadas, Figura 36A,B).

Estos resultados indican que la actividad de la PKA es necesaria para la depresión observada mediada por KAR de la transmisión glutamatérgica en la sinapsis SC-CA2. Como se ha indicado anteriormente se ha descrito que la proteína quinasa C (PKC) participa en la modulación de la liberación de neurotransmisores mediada por KAR en otras sinapsis (Rodríguez-Moreno & Sihra, 2007a,b; Negrete-Díaz et al., 2018), por lo que se investigó si esta la quinasa estaba involucrada en la disminución de la liberación de glutamato observada en las sinapsis SC-CA2. En rodajas preincubadas con el inhibidor de PKC calfofostina C (1  $\mu$ M), la depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR no se vio afectada ( $56 \pm 4$  %, n = 6 versus  $49 \pm 9$  %, n = 8 en rodajas no tratadas, Figura 36B), lo que indica que la PKC no está involucrada en esta depresión de la liberación de glutamato.

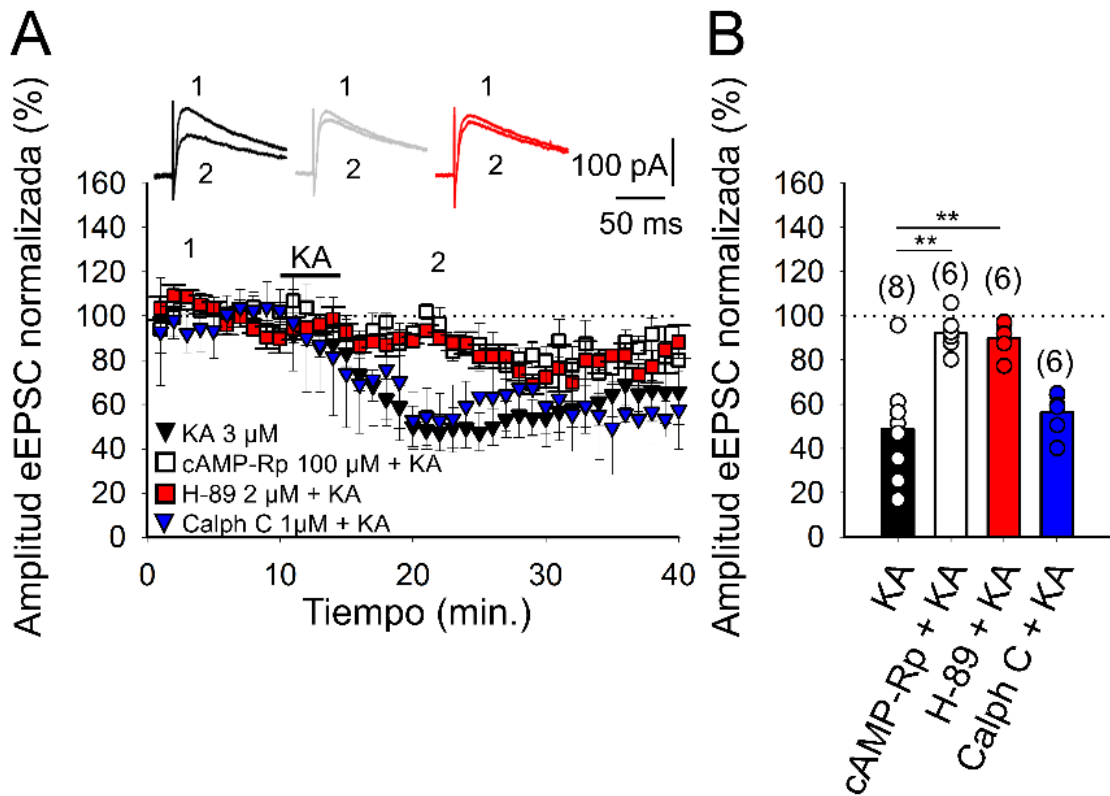


Figura 36: La adenilato ciclasa (AC) y la PKA participan en la disminución de la liberación de glutamato mediada por KAR en la sinapsis SC-CA2. (A) Curso temporal del efecto de las KA en la amplitud de eEPSCs control (negro) y de rodajas tratadas con Rp-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (blanco) o H-89 (rojas). Se muestran trazas antes (1) y después (2) del tratamiento con KA en ausencia (negro) y en presencia de Rp-cAMP (blanco) o H-89 (rojo). (b) Resumen de resultados. El bloqueo de PKA por cAMP-Rp (100  $\mu$ M) o H-89 (2  $\mu$ M) impidió la acción depresiva de KA. El bloqueo de proteína quinasa C (PKC) con calfofostina C (1  $\mu$ M) no tiene efecto sobre la disminución mediada por KAR. El número de rodajas (de tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , prueba ANOVA).

#### 4.1.3.4. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR KAR EN LA SINAPSI SC-CA2 REQUIERE LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS G

Los KARs tiene funciones metabotrópicas que involucran a las proteínas  $G_{i/o}$  en la modulación de la liberación de GABA (Rodríguez-Moreno y Lerma, 1998) y la liberación de glutamato en el hipocampo en las sinapsis SC-CA1 (Frerking et al., 2001) y FM-CA3 (NegreteDíaz et al., 2006) y en el cerebelo (ver Negrete-Díaz et al.,). Para determinar si la función de los KAR que modulan la liberación de glutamato en las sinapsis SC-CA2 requiere de proteínas  $G_{i/o}$ , se realizaron experimentos en rodajas preincubadas con toxina Pertusica (5  $\mu\text{g/ml}$ ). El efecto de disminución de la liberación de glutamato no estuvo presente al aplicar KA; lo que indica que se requiere una actividad de proteína  $G_{i/o}$  para disminuir la liberación de glutamato mediado por la activación de KARs ( $87 \pm 7 \%$ ,  $n = 6$ ; versus rodajas no tratadas  $50 \pm 10 \%$ ,  $n = 6$ , Figura 37A,B).

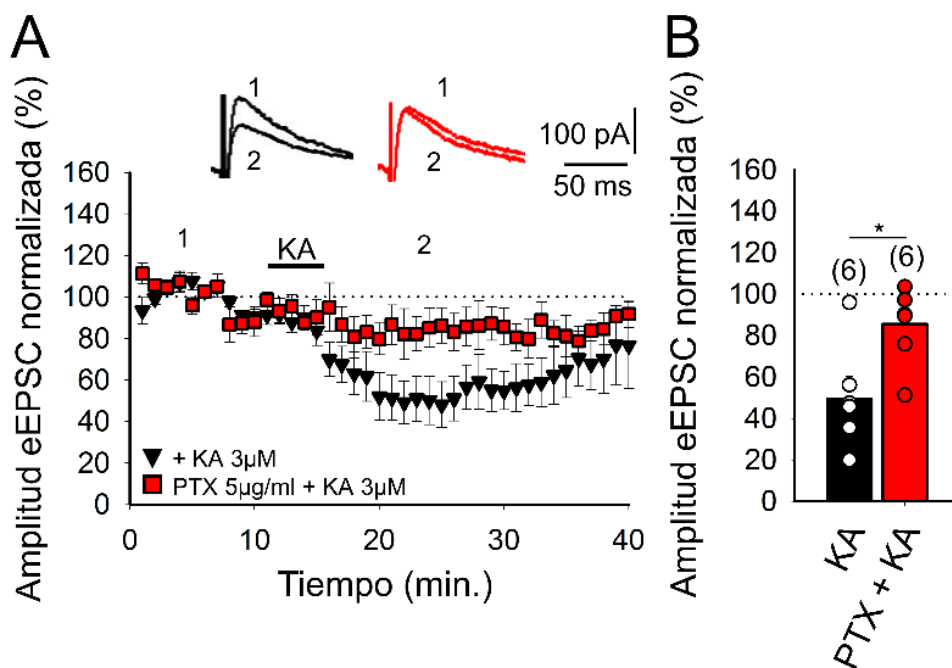


Figura 37: La depresión mediada por la actuación de KAR de la liberación de glutamato se previene en rodajas tratadas con toxina pertussica en las sinapsis SC-CA2. (A) Curso temporal del efecto de KA en la amplitud de eEPSC en rodajas control (negro) y en rodajas tratadas con toxina pertussica (rojo). Las trazas muestran que KA (3  $\mu\text{M}$ ) no afecta significativamente la amplitud de los eEPSC en rodajas tratadas con toxina pertussica. Se muestran los registros antes (1) y después (2) del tratamiento con KA en ausencia (negro) y en presencia de la toxina pertúsica (rojo). (B) Resumen de resultados. El número de rodajas (de tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$ , prueba t de Student)

#### **4.1.3.5. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO EN LA SINAPSI SC-CA2 NO REQUIERE CANALES DE TIPO L PERMEABLES AL CALCIO NI LIBERACIÓN DE CALCIO DE RESERVORIOS INTRACELULARES**

Se ha descrito previamente que la modulación de la transmisión sináptica mediada por KAR requiere  $\text{Ca}^{2+}$  de origen extracelular y/o intracelular (Kamiya & Ozawa, 1998, 2000; Kamiya et al., 2002; Scott et al., 2008; Lyon et al., 2011). Para determinar si se requiere  $\text{Ca}^{2+}$  en las sinapsis SC-CA2 para deprimir la liberación de glutamato, se estudió el efecto de la nimodipina, que bloquea selectivamente los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L. En esta condición experimental, no se evitó el efecto de KA ( $75 \pm 7$  %,  $n = 6$ , versus  $61 \pm 5$  %,  $n = 8$  en rodajas no tratadas, Figura 38A,B).

Posteriormente, se usó rianodina, que inhibe selectivamente la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge, 1998). La incubación previa de rodajas con rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ) no evitó la disminución de la liberación de glutamato mediada por KARs en las sinapsis SC-CA2 ( $62 \pm 7$  %,  $n = 6$ , con rianodina versus  $61 \pm 5$  %,  $n = 8$ , sin rianodina; Figura 35A,B). Finalmente, para determinar si la activación de KAR provoca un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular citoplasmático, se incubaron rodajas con tapsigargina ( $2 \mu\text{M}$ ). En esta condición experimental, la disminución de la liberación de glutamato mediada por KAR no se vio afectada ( $76 \pm 6$  %,  $n = 6$ , con tapsigargina versus  $61 \pm 5$  %,  $n = 8$ , sin tapsigargina, en rodajas no tratadas, Figura 38A,B).

Juntos, estos resultados indican que el  $\text{Ca}^{2+}$ , ya sea de origen extracelular o intracelular, no es necesario para la disminución observada en la liberación de glutamato en las sinapsis SC-CA2 del hipocampo mediada por la activación de KAR presináptico.



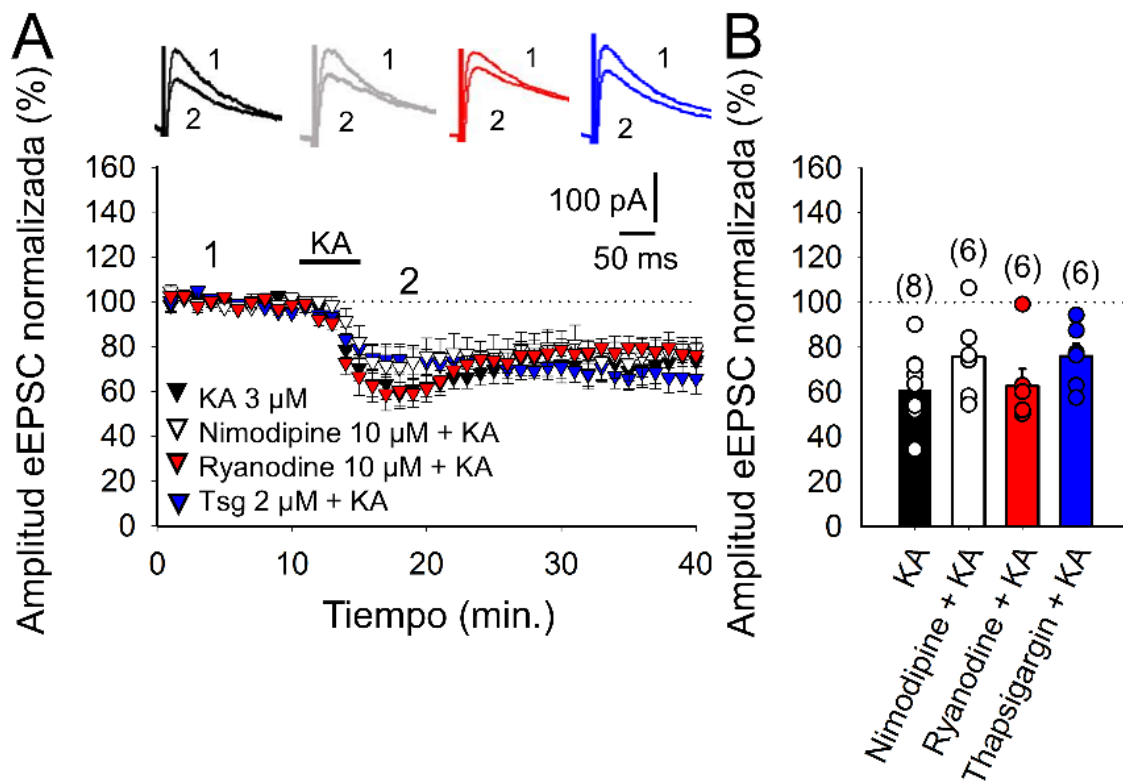


Figura 38: La disminución de la liberación de glutamato mediada por KAR no requiere la entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo L. (A) Curso temporal del efecto KA (3  $\mu$ M) sobre la amplitud de las eEPSCs en condiciones de control (negro) y en rodajas tratadas con nimodipina (blanco), rianodina (rojo) o thapsigargina (azul). Se muestran los registros antes (1) y después (2) de la aplicación de KA, en (negro) y en presencia de nimodipina (blanco), rianodina (rojo) o thapsigargina (azul). (B) Cuantificación de resultados en rodajas tratadas con thapsigargina, nimodipina y rianodina. La disminución de amplitudes de eEPSCs inducida por KA no se previene en ningún caso. El número de rodajas (de tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , prueba ANOVA).

#### **4.1.3.6. LOS KAR QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUK1 ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO OBSERVADA EN LA SINAPSI SC-CA2**

Los KAR que contienen la subunidad GluK1 se han involucrado en la modulación de la transmisión sináptica en la sinapsis SC-CA1 (Clarke & Collingridge, 2002; Partovi & Frerking, 2006; Sallert et al., 2007). Para determinar si los KAR que contienen la subunidad GluK1 participan en la depresión de la liberación observada en la sinapsis SC-CA2, se realizaron los experimentos en presencia de UBP-302 (20  $\mu$ M) para bloquear los KAR que contienen la subunidad GluK1. En estas condiciones experimentales, se obtuvo que el efecto depresivo de KA sobre la amplitud de las corrientes NMDAR estaba parcialmente bloqueado ( $54 \pm 6$  %, n = 8, control KA versus  $70 \pm 3$  %, n = 7, KA en presencia de UBP-302; Figura 39A,B).

Adicionalmente, en presencia de UBP-302, tanto la frecuencia como la amplitud de mEPSC no se vieron afectadas en presencia de KA (frecuencia, línea base:  $0.93 \pm 0.22$  Hz, n = 6; UBP-302 + KA:  $0.99 \pm 0.22$  Hz, n = 6 Amplitud, línea base:  $19.3 \pm 0.82$  pA, n = 6, UBP + KA:  $19 \pm 0.9$  pA, n = 6, Figura 39C). Estos resultados indican que el efecto depresivo de la activación de KAR sobre la amplitud de las corrientes de NMDA se debe en parte a KARs que contienen subunidades GluK1 (con KAR que contienen otras subunidades también involucradas). El efecto depresivo encontrado para KA sobre las respuestas en miniatura mediadas por NMDAR se debe específicamente a los KAR que contienen subunidades GluK1.

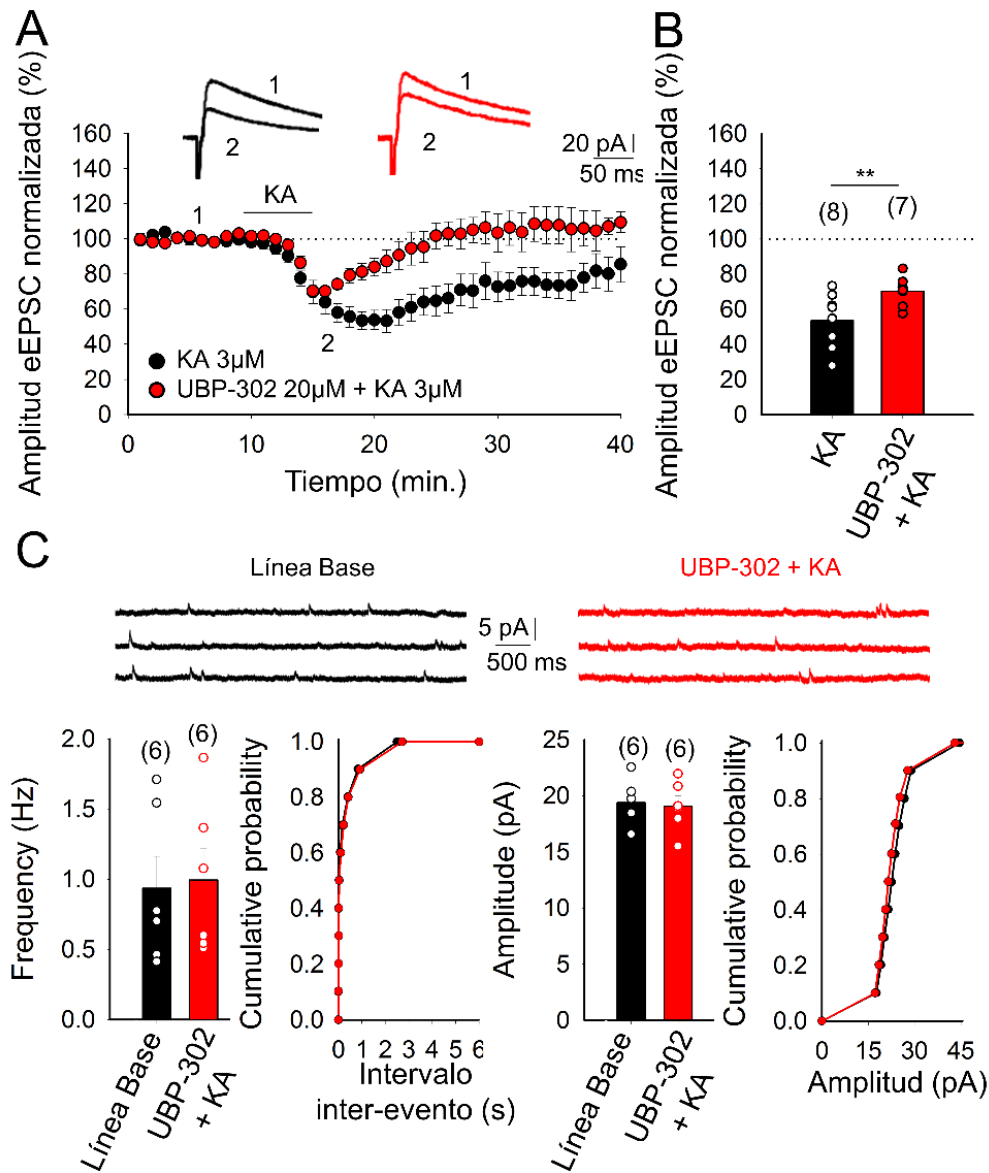


Figura 39: Los receptores de kainato que contienen la subunidad GluK1 están involucrados en la depresión de la liberación de glutamato observada en las sinapsis SC-CA2. (A) Curso temporal del efecto de KA (3  $\mu$ M) sobre la amplitud de las eEPSCs en ausencia (negro) y presencia de UBP-302 20 $\mu$ M (rojo). Trazas antes de (1) y después de (2) tratamiento con KA en ausencia (negro) y en presencia de UBP-302 20  $\mu$ M (rojo). (B) Cuantificación de los resultados. (C) EPSC miniatura monitorizados durante la línea base y después de aplicar KA (3  $\mu$ M) en presencia de TTX (500 nM) y UBP-302 (20  $\mu$ M). Histogramas y las curvas acumulativas muestran que en presencia de UBP-302, después de la aplicación de KA, la frecuencia y la amplitud de los mEPSCs permanecen constantes. El número de rodajas (de tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , t de Student).

## **4.2. LOS ASTROCITOS Y LA ADENOSINA MEDIAN CAMBIOS EN LA SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL EN LAS SINAPSIS SC-CA1 DE HIPOCAMPO**

### **4.2.1. EXISTEN CAMBIOS EN LA PLASTICIDAD. t-LTD A t-LTP EN LA SINAPSIS SC-CA1 DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL**

Se ha descrito una forma presináptica de t-LTD que requiere de la activación de los receptores NMDA presinápticos (pre-NMDAR) en el hipocampo y en las cortezas visual y somatosensorial (Corlew et al. 2008; Banerjee et al. 2009; Andrade-Talavera et al. 2016; Bouvier et al. 2018 ). En el hipocampo, la t-LTD depende del  $Ca^{2+}$  postsináptico, canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje de tipo L, activación del receptor mGlu5, fosfolipasa C y liberación de  $Ca^{2+}$  procedente de las reservas internas mediado por receptores  $IP_3$  postsinápticos, síntesis de endocannabinoides (eCB), activación de los receptores  $CB_1$  y señalización astrogliar (Andrade-Talavera et al. 2016).

Esta forma presináptica de t-LTD desaparece en las primeras semanas de desarrollo (Hensch, 2005 Corlew et al. 2008 ; Banerjee et al. 2009 ; Andrade-Talavera et al. 2016 ), concretamente en la cuarta semana de desarrollo postnatal en el hipocampo de ratón. Además, no está claro si el cierre de esta ventana de plasticidad en la cuarta semana de desarrollo es reversible o no. Determinar los mecanismos que producen el cierre de las ventanas de plasticidad es importante cuando se estudian las respuestas cerebrales a la experiencia y la lesión. De hecho, definir tales procesos puede tener implicaciones importantes para la reparación cerebral, la recuperación sensorial y el tratamiento de trastornos del neurodesarrollo

Se demostró que la t-LTD se induce en las sinapsis del hipocampo CA3-CA1 en P13-21, mientras que no se induce plasticidad en P22-30. Lo cual se confirmó en rodajas del hipocampo de ratones jóvenes P13-21, monitoreando los potenciales postsinápticos excitadores eEPSP provocados por la estimulación extracelular de las colaterales de Schaffer en el stratum radiatum (StR) mediante registros utilizando la técnica *de patch Clamp* en su configuración célula completa de células piramidales de CA1 (Figura

40A,B). Cuando se parearon eEPSPs con un potencial de acción (PA) postsináptico durante 100 veces a 0.2 Hz, la tLTD se indujo claramente. Por lo tanto, un protocolo de pareamiento de este tipo (protocolo post-pre), con un PA postsináptico ocurriendo 18 ms antes de la estimulación presináptica, induce una t-LTD robusta ( $75 \pm 7\%$ ,  $n = 7$ ), mientras que en una vía control, a la cual no se aplica el protocolo de plasticidad, no hubo tal efecto ( $101 \pm 6\%$ ,  $n = 7$ : Fig. 37B,C) más tarde en el desarrollo no se observó t-LTD a P22–30 ( $102 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , vía control  $103 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ : Fig. 40C,D), pero cuando se aplicó el mismo protocolo a P35–42 Se observó sorprendentemente una t-LTP robusta ( $141 \pm 5\%$ ,  $n = 13$  frente a  $100 \pm 4\%$ ,  $n = 13$  en la ruta control, Fig. 40B-C). A P31–34, no se observó plasticidad o t-LTP en ~50 % de los casos (48 %: sin cambio plástico, 52 %: t-LTP), lo que indica que este es un intervalo de transición desde no-LTP (sin plasticidad) a t-LTP).

Por este motivo, se incluyen aquí solo valores de P35-42 cuando se observa t-LTP en prácticamente el 100% de los casos. Estos resultados indican que hay un cambio de t-LTD a t-LTP en las sinapsis CA3-CA1 durante el desarrollo.

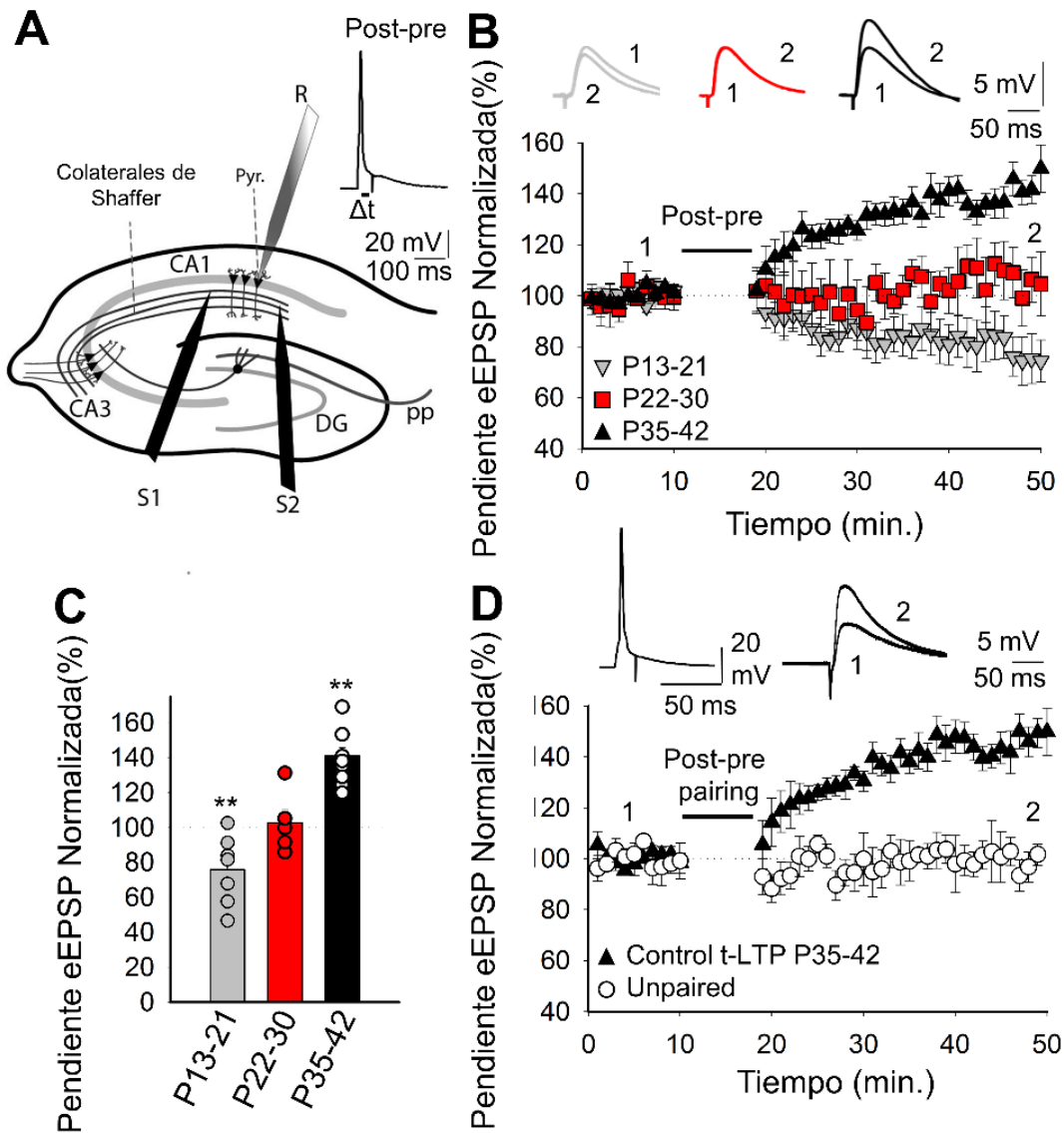


Figura 40: La t-LTD presináptica a P13–21 en el hipocampo cambia a t-LTP a P35–42. (A) esquema que muestra el diseño experimental general: R, electrodo de registro; S1 y S2, electrodos de estimulación; arriba-derecha, protocolo de pareamiento utilizado ( $\Delta t$ , tiempo entre el potencial de acción y el inicio del EPSP). (B) El protocolo post-pre induce t-LTD a P13–21 (triángulos grises, N = 7). Esta t-LTD es evidente durante la tercera semana de desarrollo pero desaparece durante la cuarta semana (cuadrados rojos, n = 6) y cambia a t-LTP durante la quinta semana (triángulos negros, n = 13). Las trazas muestran el EPSP antes (1) y 30 min después (2) de la aplicación del protocolo de plasticidad. (C) Resumen de los resultados. (D) El protocolo post-pre induce t-LTP en P35–42. Se muestran las pendientes EPSP monitorizadas en control (triángulos negros, n = 13) y ruta test (círculos blancos, n = 13). Las trazas muestran EPSP antes (1) y 30 min después (2) de aplicar el protocolo de inducción en el control, solo el control mostró t-LTP. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\*p < .01, prueba ANOVA).

#### **4.2.2. LA t-LTP ES DE EXPRESIÓN PRESINÁPTICA**

Para determinar el lugar de expresión de esta forma de t-LTP del hipocampo, Se realizaron varias aproximaciones. Primero, se analizaron los ratios de pares de pulso al inicio y 30 minutos después de aplicar el protocolo de STDP, obteniéndose una disminución significativa en el PPR después de t-LTP lo que sugiere una expresión presináptica (de  $1.83 \pm 0.10$  al inicio a  $1.22 \pm 0.13$ ;  $n = 13$ , Figura 41A).

En segundo lugar, Se observaron fallos en la transmisión sináptica en varios experimentos ( $n = 10$ ) y cuando se analizó si la cantidad de fallos cambia después de t-LTP, se observó una disminución constante en porcentaje de fallos (de  $7.5 \pm 1.2 \%$  en la línea base a  $1.6 \pm 0.2\%$  después de t-LTP,  $n = 10$ ), lo que nuevamente sugiere una expresión presináptica para la t-LTP (Fig. 41B).

En tercer lugar, estimamos el CV de las respuestas sinápticas antes y después de la inducción de t-LTP. El análisis de  $CV^{-2}$  versus el cambio en la pendiente media evocada de EPSP (M) antes y después de t-LTP arrojó puntos principalmente por encima de la línea diagonal consistente con una modificación presináptica de los parámetros de liberación (Brock et al., 2020, Korn y Faber, 1991, Malinow y Tsien, 1990, Fig. 41C).

Finalmente, se registraron y analizaron respuestas en miniatura (mEPSP) en presencia de tetrodotoxina (TTX) 500 nM, antes y después de la inducción de t-LTP agregando TTX durante la línea base, lavando TTX y realizando el experimento t-LTP y finalmente agregando TTX de nuevo. En estas condiciones experimentales, se encontró t-LTP similar a los experimentos anteriores ( $146 \pm 12 \%$ ,  $n = 6$  frente a  $103 \pm 5 \%$ ,  $n = 6$  en la vía control). En este experimento, se observó que después de la inducción de t-LTP, la frecuencia de mEPSP aumentó (línea de base  $0.36 \pm 0.05$  Hz,  $n = 6$ ; después de la inducción de t-LTP  $0.59 \pm 0.05$  Hz,  $n = 6$ , Fig. 41D) sin efecto en la amplitud de los mEPSPs (línea de base  $0.370 \pm 0.003$  mV,  $n = 6$ ; después de la inducción de t-LTP  $0.380 \pm 0.02$  mV,  $n = 6$ , Fig. 41D). Estos resultados una vez más sugieren un locus presináptico para la expresión de la t-LTP. Juntos, estos resultados indican un locus de expresión presináptico para esta forma de t-LTP.

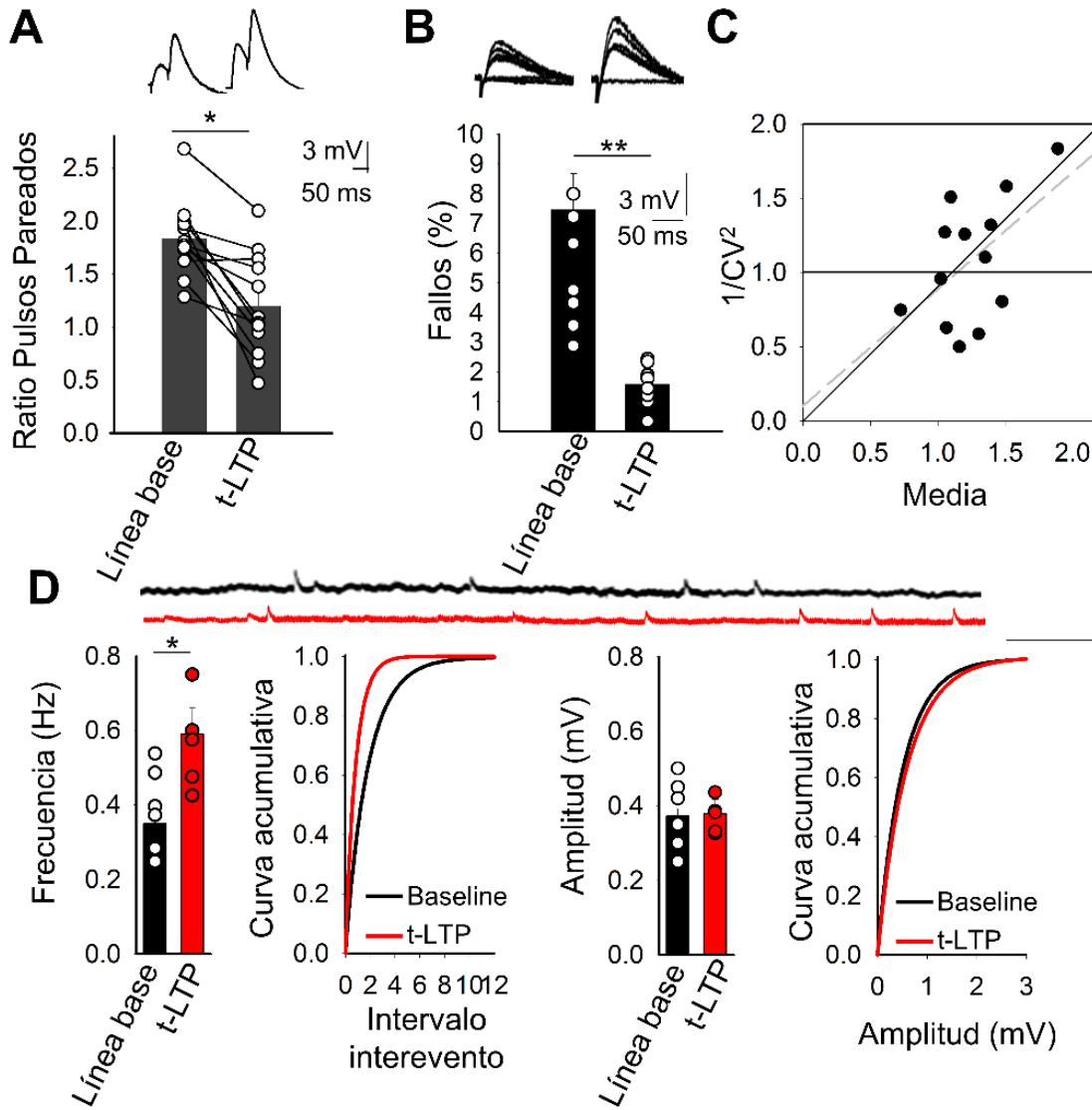


Figura 41: La t-LTP observada es de expresión presináptica. (A) t-LTP inducida por un protocolo post-pre a P35-42 se expresa presinápticamente. El PPR disminuye después de t-LTP: Se muestran trazas al inicio y 30 minutos después de la inducción de t-LTP, N = 13. (B) El número de fallos disminuye después de la inducción de t-LTP (n = 10) (C) Gráfico normalizado de  $1/CV^2$  frente a la pendiente EPSP media muestra datos en forma de puntos principalmente por encima de la diagonal después de la inducción de t-LTP (N = 13). (D) EPSP miniatura (mEPSPs) monitorizados durante la línea base y después de la inducción de t-LTP en presencia de TTX (500 nM). Los histogramas y los gráficos acumulativos muestran que después de la inducción de t-LTP, la frecuencia de mEPSPs aumenta, mientras que la amplitud de mEPSP permanece constante (N = 6). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\*p < 0.01, prueba t de Student).



### **4.2.3. EL CAMBIO DE t-LTD A t-LTP OCURRE DENTRO DE UN INTERVALO TEMPORAL ESPECÍFICO ENTRE EL EEPSP Y EL POTENCIAL DE ACCIÓN (PA) POSTSINÁPTICO**

A continuación, se determinó si el cambio observado, cambio de t-LTD a t-LTP, ocurre únicamente en el intervalo de tiempo de 18 ms entre el potencial de acción (PA) postsináptico y el evocado, o si ocurre en cualquier rango de tiempos entre ambos. Por lo tanto, para caracterizar mejor las ventanas de tiempo para este cambio, se realizaron experimentos usando diferentes tiempos entre la actividad presináptica y postsináptica como protocolo para inducir plasticidad, que van desde -150 a +5 ms (Fig 42). Con un protocolo pre-post, donde el eEPSP ocurre antes que el PA (5 ms), se observó una t-LTP clara tanto a P13-21 como a P35-42 ( $145 \pm 12 \%$ ,  $n = 6$  a P13-21 y  $155 \pm 9 \%$ ,  $n = 6$  a P35-42, figura 42). A -150, -125, -100 o -75 ms, cuando se aplicó un protocolo post-pre (El PA ocurre antes que el eEPSP), no se observó t-LTD a P13-21 ( $103 \pm 13 \%$ ,  $n = 6$ ,  $101 \pm 8 \%$ ,  $n = 6$ ,  $98 \pm 5 \%$ ,  $n = 6$ ,  $95 \pm 8 \%$ ,  $n = 6$ , respectivamente, Fig. 42) o P35-42 ( $98 \pm 6 \%$ ,  $n = 6$ ,  $103 \pm 13 \%$ ,  $n = 6$ ,  $104 \pm 11 \%$ ,  $n = 6$ ,  $105 \pm 7 \%$ ,  $n = 6$ , respectivamente, Fig. 39). A -50 ms, se observó una t-LTD de pequeña magnitud ( $88 \pm 6 \%$ ,  $n = 6$ , Fig. 42) a P13-21, que no cambió a t-LTP cuando se realizó el mismo experimento a P35-42 ( $101 \pm 4 \%$ ,  $n = 6$ , Fig. 42). A -35 y -25 ms, se observó a fuerte t-LTD a P13-21 ( $73 \pm 7 \%$ ,  $n = 6$ ;  $72 \pm 9 \%$ ,  $n = 6$ ; respectivamente, Fig. 42).

Cuando los experimentos se repitieron a P35-42, se observó un cambio a t-LTP en ambos casos ( $125 \pm 9 \%$ ,  $n = 6$ ;  $131 \pm 6 \%$ ,  $n = 6$ , Fig. 42) como ocurrió a -18 ms (P13-21:  $72 \pm 6 \%$ ,  $n = 6$ ; P35-42:  $133 \pm 3 \%$ ,  $n = 6$ , Fig. 42). Estos resultados indican que t-LTD se observa solo a P13-21 y que el cambio observado de t-LTD a t-LTP es común en intervalos de tiempo comprendidos entre -18 a -35 ms, y que la t-LTP no es el resultado de un cambio en el intervalo entre la actividad presináptica y postsináptica que ocurre con el desarrollo (Fig. 42).

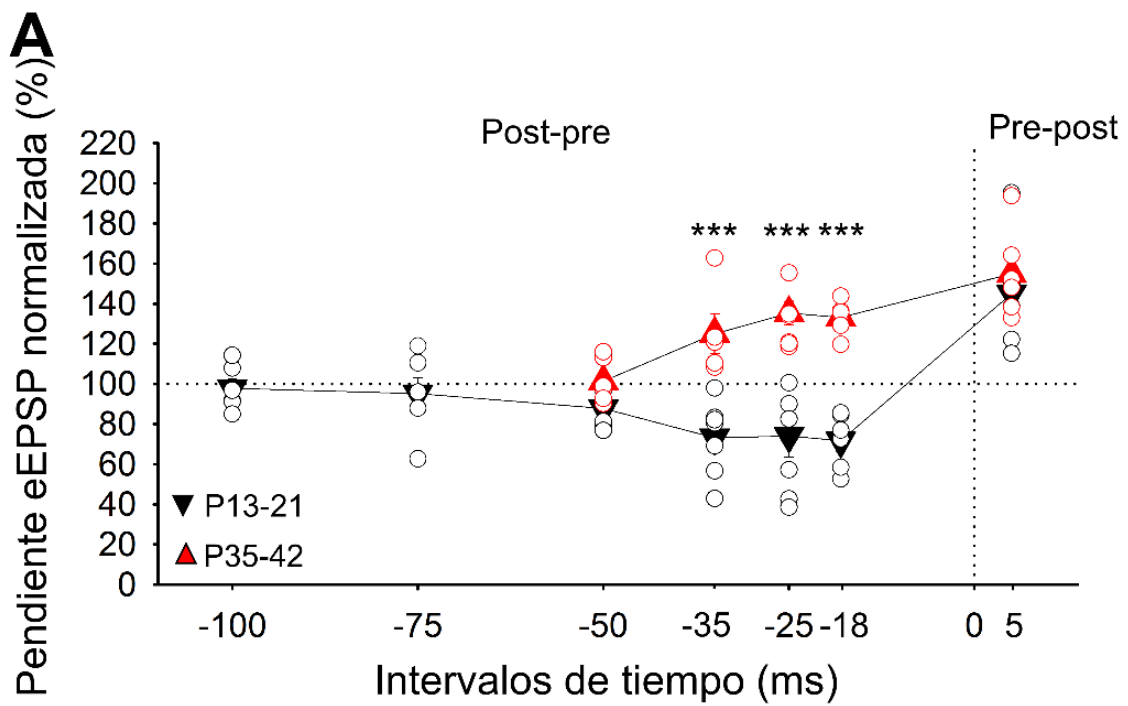


Figura 42: Gráfico resumen que muestra la ventana de plasticidad para STDP a P13–21 (triángulos negros) y P35–42 (triángulos rojos). \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , prueba t de Student. Las barras de error representan el error estándar medio.

#### 4.2.4. LA t-LTP PRESINÁPTICA NO REQUIERE RECEPTORES DE NMDA

La t-LTD detectada en juveniles (P13–21) requiere NMDAR no postsinápticos, probablemente presinápticos (Andrade-Talavera et al., 2016; Prius-Mengual et al, 2018; Pérez-Rodríguez et al., 2019). Por el contrario, la forma presináptica de t-LTP que aparece a P35–42 no se vio afectada cuando D-AP5 (50  $\mu$ M) o MK-801 (0.5–1 mM) estaban presentes en el baño ( $132 \pm 4 \%$ ,  $n = 6$ ,  $145 \pm 10 \%$ ,  $n = 6$ , respectivamente, vs control,  $136 \pm 4 \%$ ,  $n = 6$ , Fig. 43A,B). Por lo tanto, la t-LTP inducida por un protocolo post-pre a P35–42 no requiere NMDAR pre o postsinápticos.

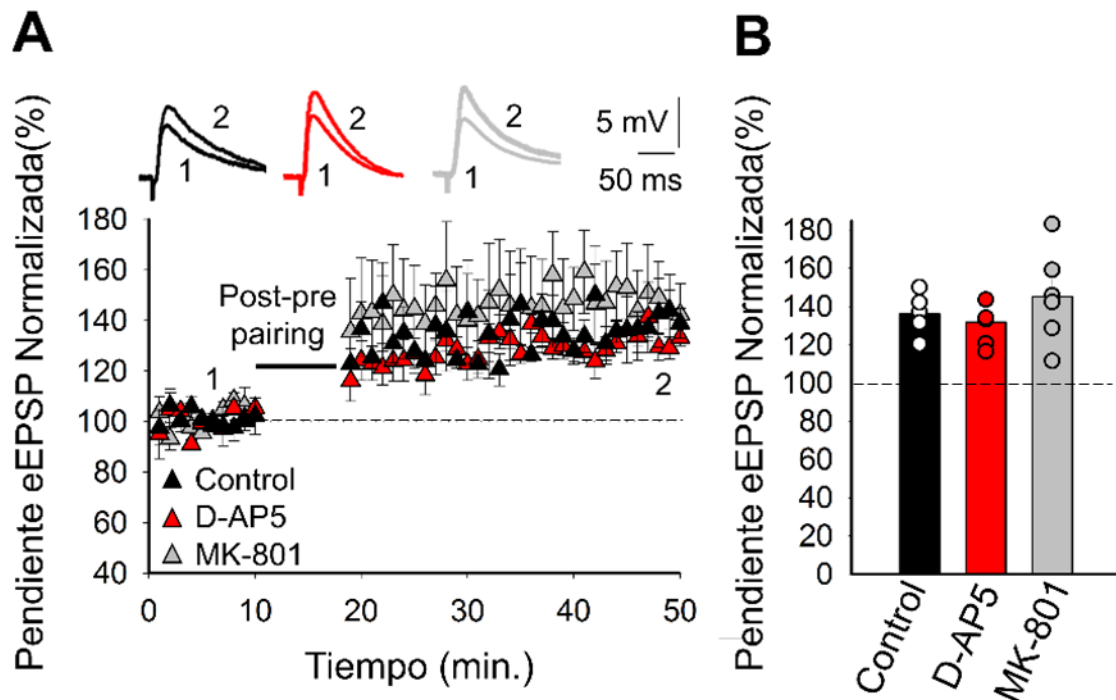


Figura 43: La t-LTP presináptica requiere receptores de tipo NMDA (A) La adición de D-AP5 (50  $\mu$ M) no previene la inducción de t-LTP. La pendiente de los EPSPs en rodajas tratadas con D-AP5 (rojo triángulos,  $n = 6$ ) y no tratadas (triángulos negros,  $n = 6$ ). MK801 aplicado en baño (500  $\mu$ M–1 mM) no previno la inducción de t-LTP (triángulos grises,  $n = 6$ ). Las trazas muestran EPSP antes (1) y 30 min después (2) del protocolo de plasticidad. (B) Resumen de los resultados.

#### 4.2.5. LA t-LTP PRESINÁPTICA REQUIERE DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

Como la t-LTP identificada no requiere de NMDAR, se exploró su dependencia de otros receptores de glutamato, como los mGluR, se determinó si esta forma de t-LTP presináptica requiere mGluR. Significativamente, la t-LTP se previno por completo cuando las rodajas se trataron con el antagonista de mGluR LY341495 (100  $\mu$ M,  $104 \pm 8\%$ ;  $n = 6$ ; Fig. 44A,B). Además, la t-LTP no se previno al tratar las rodajas con el antagonista de los mGluR1 LY367385 (100  $\mu$ M,  $125 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ), pero sí se previno con el antagonista específico de mGluR5 MPEP (20–40  $\mu$ M,  $77 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ,  $142 \pm 9\%$ ,  $n = 9$ , Fig. 44A,B), lo que indica que esta forma de t-LTP requiere mGluR5.

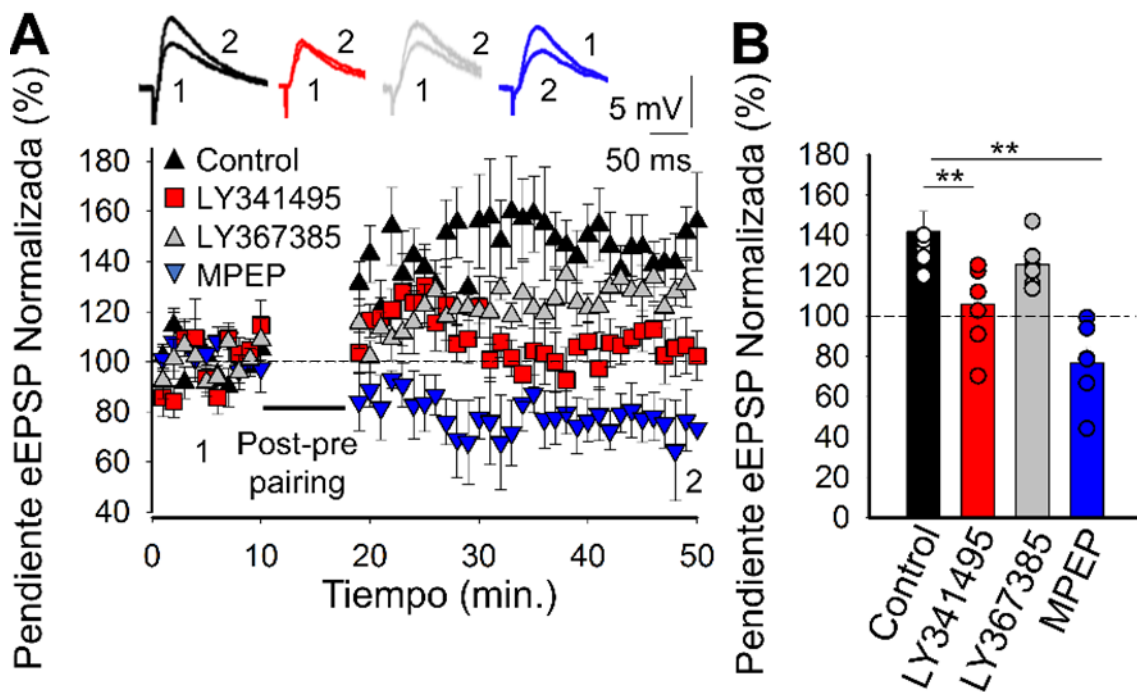


Figura 44: La t-LTP presináptica requiere receptores metabotrópicos de glutamato. (A) Curso temporal de la pendiente de los EPSPs de células control (triángulos negros,  $n = 9$ ) y en rodajas tratadas con el antagonista de mGluR, LY341495 (100  $\mu$ M, cuadrados rojos,  $n = 6$ ), el antagonista de mGluR del grupo I, LY367385 (100  $\mu$ M, triángulos grises,  $n = 6$ ) o el antagonista de mGluR5, MPEP (500  $\mu$ M, triángulos azules,  $n = 6$ ). Las trazas muestran EPSP antes (1) y 30 min después (2) de la aplicación del protocolo de plasticidad. (B) Resumen de los resultados. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , prueba ANOVA).

#### **4.2.6. LA t-LTP PRESINÁPTICA NO REQUIERE DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO SITUADOS EN LAS CÉLULAS POSTSINÁPTICAS**

Para determinar si los mGluR involucrados en la inducción de t-LTP son postsinápticos, se repitieron los experimentos con la neurona postsináptica tratadas con GDPβS introduciéndolo con la pipeta de patch para prevenir la señalización mediada por proteína G. Sin embargo, la inducción de t-LTP no se vio afectada por este tratamiento ( $125 \pm 5 \%$ ,  $n = 6$ , versus rodajas control no tratadas con GDPβS,  $143 \pm 9 \%$ ,  $n = 9$ : Fig. 45A,B).

#### **4.2.7. LA t-LTP PRESINÁPTICA NO REQUIERE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO SITUADOS EN LOS ASTROCITOS**

Cuando estos experimentos se repitieron introduciendo GDPβS en los astrocitos con una pipeta de patch, nuevamente la t-LTP no se vio afectada ( $137 \pm 7 \%$ ,  $n = 10$ : Fig. 45A,B), para determinar si el compuesto GDPβS funciona correctamente se realizó como experimento control el mismo en la célula postsináptica a P13-21, la t-LTD en P13-21 se previno cuando se cargó postsinápticamente con GDPβS ( $73 \pm 5 \%$ ,  $n = 5$  en experimentos de control frente a  $98 \pm 6 \%$ ,  $n = 6$  en rodajas tratadas con GDPβS postsinápticamente), como está descrito (Andrade-Talavera, 2006). El hecho de que el bloqueo de la señalización dependiente de la proteína G postsináptica y del astrocito no afectó la inducción de t-LTP, mientras que los antagonistas de mGluR en el baño la previnieron, sugiere que los mGlu5Rs necesarios para la inducción de t-LTP con un protocolo post-pre se encuentran probablemente sea situados en las neuronas presinápticas.

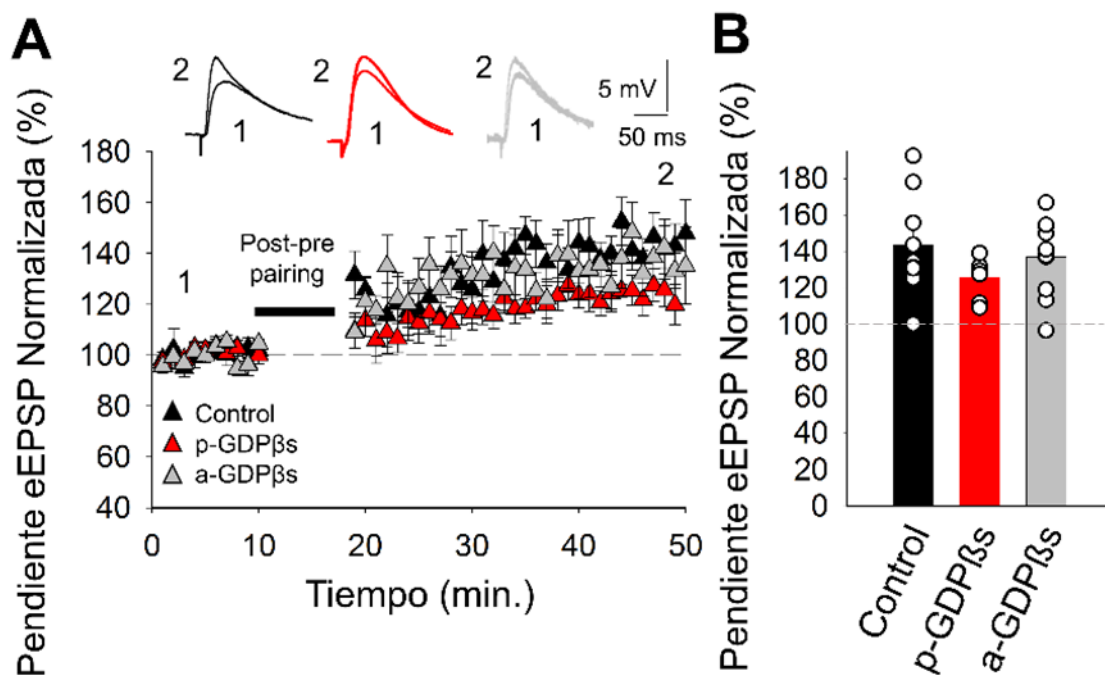


Figura 45: La t-LTP requiere de la activación de mGluR5 presinápticos. (A) Curso temporal de la inducción de t-LTP en condiciones de control (triángulos negros,  $n = 9$ ) y con la neurona postsináptica (triángulos rojos,  $n = 6$ ) o astrocitos (triángulos grises,  $n = 10$ ) tratados con GDPβs (1 mM). Las trazas muestran el EPSP antes (1) y 30 min después del protocolo de plasticidad (2) en rodajas de control o cuando las neuronas postsinápticas o los astrocitos se tratan con GDPβs. (B) Resumen de resultados.

#### **4.2.8. LA t-LTP OBTENIDA APLICANDO UN PROTOCOLO PRE-POST DEPENDE DE RECEPTORES POSTSINÁPTICOS DE NMDA**

Es interesante notar que esta forma de t-LTP no es la misma, ni está relacionada con la t-LTP descrita anteriormente en el campo y obtenida aplicando un protocolo pre-post en las mismas sinapsis en rodajas de animales jóvenes (Andrade-Talavera et al, 2016). De hecho, se encontró que esta t-LTP todavía estaba presente a P35–42 ( $183 \pm 13$  %,  $n = 12$ ) y aún es dependiente de la activación de los receptores postsinápticos de NMDA, ya que se previene cuando las rodajas están tratadas con D-AP5 ( $100 \pm 3$  %,  $n = 6$ ) y por MK-801 (0.5–1 mM) ya sea en el baño ( $101 \pm 6$  %,  $n = 6$ ) o en el interior de la célula postsináptica ( $95 \pm 5$  %,  $n = 6$ , Fig.46). Además, al medir los cambios en el ratio de pares de pulsos, se encontró que esta forma de t-LTP se expresó postsinápticamente ( $1.7 \pm 0.09$  al inicio y  $1.4 \pm 0.13$  %, 30 min después del protocolo de plasticidad).  $n = 12$ , Fig. 46). Por lo tanto, la forma presináptica de t-LTP que encontramos aquí coincide temporalmente con la forma "más clásica" de t-LTP postsináptica dependiente de la activación de NMDAR que se describió previamente en el campo en estas sinapsis en rodajas de animales jóvenes.

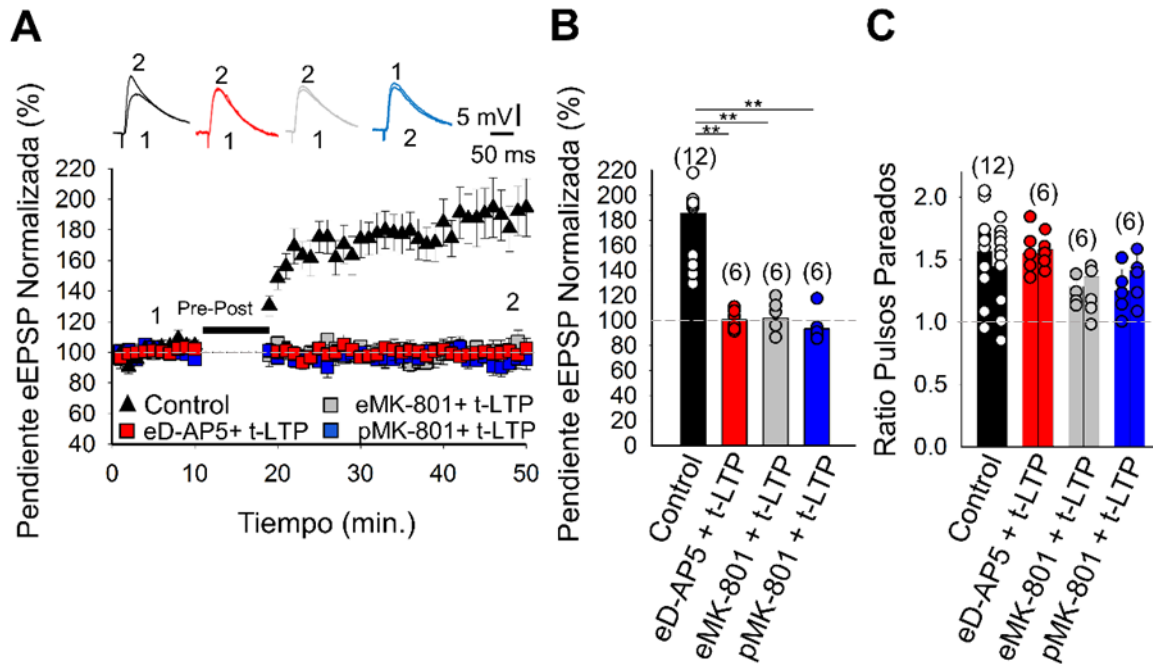


Figura 46: La t-LTP postsináptica que requiere la activación del receptor de NMDA está presente a P35-42 en la región CA1 del hipocampo. (A) curso temporal de la inducción de la t-LTP postsináptica. Las pendientes de los EPSP en condiciones control (triángulos negros,  $n = 12$ ) y en presencia de D-AP5 ( $50 \mu\text{M}$ , cuadrados rojos,  $n = 6$ ) y MK-801 ( $500 \mu\text{M}$ - $1 \text{ mM}$ , cuadrados grises,  $n = 6$ ) y con MK-801 introducido en el interior de la neurona postsináptica ( $1 \text{ mM}$ , cuadrados azules,  $n = 6$ ) se muestran. Los trazos muestran el EPSP antes (1) y 30 minutos después (2) del protocolo de plasticidad. (C) Resumen de los resultados. (C) La relación de pares de pulsos permaneció constante antes y después de t-LTP. El número de rodajas (de tres ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , prueba ANOVA).



#### 4.2.9. LA t-LTP REQUIERE DE CALCIO POSTSINÁPTICO

Aunque la t-LTP parece no requiere NMDAR, tanto la t-LTP como la t-LTD parecen requerir  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico en las sinapsis neocorticales (Bender et al, 2006, Nevian y Sackman, 2006) e hipocampal (Andrade-Talavera et al, 2016). Por lo tanto, se determinó si esta forma de t-LTP presináptica que surge en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico introduciendo el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA en la célula postsináptica utilizando la pipeta de registro. La inclusión de BAPTA (20 mM) en la pipeta de registro impidió la t-LTP ( $106 \pm 11 \%$ ,  $n = 6$ , versus controles,  $151 \pm 6 \%$ ,  $n = 11$ ; Fig. 47A,B), lo que indica que esta forma de t-LTP requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico.

Dado que la t-LTP requiere  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico pero los NMDAR no son la fuente de este  $\text{Ca}^{2+}$ , se examinó cómo se genera este  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico y cuál es su papel en la inducción de t-LTP. Como los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L se han implicado anteriormente en la plasticidad (Andrade-Talavera et al, 2016), se evaluó si estaban involucrados en t-LTP realizando el protocolo de plasticidad después de la aplicación al baño del bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, nimodipina (10  $\mu\text{M}$ ). La inducción de t-LTP se previno por completo en presencia de nimodipina aplicado al baño ( $98 \pm 11 \%$ ,  $n = 6$ ), al igual que cuando se introdujo nimodipina en la neurona postsináptica ( $101 \pm 5 \%$ ,  $n = 6$ , Fig. 47A,B), lo que indica que, al igual que la t-LTD presináptica, la t-LTP presináptica requiere flujo de calcio a través de los canales de calcio de tipo L hacia el citoplasma desde el exterior de la célula.

Además, se ha descrito que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares es necesaria para algunas formas de t-LTD (Andrade-Talavera et al, 2016) y t-LTP en las sinapsis corticales e hipocampales (Nevian y Sackman, 2006, Bender et al, 2006, Andrade-Talavera et al, 2016). De hecho, cuando se evaluó esta posibilidad en la t-LTP inducida por un protocolo post-pre a P35–42, se evitó la t-LTP cuando se aplicó el protocolo post-pre después de cargar la neurona postsináptica con tapsigargina (10  $\mu\text{M}$ ) que agota el  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares ( $95 \pm 4 \%$ ,  $n = 6$  versus controles,  $151 \pm 6 \%$ ,  $n = 11$ ; Fig. 47A,B). Adicionalmente, la inclusión en la pipeta de rianodina (100  $\mu\text{M}$ ), un bloqueador de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , inducida por  $\text{Ca}^2$ , de los depósitos internos, impidió la inducción de t-LTP ( $92 \pm 8 \%$ ,  $n = 6$ , Fig. 47A,B). Por lo tanto, se requiere la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares para la t-LTP además de canales de calcio tipo L.

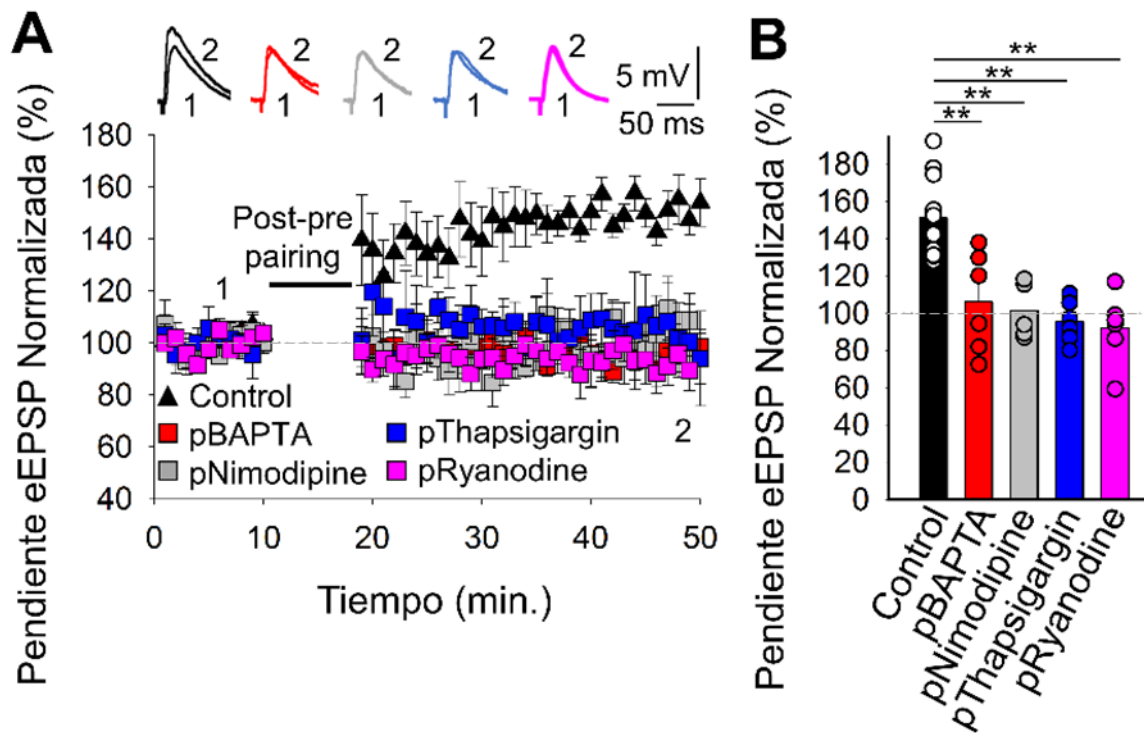


Figura 47: La t-LTP requiere calcio postsináptico. (A) La t-LTP se previene tratando con BAPTA (20 mM) la célula postsináptica. Se trató con nimodipina (10  $\mu$ M), thapsigargina (10  $\mu$ M) y rianodina (100  $\mu$ M) en la neurona postsináptica a través de la pipeta de registro impidiéndose la inducción de la t-LTP. Las pendientes de los EPSP mostrados fueron monitorizadas en rodajas control (triángulos negros, N = 11) y en rodajas tratadas con BAPTA (cuadrados rojos, N = 6), nimodipina (cuadrados grises, N = 6), thapsigargina (cuadrados azules, N = 6) y rianodina (cuadrados magentas, N = 6). Las trazas muestran el EPSP antes de (1) y 30 min después del (2) protocolo de plasticidad. (B) Resumen de los resultados. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p$  < 0.01, prueba ANOVA).

#### **4.2.10. LA t-LTP PRESINÁPTICA NO REQUIERE ENDOCANNABINOIDES NI RECEPTORES CB<sub>1</sub>**

Los endocannabinoides son sintetizados y liberados por las células postsinápticas en respuesta a la despolarización, la señalización elevada de Ca<sup>2+</sup> y/o mGluR, y algunas sinapsis requieren de la señalización de eCB y la activación de CBRs para la plasticidad (Heifets y Castillo, 2009; Navarrete et al., 2014). De hecho, recientemente se ha demostrado que la actividad de CBRs es necesaria para inducir t-LTD en las sinapsis CA3-CA1 a P13-21 (Andrade-Talavera et al, 2016). Para determinar si la señalización cannabinoide es necesaria para la inducción de la t-LTP descrita, se trataron las neuronas postsinápticas con tetrahidrolipstatina (THL, 5 μM), un inhibidor de la enzima diacilglicerol lipasa, sintetizadora de eCB, en estas condiciones la inducción de t-LTP no se vio afectada (138 ± 14 %, n = 6, Fig. 45A,B, THL funciona en estos experimentos ya que en su presencia se evitó la inducción de la t-LTD a P13–21, control t-LTD: 71 ± 8 %, n = 5, en THL: 102 ± 8%, n = 6, como se ha reportado previamente en Andrade-Talavera et al, 2016). La aplicación de 2-AG no recuperó la t-LTP perdida después de tratar la neurona postsináptica con BAPTA (95 ± 7%, n = 7) vs rodajas control, 145 ± 8%, n = 12, Fig. 48A,B). Además, la t-LTP no se vio afectada cuando se indujo en presencia del antagonista de CB<sub>1</sub>R AM251 (3 μM).

La participación de los CB<sub>1</sub>R no es necesaria para la inducción de la t-LTP (154 ± 6 %, n = 6, versus, 145 ± 8%, n = 12, controles agrupados para los experimentos THL, p-BAPTA + 2-AG y AM251, Fig. 48A,B) Por lo tanto, a diferencia de la t-LTD presináptica a P13–21, la inducción de t-LTP presináptica a P35–42 no requiere la activación de CB<sub>1</sub>R.

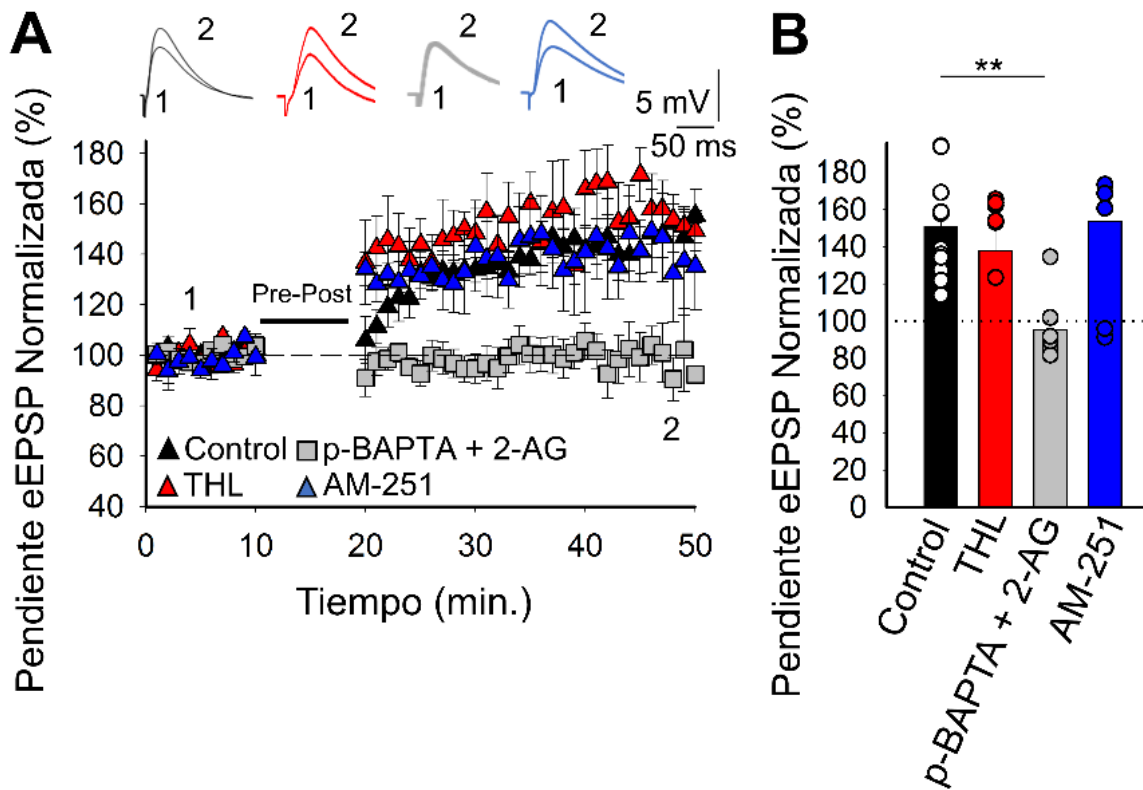


Figura 48: Inducción de t-LTP utilizando un protocolo Post-pre no requiere endocannabinoides ni receptores CB<sub>1</sub>. (A) Curso temporal que muestra las pendientes de los EPSPs monitorizadas en condición control (triángulos negros, n = 12), en presencia de THL (5 μM, triángulos rojos, n = 6), de 2-AG (5 μM, con BAPTA cargado en la célula postsináptica, cuadrados grises, n = 10) y en presencia de AM-251 (3 μM, triángulos azules, n = 6). Las trazas muestran los EPSP antes (1) y 30 minutos después del (2) protocolo de plasticidad para cada condición. (b) Resumen de los resultados. Los resultados se expresan como medias ± SEM (\*\*p < 0.01, prueba ANOVA).

#### **4.2.11. LA t-LTP REQUIERE ÓXIDO NÍTRICO PROVENIENTE DE LA CÉLULA POSTSINÁPTICA**

En los experimentos mostrados, la neurona postsináptica parece liberar un mensajero para que se produzca la t-LTP y, dado que los eCB parecen no estar involucrados, se investigó cual podría ser esa sustancia. Una señal retrógrada que se ha implicado en LTP presináptica es el óxido nítrico (NO) (Castillo et al., 2012; Padamsey y Emptage, 2014; Padamsey et al., 2017) y existe evidencia de que la entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo L podría participar en la síntesis de NO y/o su liberación de la neurona postsináptica (Padamsey et al, 2017, Pigott y Garthwaite, 2016). Significativamente, la inducción de t-LTP se evitó cuando el cPTIO (100  $\mu$ M), compuesto que inutiliza el NO extracelular, se incluyó en la solución del baño o se introdujo en la neurona postsináptica a través de la pipeta de patch (baño:  $102 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , neurona postsináptica):  $95 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 49A,B). Además, la t-LTP presináptica también se evitó cuando se trató la rodaja con un inhibidor de la sintasa de NO, L-NAME (100  $\mu$ M), presente en el medio extracelular ( $105 \pm 9\%$ ,  $n = 6$ ) o cuando se introdujo en la neurona postsináptica ( $106 \pm 4\%$ ,  $n = 6$  frente a  $143 \pm 5\%$ ,  $n = 8$ , en controles, agrupados para todas las condiciones experimentales: Fig. 49A,B), estos resultados indican que el NO producido y liberado por la neurona postsináptica es necesario para la inducción de t-LTP.

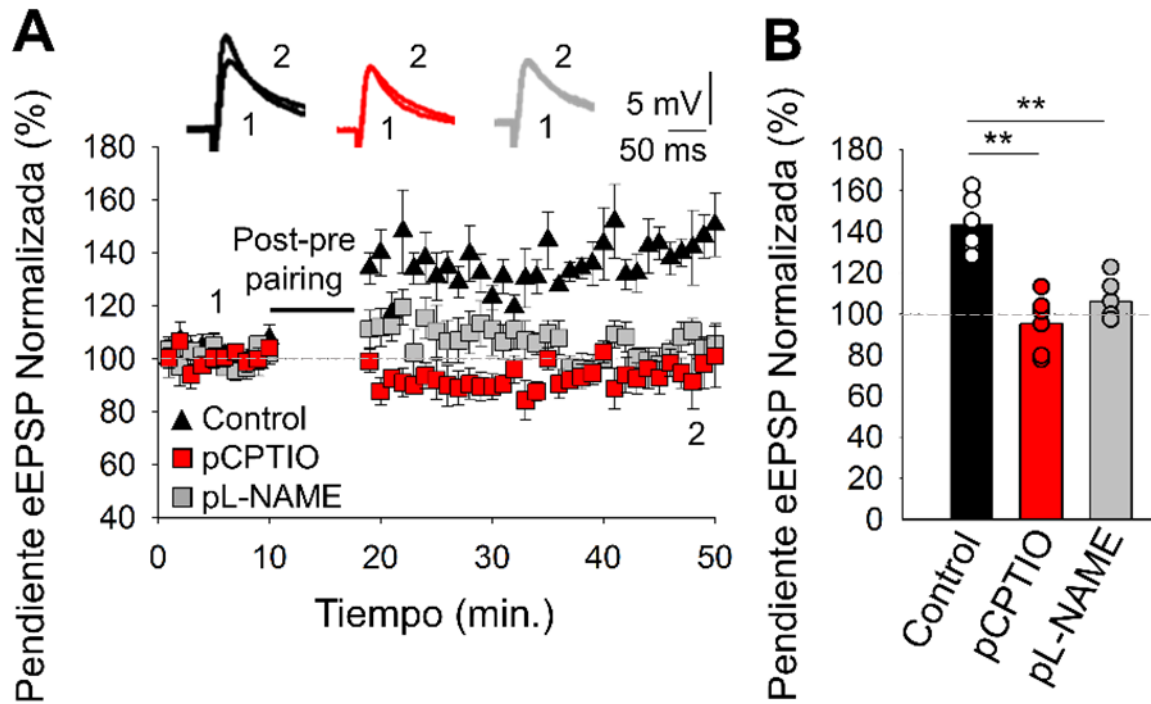


Figura 49: La t-LTP requiere óxido nítrico proveniente de la célula postsináptica. (A) Curso de temporal en condiciones control (triángulos negros,  $n = 6$ ) y con pCPTIO (100  $\mu\text{M}$ , cuadrados rojos,  $N = 6$ ) y L-NAME (100  $\mu\text{M}$ , cuadrados grises,  $N = 6$ ) aplicado en la neurona postsináptica. Las trazas muestran los EPSPs antes (1) y 30 min después del protocolo de plasticidad (2). (B) Resumen de los resultados. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , prueba ANOVA).

#### 4.2.12. EL ÓXIDO NÍTRICO NO ES NECESARIO PARA INDUCIR t-LTD A P13-21

L-NAME no tuvo ningún efecto sobre t-LTD cuando se agregó al baño en rodajas provenientes de ratones P13-21 ( $54 \pm 11\%$ ,  $n = 6$  frente a  $75 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ , en controles Fig. 50A,B).

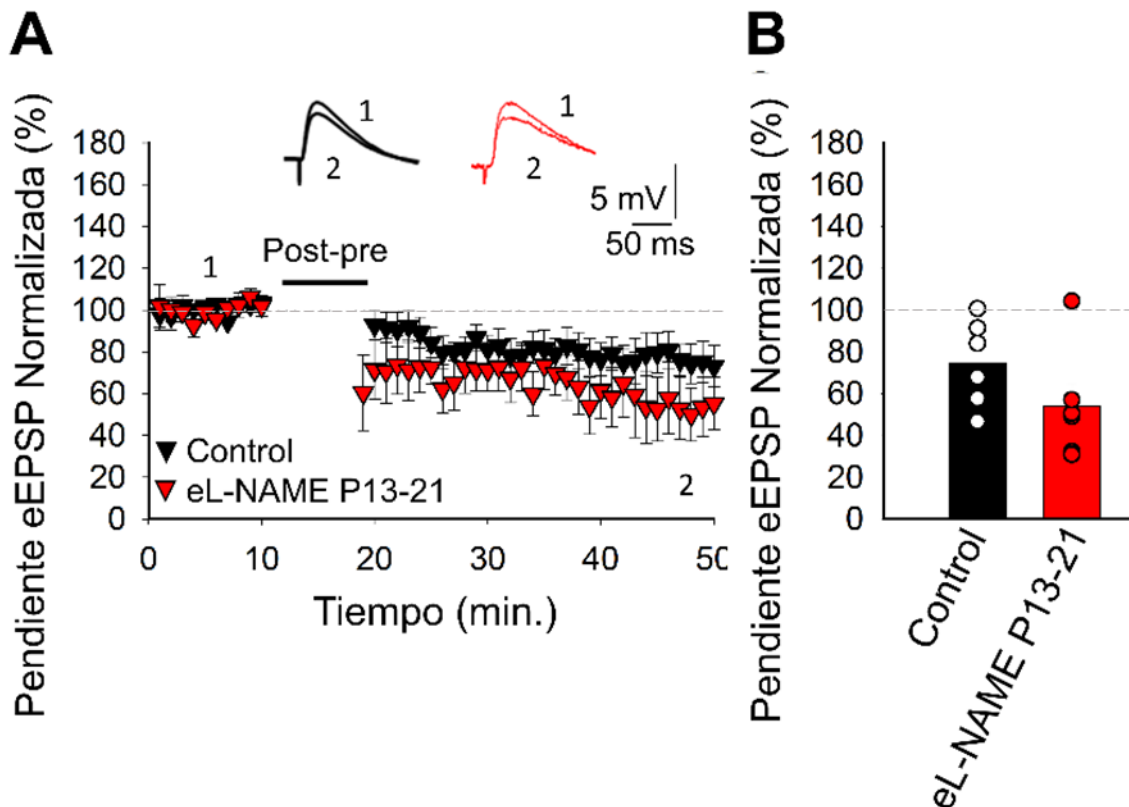


Figura 50: El óxido nítrico (NO) no es necesario para t-LTD a P13-21. (A) curso temporal de las pendientes de los EPSP monitorizadas en la condición control (triángulos negros,  $n = 6$ ) y en se muestra la presencia de L-NAME ( $100 \mu\text{M}$ , triángulos rojos,  $n = 6$ ). Las trazas muestran los EPSPs antes (1) y 30 minutos después (2) del protocolo de plasticidad para cada condición. (B) Resumen de los resultados. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ , prueba t de Student).

### **4.2.13. LA INDUCCIÓN DE t-LTP REQUIERE DE ACTIVIDAD ASTROCITARIA**

Se determinó si la activación de los astrocitos es necesaria para la inducción de la t-LTP que aparece después de P35. Se utilizaron tres enfoques diferentes en rodajas de ratones P35-42 (Fig. 48A-C), primero preincubando las rodajas durante 1 h con fluoroacetato (10 mM), que previno por completo la inducción de la t-LTP ( $84 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 51B,C).

A continuación, los astrocitos individuales se cargaron con 20 mM del quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA a través de una pipeta de patch para inhibir la liberación vesicular y de gliotransmisores dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de estos astrocitos (Parpura y Zorec, 2010). El registro de las neuronas piramidales CA1 demostró cómo el tratamiento con BAPTA previno la inducción de t-LTP en las neuronas de CA1 proximales a una distancia de 50–100  $\mu\text{m}$  ( $86 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 51A-C).

Finalmente, se evaluó este fenómeno en ratones mutantes P35–42 dnSNARE en los que no hay liberación funcional de gliotransmisores (Sardinha et al, 2017, Sutan et al, 2015, Pascual et al, 2005). En contraste con el típico t-LTP observado, en las sinapsis CA3-CA1 en ratones WT P35-42 ( $139 \pm 6\%$ ,  $n = 8$ ), no se pudo inducir t-LTP a esta edad en estos ratones dnSNARE ( $101 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 51B,C). Juntos, estos resultados indican claramente que se requieren astrocitos para la inducción de t-LTP y el cambio de t-LTD a t-LTP que se obtiene durante el desarrollo postnatal.



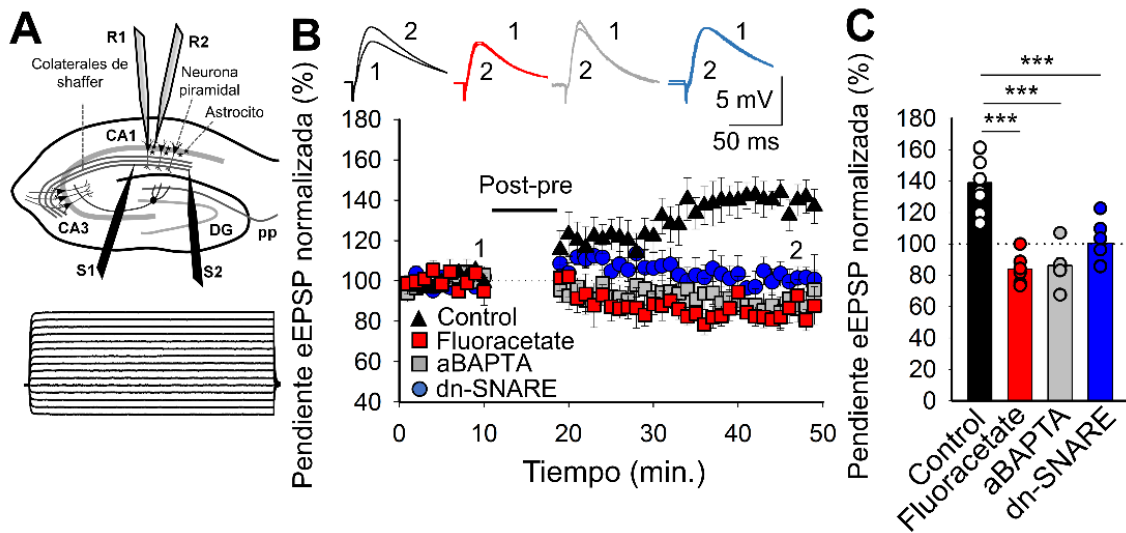


Figura 51: La t-LTP involucra señalización astrocitaria. (A) Esquema que muestra el diseño experimental: R1 y R2, electrodos de registro; S1 y S2, electrodos de estimulación; y las respuestas de voltaje de un astrocito. (B) Evolución temporal de la inducción de t-LTP en condiciones control (triángulos negros,  $n = 8$ ), y de la pérdida de t-LTP observada en presencia de fluoroacetato (10 mM, cuadrados rojos,  $n = 6$ ), en astrocitos tratados con BAPTA (20 mM, cuadrados grises,  $n = 6$ ) y en ratones mutantes dnSNARE (círculos azules,  $n = 6$ ). Los trazos muestran EPSPs antes (1) y 30 min después del protocolo de plasticidad (2). (C) Resumen de los resultados. \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA unidireccional + Holm-Sidak.

#### **4.2.14. LA INHIBICIÓN MEDIADA POR RECEPTORES GABAÉRGICOS NO ES NECESARIA PARA INDUCIR LA t-LTP**

La inhibición parece tener un papel fundamental en la mediación de procesos de plasticidad en diferentes sinapsis (Hensh, 2005, 2004). Tanto la inhibición mediada por los receptores GABAérgicos como de adenosina se han relacionado con cambios en las propiedades plásticas en diferentes sinapsis durante el desarrollo (Arai et al., 1990; Mendoca y Ribeiro, 1994; Meredith et al., 2003; Rex y Kramar, 2005; Zur Nedden et al., 2011; Pérez-Rodríguez et al 2019) y tanto la inhibición GABAérgica como la producida por receptores de adenosina parece aumentar con maduración (Sebastiao et al., 2000; Rex y Kramar, 2005; Kerr et al., 2013; Pérez-Rodríguez et al., 2019).

Se estudió si la inhibición dependiente de receptores GABAérgicos afecta al cambio de t-LTD a t-LTP, para ello se utilizaron los antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> bicuculina (20  $\mu$ M) y el antagonista del receptor GABA<sub>B</sub> SHC-50911 (50  $\mu$ M) en la inducción de t-LTP en P35-42. En presencia de estos antagonistas la t-LTP seguía siendo evidente (bicuculina  $185 \pm 12$  %, n = 7; SHC-50911  $150 \pm 12$  %, n = 7; control  $173 \pm 18$  %; n = 6, Fig. 52A,B), lo que indica que la inhibición GABAérgica no media el cambio de t-LTD a t-LTP en las sinapsis CA3-CA1 durante la quinta semana de desarrollo.

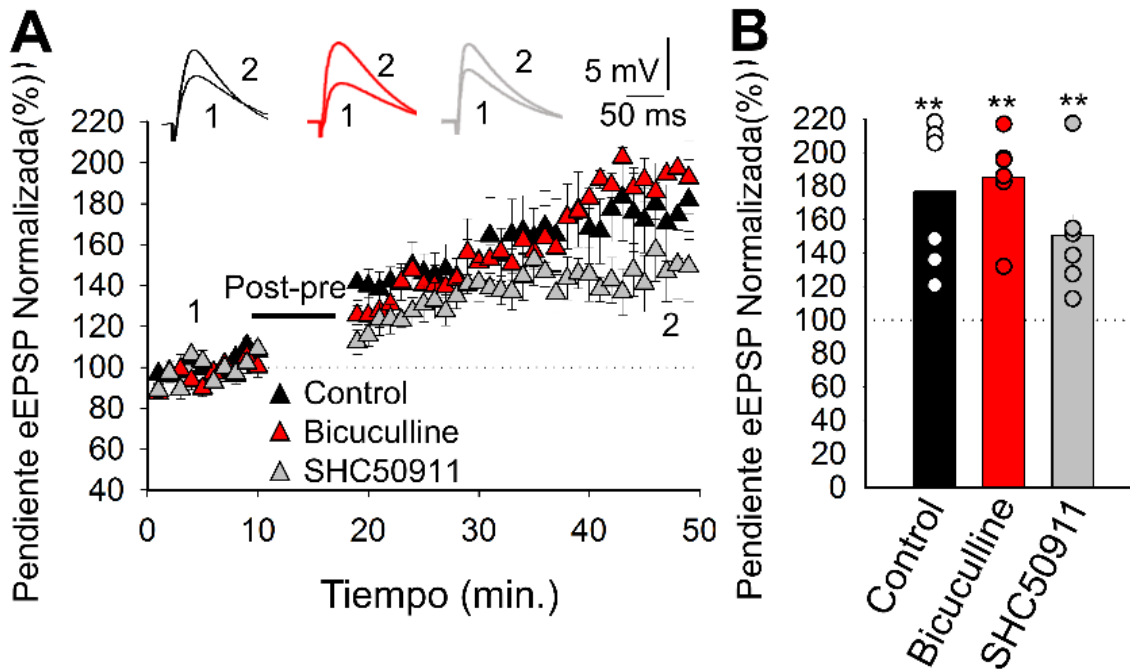


Figura 52: La inhibición GABAérgica no está implicada en el cambio de t-LTD a t-LTP durante el desarrollo. (A) El cambio de t-LTD a t-LTP con la maduración no se debe a la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> o GABA<sub>B</sub>, ya que la t-LTP no se vio afectada en presencia de bicuculina (20  $\mu$ M, triángulos rojos, n = 7) ni SHC50911 (50  $\mu$ M, gris triángulos, n = 7) en comparación con la t-LTP control (triángulos negros, n = 6). Las trazas muestran EPSP antes (1) y 30 minutos después (2) del protocolo de plasticidad. (B) Resumen de los resultados.

Como se ha demostrado recientemente, la activación de presináptica A<sub>1</sub>Rs es responsable de la pérdida de t-LTD en P22–30 (12), se evaluó si 8-CPT, un antagonista de A<sub>1</sub>R, afecta a la inducción de t-LTP. Esta t-LTP se previno por completo en presencia de este compuesto ( $88 \pm 4\%$ , n = 6, frente a  $151 \pm 7\%$ , n = 6 t-LTP control, Fig. 53A,B).

#### 4.2.15. LA t-LTP REQUIERE ADENOSINA Y GLUTAMATO PROVENIENTE DE LOS ASTROCITOS

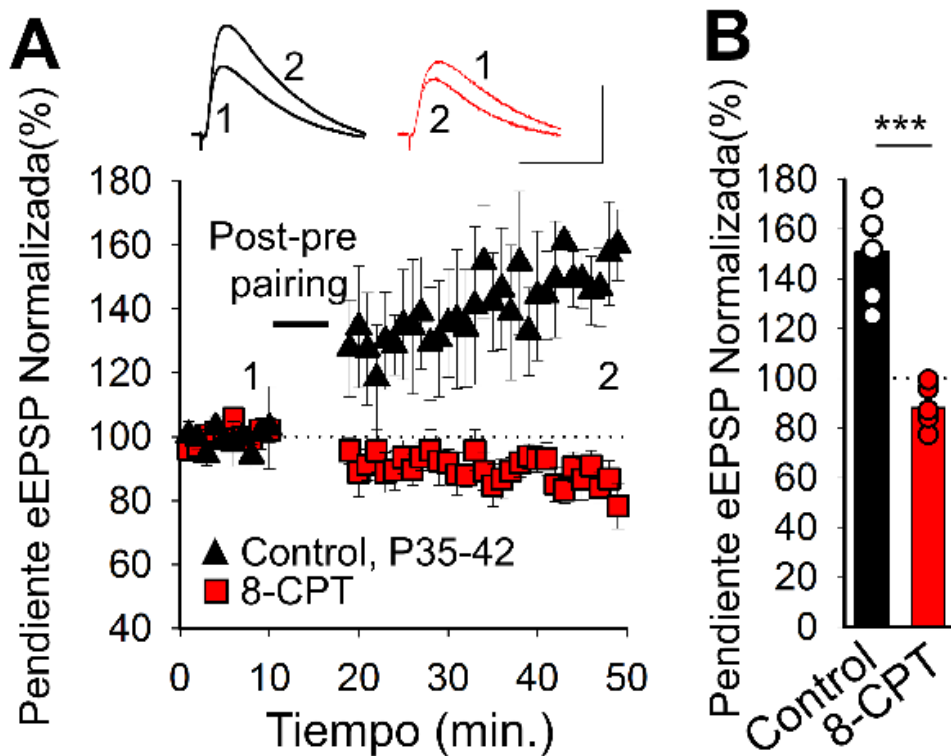


Figura 53: (A) La inhibición presináptica mediada por la actuación de  $A_1R$  activados por adenosina liberada por los astrocitos aumenta con la maduración. La inducción de t-LTP en condiciones control (triángulos negros,  $n = 6$ ), y de la pérdida de t-LTP en rodajas tratadas con 8-CPT ( $2 \mu M$ , cuadrados rojos,  $n = 6$ ). Las trazas muestran EPSP antes (1) y 30 min después del protocolo de plasticidad de plasticidad (2). Escala: 5 mV, 50 ms. (B) Resumen de los resultados. \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t de Student.

Se observó una disminución en el número de fallos en la transmisión sináptica en presencia de 8-CPT, con rodajas de ratones P13-21 ( $15 \pm 5$  % basal,  $10 \pm 3$  %, en presencia de 8-CPT,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) y en rodajas de ratones P22-30 ( $18 \pm 4$  % basal,  $5 \pm 3$  %, en presencia de 8-CPT,  $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) y en rodajas de ratones P35-42 ( $20 \pm 4$  % basal,  $1 \pm 1$  % en presencia de 8-CPT,  $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ) (Fig.54A,B), lo que sugiere una acción presináptica de la adenosina sobre  $A_1R$ . También se estudió el efecto de 8-CPT en rodajas de ratones dnSNARE para determinar si el ATP/adenosina que activa los  $A_1R$  es proveniente de astrocitos y se encontró que 8-CPT no tenía prácticamente ningún efecto sobre la pendiente de los EPSP en rodajas de ratones dnSNARE en cualquiera de las edades estudiadas ( $102 \pm 5$  %,  $n = 6$ ;  $104 \pm 5$  %,  $n = 6$ ;  $116 \pm 6$  %,  $n = 7$  en P13-21; P22-

30 y P35–42, respectivamente, Fig. 54A,B). De hecho, 8-CPT no afectó la amplitud de los eEPSPs en P35–42 cuando los astrocitos se trataron con BAPTA ( $103 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ).

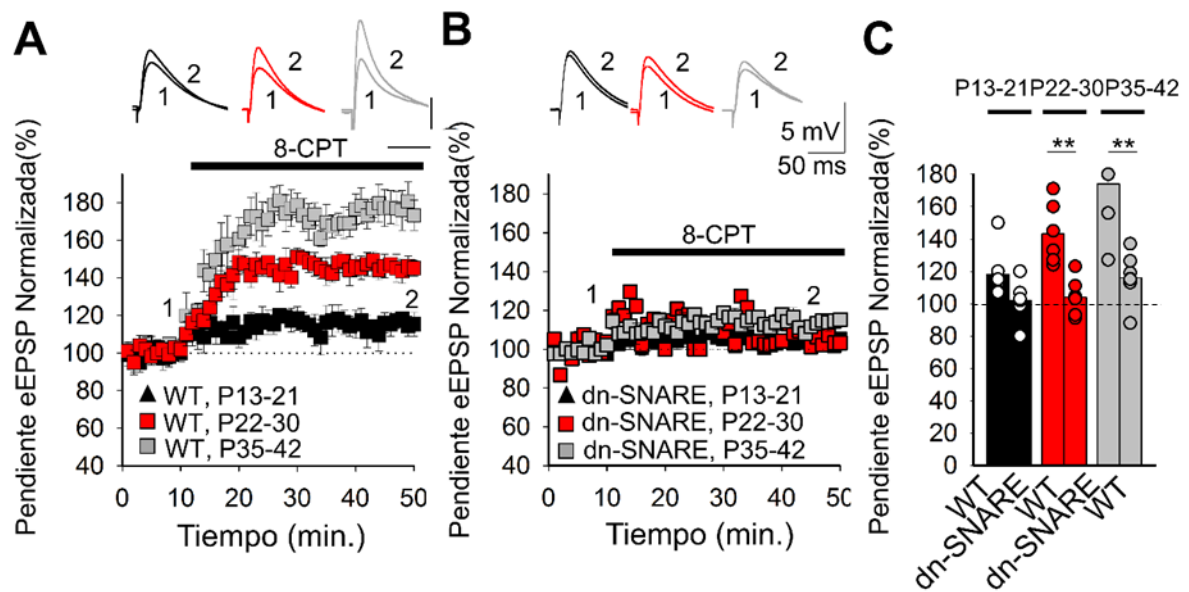


Figura 54: La liberación de adenosina por parte de los astrocitos provoca un aumento de la transmisión sináptica con el desarrollo. A) 8-CPT aumenta gradualmente la pendiente del EPSP en P13–21 (cuadrados negros,  $n = 7$ ), P22–30 (cuadrados rojos,  $n = 6$ ) y P35–42 (cuadrados grises,  $n = 6$ ) en WT (B) pero no en ratones dn-SNARE (P13–21: cuadrados negros,  $n = 6$ ; P22–30: cuadrados rojos,  $n = 6$ ; P35–42: cuadrados grises,  $n = 7$ ). Resumen de los resultados.  $**p < 0,01$ .

Podría esperarse que si ATP/adenosina fuera el único gliotransmisor liberado por los astrocitos para mediar el cambio de t-LTD a t-LTP, cuando los astrocitos estuvieran tratados con BAPTA, el agonista A<sub>1</sub>R, CPA, debería poder recuperar t-LTP en P35-42. Sin embargo, la t-LTP no fue recuperada por al tratar las rodajas con CPA ( $86 \pm 5\%$ ,  $n = 6$  vs  $132 \pm 5\%$ ,  $n = 6$  control, Fig. 55A,B), lo que sugiere que otro gliotransmisor también podría estar involucrado. Como los mGluR presinápticos también podrían participar en la inducción de esta forma de LTP, se probó si también se puede requerir glutamato de los astrocitos para inducir t-LTP presináptica en P35-42 mediante la aplicación local de glutamato. Cuando se probó con astrocitos tratados con BAPTA en presencia de CPA, la aplicación local de glutamato recuperó la t-LTP ( $127 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 55A,B).

Por lo tanto, los gliotransmisores ATP/adenosina y glutamato son necesarios para la inducción de la t-LTP presináptica. Este glutamato presumiblemente activa los mGluR presinápticos y estos datos sugieren que a medida que avanza el desarrollo, la probabilidad de liberación de glutamato disminuye en la medida en que se necesita glutamato de los astrocitos para activar los mGluR presinápticos para que puedan participar en la t-LTP presináptica.

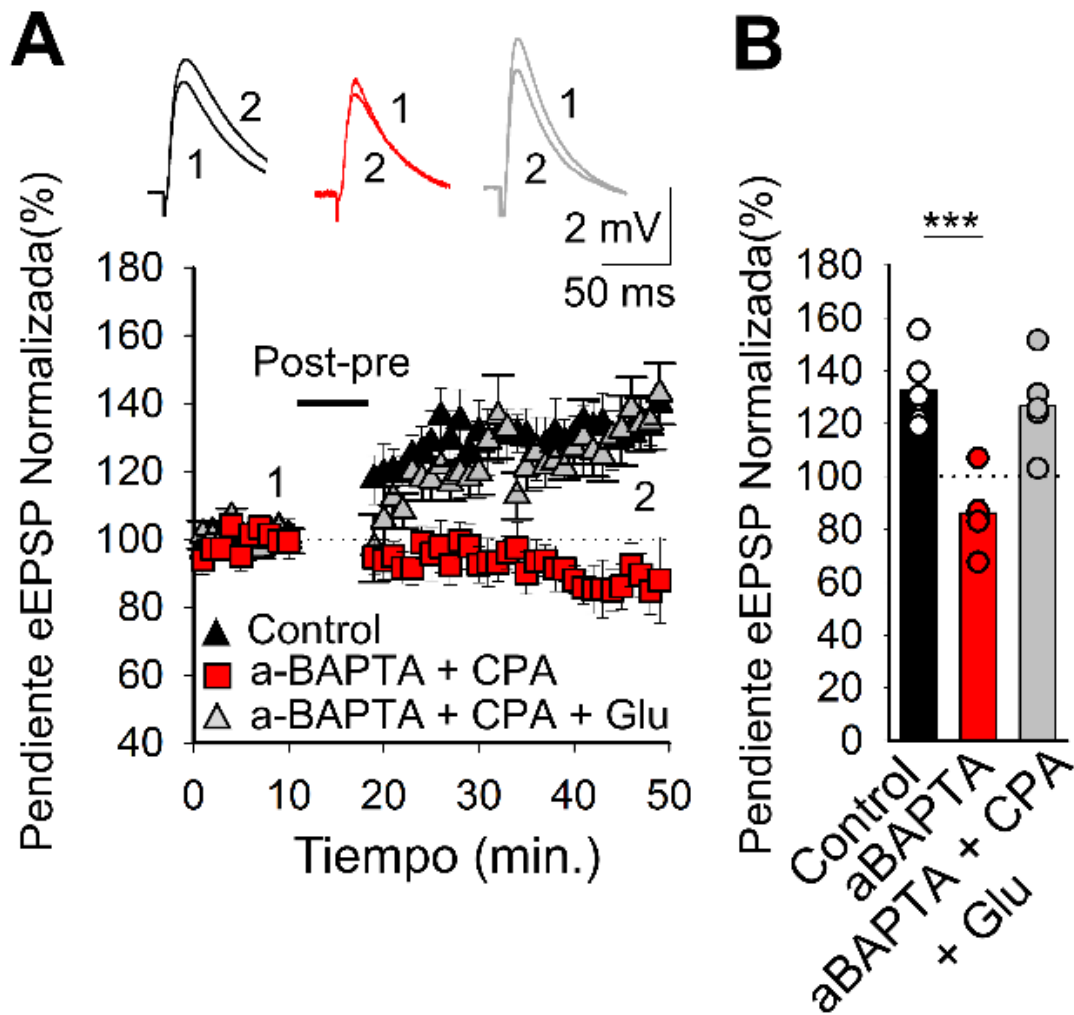


Figura 55: La liberación de glutamato y adenosina por astrocitos es necesaria para la inducción de t-LTP. (A) Curso temporal en condiciones control (triángulos negros,  $n = 6$ ), y en rodajas tratadas con BAPTA en astrocitos y expuestas a CPA (50 nM, cuadrados rojos,  $n = 6$ ), o rodajas con astrocitos tratados con BAPTA expuestas a CPA y aplicación local de glutamato (100  $\mu$ M, triángulos grises). Las trazas muestran los EPSP antes (1) y 30 minutos después del protocolo de plasticidad (2). (B) Las barras de error representan el S.E.M. Resumen de los resultados. \*\*\*  $p < 0,001$ . ANOVA + Holm-Sidak.

#### **4.2.16. LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE ADENOSINA A<sub>1</sub> A P13-21 CONVIERTE LA t-LTD EN t-LTP**

Si una mayor concentración de adenosina extracelular durante el desarrollo activa más A<sub>1</sub>R presinápticos en las sinapsis CA3-CA1, atenuando la liberación de glutamato y mediando un cambio de t-LTD a t-LTP en P35-42, podría ser posible convertir t-LTD en t-LTP más temprano en el desarrollo aumenta la concentración de adenosina (p. ej., en P13-21 cuando la t-LTD es robusta a P22-30 cuando se pierde la t-LTD).

Para determinar si el CPA convierte t-LTD en t-LTP, se repitieron los experimentos con CPA a 50 nM; en esta condición experimental, CPA puede producir un cambio de t-LTD (a P13-21) o de no-LTD (a P22-30) a t-LTP (de  $76 \pm 3\%$ ,  $n = 7$ , a  $151 \pm 12\%$ ,  $n = 7$  en P13-21 Figura 56A,B), y de ( $102 \pm 2\%$ ,  $n = 6$ , a  $131 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , a P22-30, figura 56C,D).

Para confirmar aún más un locus presináptico para la adenosina, se realizaron experimentos que estudian el efecto de CPA 50 nM sobre la frecuencia mEPSP. En esta condición experimental, se observó una clara disminución en la frecuencia de mEPSP ( $0,55 \pm 0,03$  Hz durante la línea de base;  $0.22 \pm 0.02$  Hz en presencia de CPA,  $n = 6$ ) sin efecto de la amplitud de mEPSP ( $0.33 \pm 0.03$  mV durante la línea de base  $0.38 \pm 0.03$  mV en presencia de CPA, figura 57A), lo que indica que los efectos de CPA son presinápticos y, por lo tanto, la activación de A<sub>1</sub>R presinápticos amortigua la liberación de glutamato que aumenta con el desarrollo.

Estos resultados están de acuerdo con una participación primaria de A<sub>1</sub>R en el cambio observado de t-LTD a t-LTP con la maduración. Estos resultados sugieren que los astrocitos liberan la adenosina que activa los A<sub>1</sub>R. Como tal, la adenosina que se origina en los astrocitos activa los A<sub>1</sub>R presinápticos y deprime la liberación de glutamato, un efecto que aumenta con la maduración.



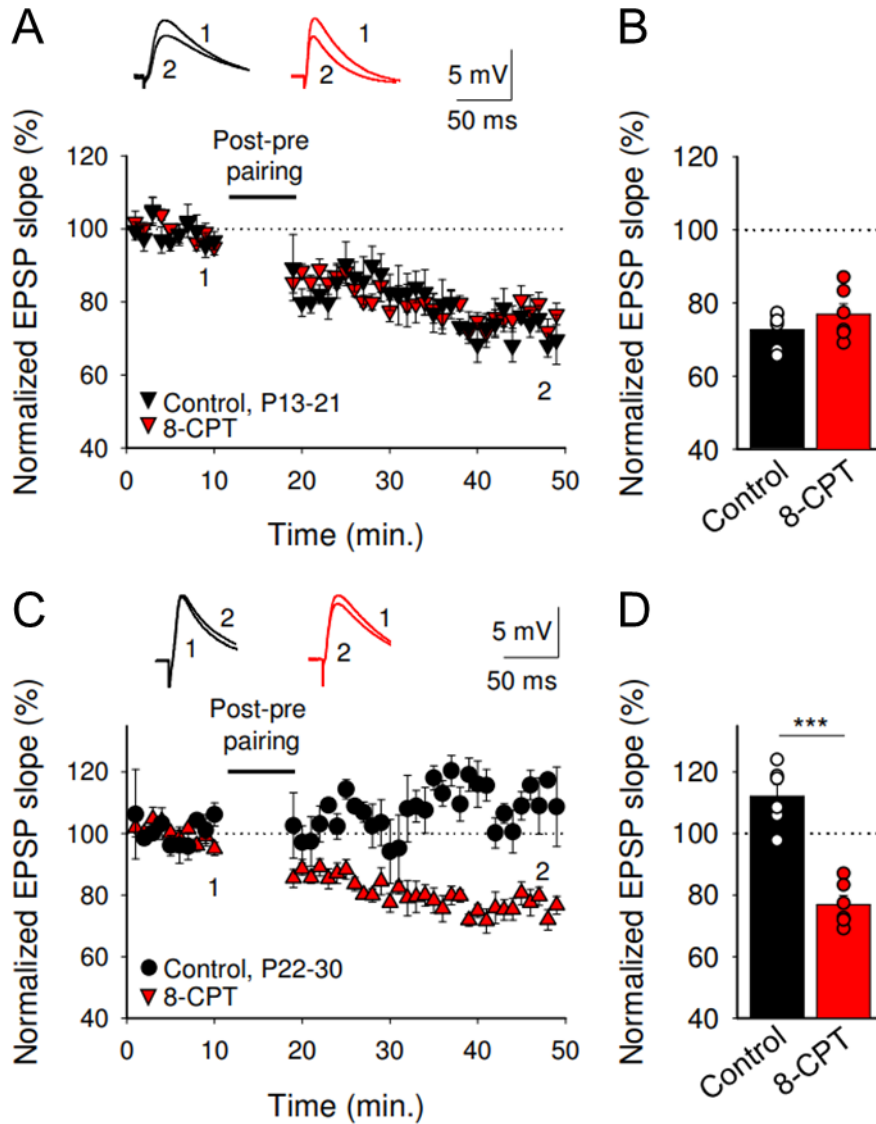


Figura 56: Los A<sub>1</sub>R no son necesarios para la t-LTD a P13-21. A) Los EPSP monitorizados en condición de control (triángulos negros, n = 6), en presencia de 8-CPT (2 μM, triángulos rojos, n = 6) se muestran a P13-21. Las trazas muestran el EPSP antes (1) y 30 minutos después (2) del pareamiento para cada condición. (B) Resumen de los resultados. Los A<sub>1</sub>R están involucrados en la pérdida de t-LTD a P22-30. (C) Los EPSP monitorizados en condición de control (círculos negros, n = 6), en presencia de 8-CPT (triángulos rojos, n = 6) se muestran a P22-30. Las trazas muestran el EPSP antes (1) y 30 minutos después (2) del pareamiento para cada condición. (d) Resumen de los resultados. \*\*\*p < 0.001, prueba t de Student. Las barras de error representan el S.E.M.

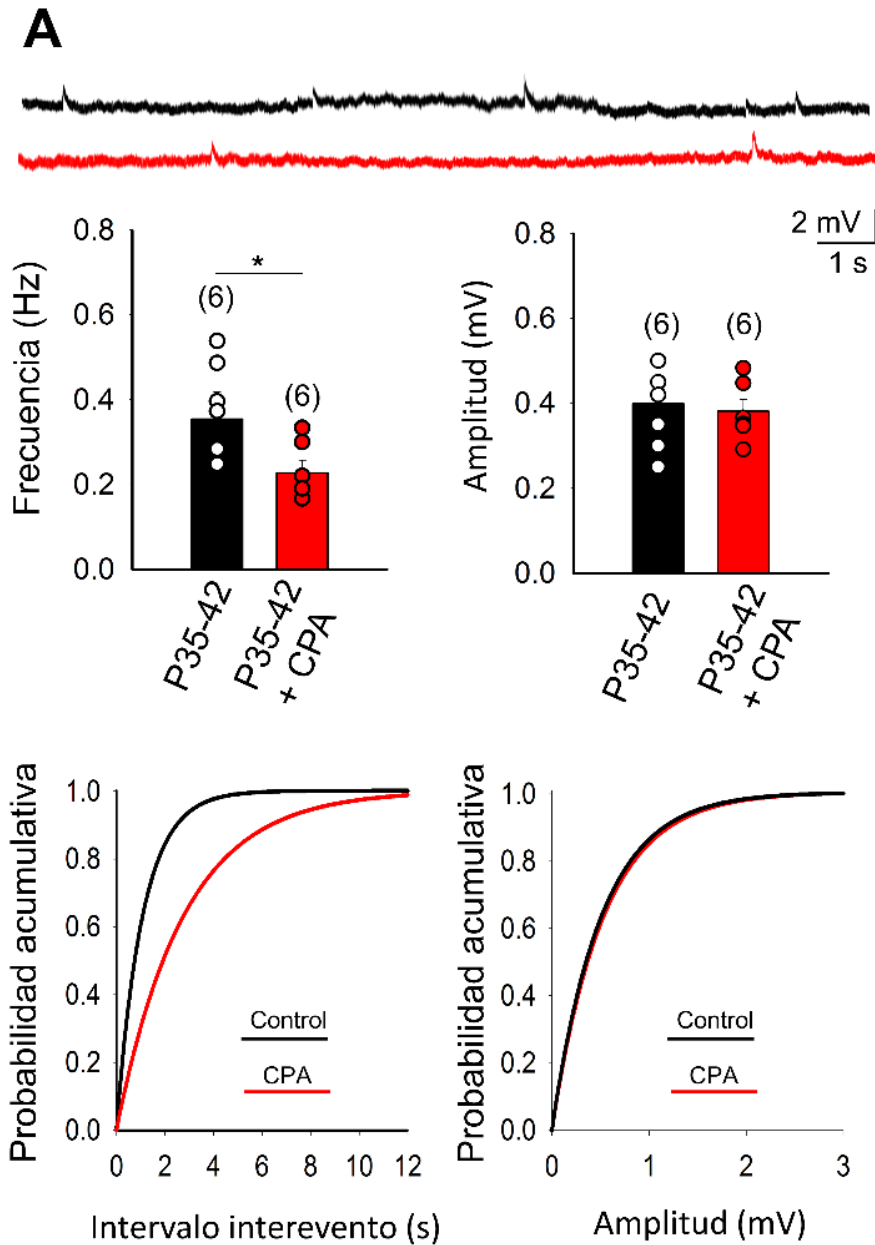


Figura 57: Los receptores de adenosina son presinápticos. (A) mEPSP en miniatura durante la línea base (negro, n = 6) y después de exponer las rodajas de animales P13-21 a CPA (rojo, n = 6) en presencia de TTX (500 nM). Los Histogramas y gráficos acumulativos muestran que, a P13-21, CPA disminuye la frecuencia mEPSP pero no afecta la amplitud de los minis, lo que indica una acción presináptica de CPA. \*\*\* p < 0.05, Prueba t de Student.

#### **4.2.17. LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD EXCITADORA ESPONTÁNEA Y EVOCADA CON MADURACIÓN LA INVOLUCRA LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE ADENOSINA A<sub>1</sub>**

Se estudió si la probabilidad de liberación de glutamato disminuye en las sinapsis CA3–CA1 con la maduración midiendo la frecuencia de mEPSP a P13–21 y P35–42 (en presencia de TTX, 500 nM). Se evidenció una clara disminución en la frecuencia de los mEPSPs en P35–42 (frecuencia:  $0.36 \pm 0.04$  Hz, amplitud:  $0.40 \pm 0.05$  mV, n = 6) en comparación con P13–21 (frecuencia:  $0.55 \pm 0.03$  Hz, amplitud:  $0.33 \pm 0.02$  mV, n = 6, figura 58A,B), pero sin efecto en la amplitud.

Este fenómeno se evitó al tratar las rodajas P35–42 con 8-CPT (frecuencia  $0,50 \pm 0,03$  Hz, amplitud  $0.34 \pm 0.02$  mV, n = 6: Fig. 58A,B). Se encontró un resultado similar cuando se estudiaron las respuestas evocadas durante el desarrollo. Se estudió la PPR de las respuestas evocadas de ratones P13–21 a P35–42 y observamos un aumento en la PPR en P35–42 en comparación con P13–21 (PPR:  $1.8 \pm 0.07$  en P35-42, n = 19 y  $1.4 \pm 0.06$ , n = 11 en P13–21), un aumento que se evitó en presencia de 8-CPT ( $1.27 \pm 0.2$ , n = 5, figura 58A,B). Por lo tanto, con la maduración parece haber una disminución en la probabilidad de liberación de glutamato en las sinapsis CA3-CA1 debido a la activación de los A<sub>1</sub>R presinápticos mediada por adenosina (liberada probablemente por los astrocitos).

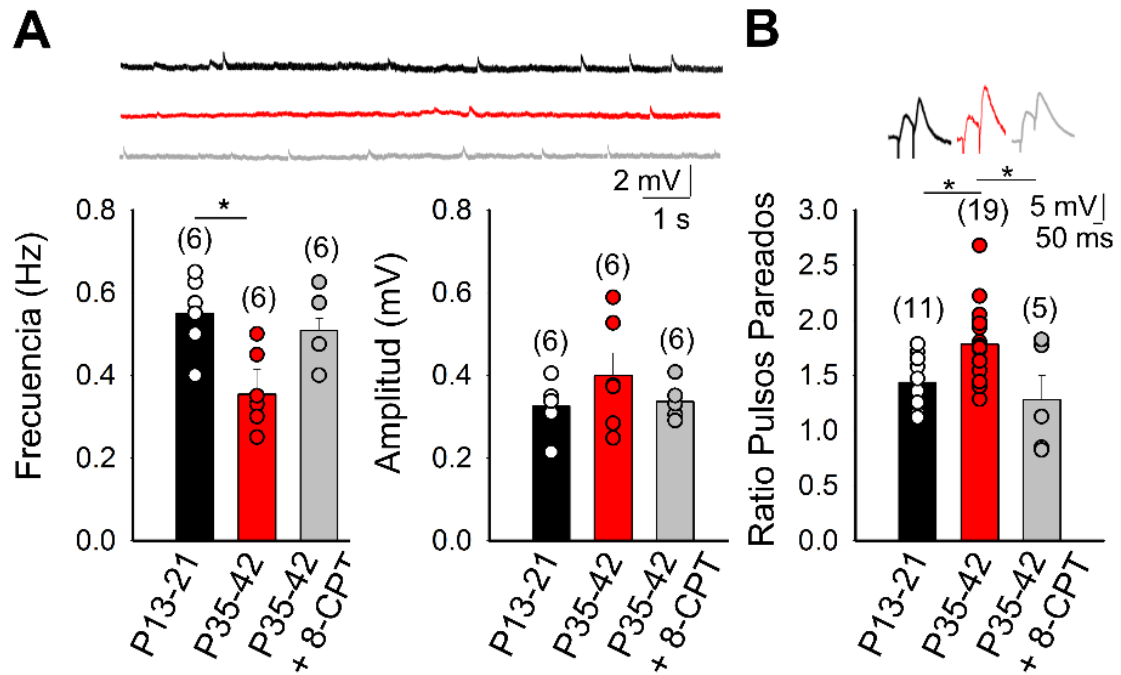


Figura 58: Los receptores de adenosina A<sub>1</sub> median la disminución de la actividad excitadora espontánea y evocada con la maduración (A) La frecuencia de los mEPSP disminuye con la maduración, un efecto que es prevenido al antagonizar los A<sub>1</sub>R con 8-CPT. Las trazas muestran los mEPSP a P13-21 (negro, n = 6) y P35-42 en rodajas control (rojo, n = 6), y a P35-42 en rodajas tratadas con 8-CPT (gris, n = 6). La frecuencia de los mEPSP disminuye claramente con la maduración pero no cuando se tratan con 8-CPT. No se observaron cambios en la amplitud durante el desarrollo. \* p < 0.05, prueba t de Student. (B) El ratio de pares de pulsos de respuestas evocadas aumenta con la maduración, un efecto que es impedido por el bloqueo de los A<sub>1</sub>R con 8-CPT. Las trazas muestran eEPSP a P13-21 (negro, n = 11) y en P35-42 en rodajas control (rojo, n = 19), y en rodajas de animales P35-42 tratados con 8-CPT (n = 5). \* p < 0.05, prueba t de Student.

#### **4.2.18. EL ÓXIDO NÍTRICO ES NECESARIO PARA LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR POR PARTE DEL ASTROCITO Y LA INDUCCIÓN DE LA t-LTP**

Finalmente, para definir la señal que podría estimular a los astrocitos a liberar gliotransmisores y mediar en esta forma de LTP, se evaluó el papel del NO, cuya liberación desde la neurona postsináptica es necesaria para la t-LTP. Se ha demostrado previamente que el NO aumenta el calcio que entra y estimula los astrocitos (Matyash et al, 2001), lo que plantea la posibilidad de que el NO pueda activar o interactuar con los astrocitos para liberar ATP/adenosina y/o glutamato. Curiosamente, la inducción de t-LTP se evitó tratando con c-PTIO los astrocitos (a-cPTIO  $91 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ) pero no cuando se trataron con LNAME (a-L-NAME  $146 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ , frente a rodajas control no tratados  $143 \pm 5\%$ ,  $n = 11$ , Fig. 59A,B). Además, cuando se evitó la inducción de t-LTP tratando la neurona postsináptica con L-NAME, la aplicación local de DETA NONOato (5 mM) en astrocitos recuperó la t-LTP ( $123 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 59A,B). Por lo tanto, el NO de la neurona postsináptica podría activar al astrocito para estimular o modular la liberación de gliotransmisores.

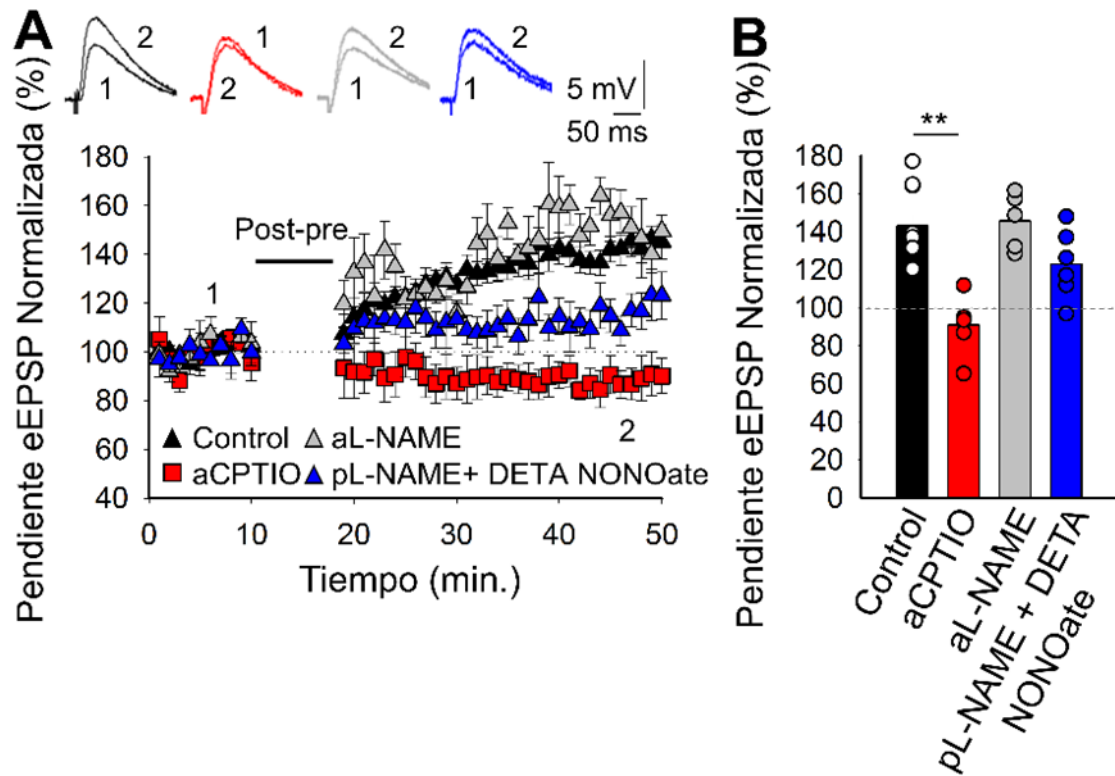


Figura 59: NO es necesario para la inducción de la t-LTP. La t-LTP se evita tratando con cPTIO (100  $\mu$ M) el astrocito a través de la pipeta de registro, lo cual no ocurre cuando se trata con L-NAME (100  $\mu$ M). Cuando L-NAME se introduce en la neurona postsináptica y se añade de forma local DETA NONOato, (5 mM) sobre astrocitos, la t-LTP se recupera. Las pendientes EPSP monitorizadas, se muestran para el control (negro triángulos, n = 11) y en rodajas tratadas con acPTIO (cuadrados rojos, n = 6), aL-NAME (triángulos grises, n = 6) y pL-NAME + DETA NONOato (triángulos azules, n = 6). Las trazas muestran el EPSP antes de (1) y 30 min después del (2) protocolo de plasticidad. (B) Resumen de los resultados. \*\*p < 0,01, unidireccional ANOVA + Holm-Sidak.

#### 4.2.19. EL CAMBIO DE LTD A LTP QUE SE OBTIENE DURANTE LA MADURACIÓN ESTÁ PRESENTE APLICANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE PLASTICIDAD

##### 4.2.19.1. LA LTD INDUCIDA CON UN PROTOCOLO CONSISTENTE EN PAREAR UN POTENCIAL DE ACCIÓN POSTSINÁPTICO 100 VECES SEGUIDO DE DOS EPSP CAMBIA A LTP CON EL DESARROLLO

El cambio de LTD a LTP está presente cuando se aplica un protocolo de plasticidad que consiste en aplicar el pareamiento (100 veces) de un potencial de acción postsináptico seguido 18ms después de la estimulación presináptica (dos pulsos a 100Hz). Se observó LTD a P13-21 ( $67 \pm 10 \%$ ,  $n = 6$ ) pero cuando se aplicó el mismo protocolo en P35-42 se observó una LTP robusta ( $152 \pm 22 \%$ ,  $n = 6$ , Fig 60A,B)

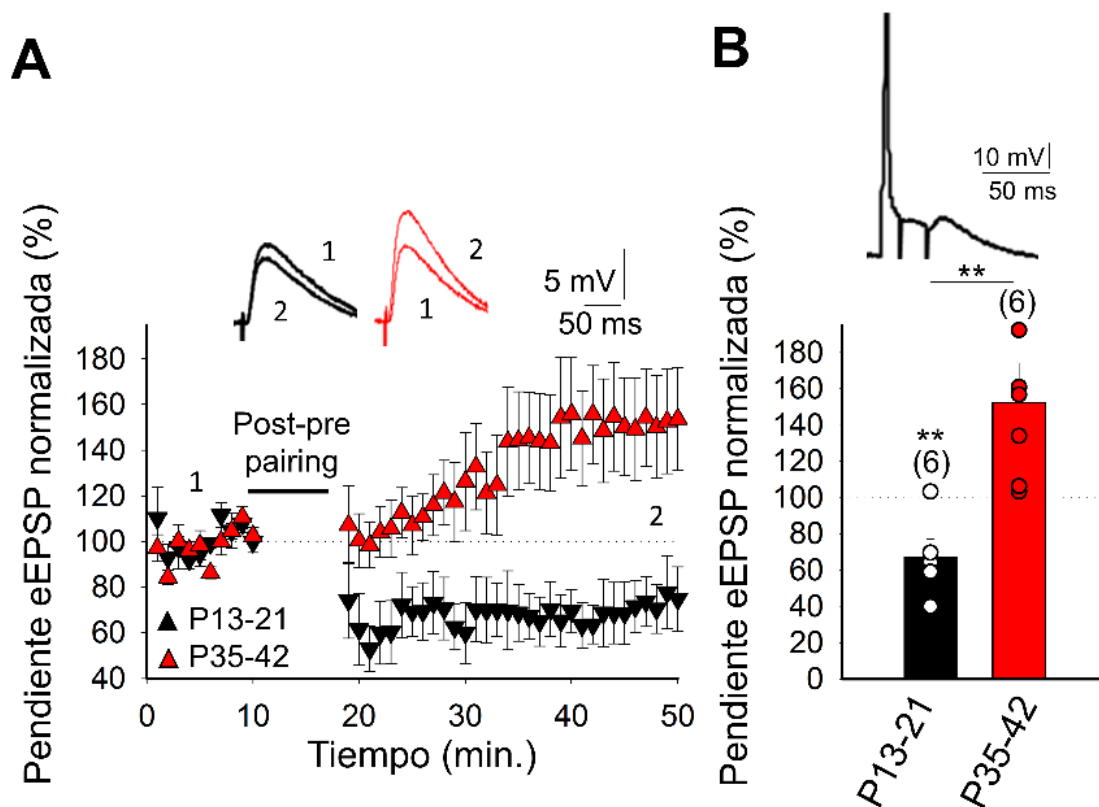


Figura 60: LTD cambia a LTP durante el desarrollo usando un protocolo consistente en parear un potencial de acción postsináptico seguido de dos eEPSPs. (A) Curso temporal que muestra como el protocolo induce LTD a P13-21 (triángulos negros,  $N = 6$ ). El mismo protocolo de plasticidad induce una LTP durante la quinta semana (triángulos rojos,  $N = 13$ ). Las trazas muestran los EPSPs antes (1) y 30 min después (2) de la aplicación del protocolo de plasticidad. (B) Resumen de los resultados. \*\*  $p < 0.01$ , prueba t de Student.

**4.2.19.2. LA LTD INDUCIDA CON UN PROTOCOLO CONSISTENTE EN PAREAR 100 VECES UN EPSP CON DOS POTENCIALES DE ACCIÓN POSTSINÁPTICO CAMBIA A LTP CON EL DESARROLLO**

El cambio de LTD a LTP está presente cuando se aplica un protocolo de plasticidad que consiste en aplicar el pareamiento (100 veces) de dos potenciales de acción postsinápticos seguidos 18ms después de la estimulación presináptica. Se observó LTD a P13-21 ( $72 \pm 10 \%$ ,  $n = 6$ ) pero cuando se aplicó el mismo protocolo a P35-42 Se observó una LTP ( $146 \pm 9 \%$ ,  $n = 6$ , Fig. 61A,B)

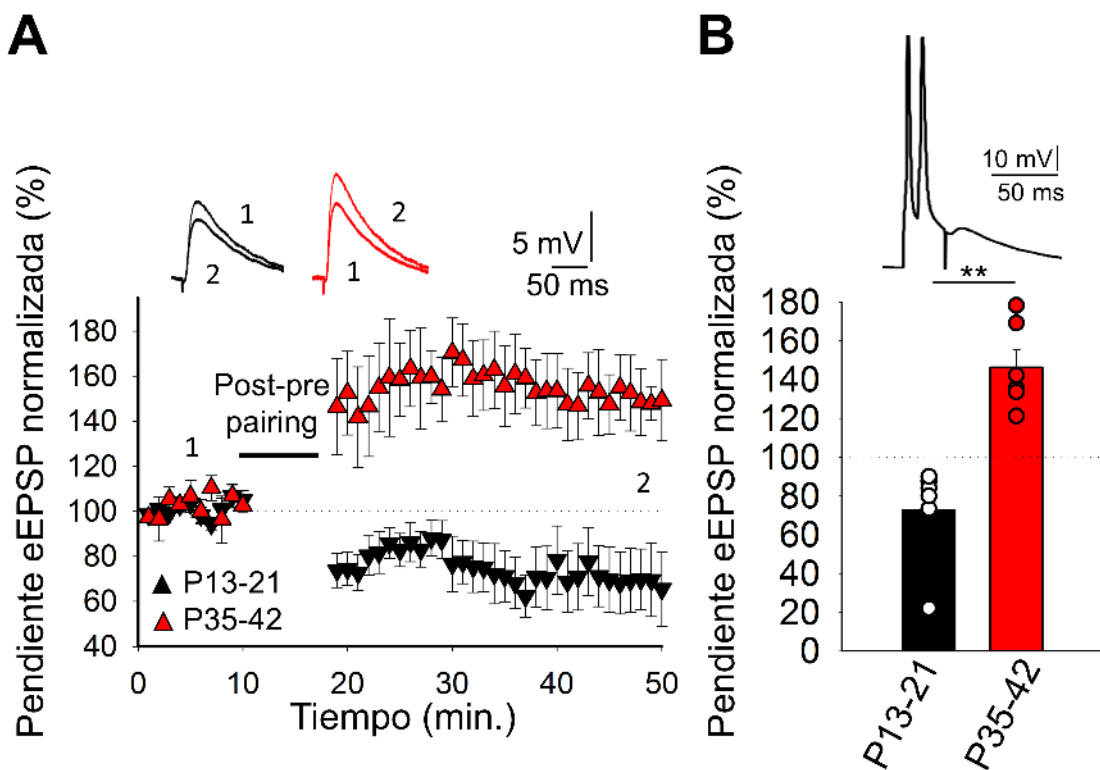


Figura 61: LTD cambia a LTP durante el desarrollo usando un protocolo consistente en parear un eEPSP con dos potenciales de acción postsinápticos. (A) Curso temporal que muestra como el protocolo induce LTD en P13-21 (triángulos negros,  $N = 6$ ). El mismo protocolo de plasticidad induce LTP durante la quinta semana (triángulos rojos,  $N = 13$ ). Las trazas muestran los EPSPs antes (1) y 30 min después (6) de la aplicación del protocolo de plasticidad. (B) Resumen de los resultados. \*\*  $p < 0.01$ , prueba t de Student.



**4.2.19.3. LA LTD INDUCIDA CON UN PROTOCOLO CLÁSICO DE LTD (15 MINUTOS, 1HZ) CAMBIA A LTP CON EL DESARROLLO**

El cambio de LTD a LTP está presente usando un protocolo de plasticidad que induce LTD en estadios tempranos del desarrollo, el cual consiste en aplicar dos pulsos en un intervalo de 40 ms, a 1Hz de frecuencia. Se observó LTD a P13-21 ( $67 \pm 12\%$ ,  $n = 6$ ) pero cuando se aplicó el mismo protocolo en P35-42 se observó una LTP ( $145 \pm 12\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 62A,B).

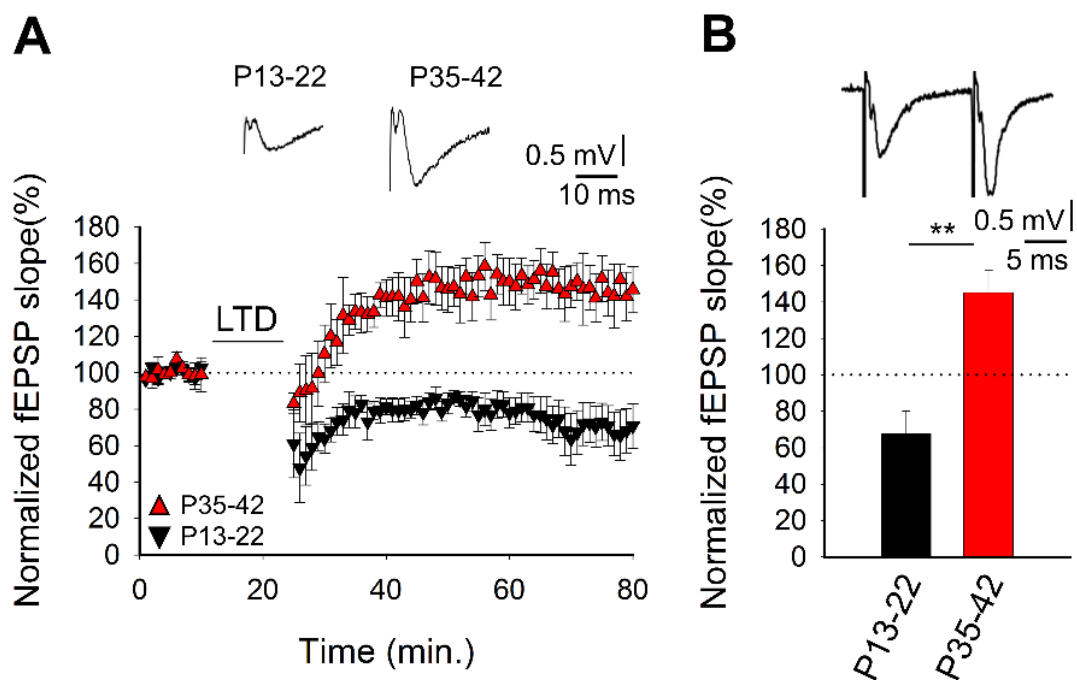


Figura 62: La LTD inducida con un protocolo clásico de LTD (15 minutos, 0.1Hz) cambia a LTP con el desarrollo. (A) Curso temporal que muestra como el protocolo induce LTD a P13-21 (triángulos negros,  $N = 6$ ). Esta LTD cambia a LTP durante la quinta semana (triángulos rojos,  $N = 6$ ). Las trazas muestran el EPSP antes (1) y 30 min después (6) de la aplicación del protocolo. (B) Resumen de los resultados. \*\*  $p < 0.01$ , prueba t de Student.

**4.2.19.3.1. EL CAMBIO DE LTD A LTP CON EL PROTOCOLO CLÁSICO DE LTD (15 MINUTOS, 0.1HZ) ESTÁ MEDIADO POR RECEPTORES DE ADENOSINA A<sub>1</sub>**

Se demostró que al aplicar un agonista de receptores de adenosina A<sub>1</sub>, CPA 50 nM, en rodajas de ratones jóvenes (P13-21) se impide la LTD (108 ± 17 %, n = 6), mientras que por otro lado al antagonizar los receptores de adenosina con 8-CPT en ratones adultos (P35-42) impide el cambio a LTP (90 ± 19 %, n = 6, Fig. 63A,B)

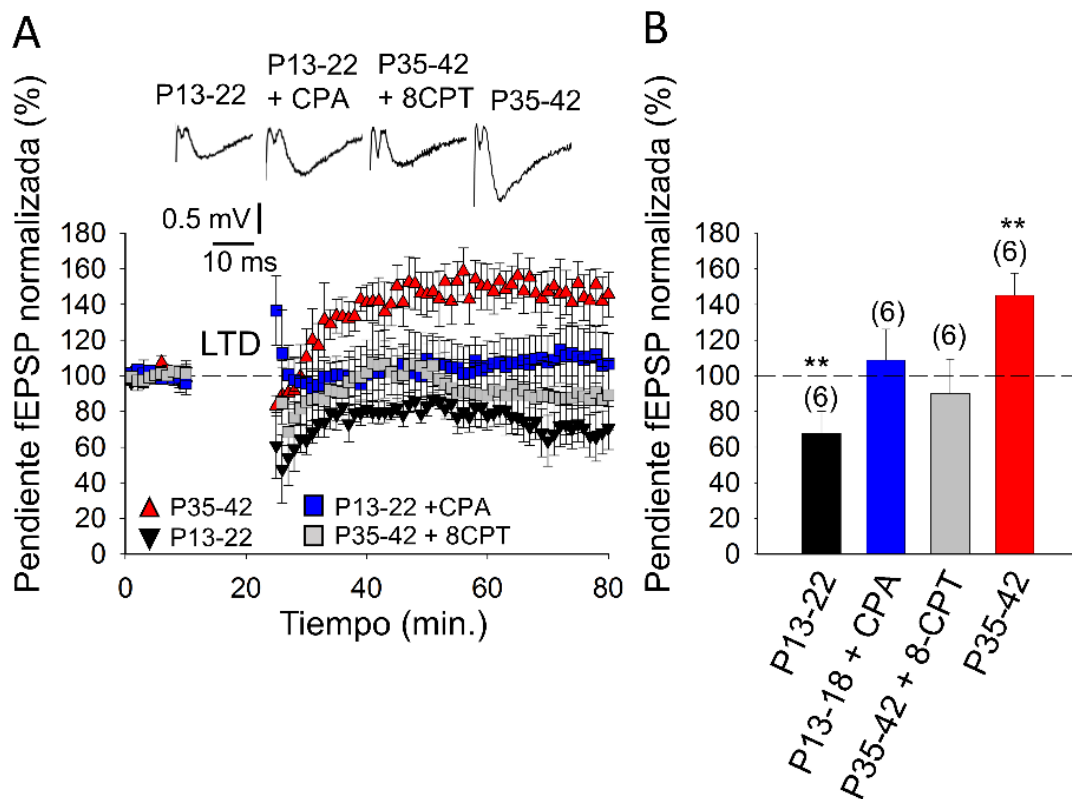


Figura 63: El cambio de LTD a LTP con el protocolo clásico de LTD (15 minutos, 1Hz) está mediado por receptores de adenosina A<sub>1</sub>. (A) curso temporal que muestra como protocolo induce LTD en P13–21 (triángulos negros, N = 6). Esta LTD cambia a LTP durante la quinta semana (triángulos rojos, N = 6). Las trazas muestran el EPSP antes (1) y 30 min después (6) de la aplicación del protocolo. (B) Resumen de los resultados. \*\* p < 0.01, prueba t de Student.

## 4.2.20. EL CAMBIO DE LTD A LTP ESTÁ PRESENTE *IN VIVO*

Se aplicó un protocolo clásico de LTD (15 minutos, 1Hz), a ratones anestesiados y sujetos a un estereotáxico, se obtuvo LTD en ratones de 18-21 días de edad ( $84 \pm 6 \%$ ,  $n = 5$ ) mientras que en ratones P35-42 días se obtuvo un cambio a LTP ( $145 \pm 12 \%$ ,  $n = 5$ ) similar a lo obtenido en rodajas. Fig 64A-C

### 4.2.20.1. LA LTP *IN VIVO* ESTÁ MEDIADA POR RECEPTORES DE ADENOSINA A1

Al aplicar el protocolo de (15 minutos, 1Hz) a ratones P35-42 a los cuales previamente se le administró una inyección intrahipocámpica de 8-CPT  $2\mu\text{M}$  en la zona inmediatamente próxima a la de registro, se observó un bloqueo ( $109 \pm 9 \%$ ,  $n = 5$ ) de la LTP obtenida en condición control. (Fig 64B,C).

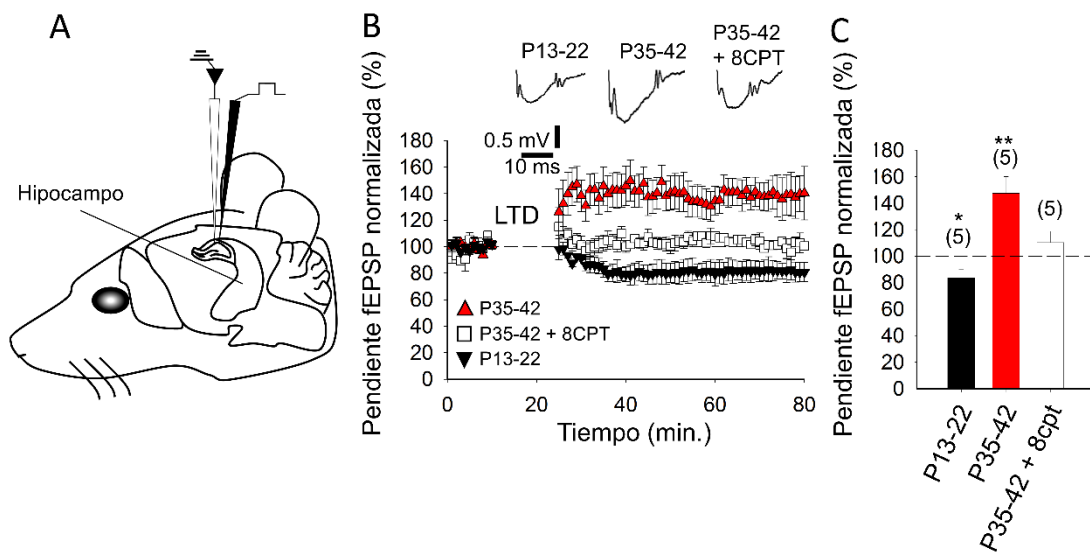


Figura 64: El cambio de LTD a LTP está presente *in vivo* e involucra a los receptores de adenosina. (A) Esquema que muestra el montaje experimental. (B) Curso temporal que muestra como al aplicar el protocolo de (15 minutos, 1Hz) produce una LTD en ratones jóvenes P13-22 (triángulos negros) y una LTP en ratones adultos (P35-42 triángulos rojos), y como impide la LTP en ratones adultos cuando se aplica 8-CPT previamente (cuadrados blancos).



## 5.DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en rodajas de cerebelo de ratón muestran que la activación de los receptores de kainato presinápticos en el cerebelo, en las sinapsis PF-PuC, provoca una facilitación de la transmisión sináptica/liberación de glutamato. Así mismo, el análisis de esta modulación sugiere la presencia de un acoplamiento de KARs a través de la actividad de la  $Ca^{2+}$ -calmodulina/AC/cAMP/PKA, pero independientemente de la activación de la proteína G.

### **5.1. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO DE RATÓN**

#### **5.1.1.LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UN AUMENTO DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DE CEREBELO DE RATÓN**

Los resultados de este estudio, registrando corrientes de tipo NMDA en rodajas de cerebelo, permitió determinar que el efecto de facilitación observado se debe a la activación de receptores de tipo kainato. La facilitación de la transmisión sináptica se podía apreciar cuando los receptores AMPA estaban bloqueados, sin embargo, se previno por completo en presencia de NBQX lo cual confirmó que este efecto se debe, en efecto, a la activación de los receptores de kainato. Por ello, se puede afirmar que la activación de KARs en la sinapsis PF-PuC provoca una facilitación de la transmisión sináptica/liberación de glutamato.

### **5.1.1.1. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARs EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSI ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PUC) DE CEREBELO ES PRESINÁPTICO**

Se determinó la presencia presináptica de KARs a través de diferentes análisis, como, por ejemplo, el ratio de pares de pulsos. De esta manera, una clara reducción en el PPR de los eEPSCs observados con aplicación de KA, sugiere un aumento en la probabilidad de liberación. En segundo lugar, se evaluó la proporción de fallos sinápticos en respuesta a la aplicación de KA, encontrando que, con KA presente, la proporción de fallos disminuyó significativamente, lo que indica un aumento en la probabilidad de liberación de glutamato.

Además, los efectos de KA observados en los eEPSCs mediados por los receptores de tipo NMDA y AMPA fueron similares respaldando la presencia de un mecanismo de acción presináptico.

Por tanto, tomando en conjunto los tres análisis independientes, se puede concluir que la facilitación observada involucra un locus de acción presináptico para los KARs que actúan en la sinapsis PF-PuC. A pesar de estos resultados, queda por dilucidar si la regulación presináptica llevada a cabo por KA en la sinapsis PF-PuC es debida a la actividad de los receptores de kainato localizados subcelularmente en el terminal/axón o en el compartimento somatodendrítico. Para determinar directamente la compartimentación presináptica de los KAR, trabajos futuros necesitarán realizar inmunolocalización de alta resolución (basada en etiquetado de immunogold) del receptor (dependiendo de la disponibilidad de anticuerpos de alta afinidad con especificidad de la subunidad KAR apropiada); y bloqueo de KARs utilizando antagonistas encapsulados y usar la fotólisis intracelular de este compuesto para demostrar la ubicación subcelular de los canales iónicos del receptor como ya se han hecho por ejemplo con los receptores de tipo NMDA, (Rodríguez-Moreno et al., 2011; Reeve et al., 2012).

### **5.1.1.2. LA FACILITACIÓN DE TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRESINÁPTICOS EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) INVOLUCRAN LA RUTA ADENILATO CICLASA/ AMP CÍCLICO/PROTEÍNA QUINASA A**

Correspondiendo con estudios previos en el hipocampo y el córtex (RodríguezMoreno y Sihra, 2004, 2013; Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), la inhibición de PKA por el análogo de nucleótidos cíclicos permeable, cAMP-Rp, condujo a la anulación de la potenciación de la transmisión sináptica/liberación de glutamato mediada por KA en la sinapsis PF-PuC. La congruencia del mecanismo ha sido respaldada al observarse que la inhibición de la actividad catalítica de PKA a través de H-89 eliminó la facilitación mediada por KA. De forma similar, la activación directa de adenilato ciclasa por la preincubación con forskolina, impidió el efecto facilitador del KA. Por ello, y tomados en conjunto, estos datos sugieren de manera consistente que la señalización de AC/cAMP/PKA sustenta la modulación facilitadora de la transmisión sináptica/liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC.

### **5.1.1.3. LA PROTEÍNA KINASA C Y LAS PROTEÍNAS G SE REQUIEREN EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTUACIÓN DE KAR EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC)**

Por otra parte, no se observó una facilitación de la transmisión sináptica al activar los kar en presencia de Toxina pertÚsica, indicando que no requiere de proteína G que medie la iniciación/transducción de la cascada AC/cAMP/PKA involucrada en la liberación de glutamato mediada por KAR presináptico. Por ello, el siguiente paso en este estudio fue estudiar el rol del  $Ca^{2+}$  como iniciador de una cascada de señalización independiente de proteína G en la sinapsis PF-PuC.

#### **5.1.1.4. LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO REQUIERE UN AUMENTO DE $Ca^{2+}$ EN EL CITOSOL EN SINAPSIS PF-PuC**

Los KARs pueden mediar la entrada externa de  $Ca^{2+}$  a través de actividad ionotrópica que despolarizaría los terminales activados por canales de  $Ca^{2+}$ . La influencia directa del  $Ca^{2+}$  vía KARs permeables a  $Ca^{2+}$  como tal es también posible (Fletcher y Lodge, 1996; Scott et al., 2008). De manera particular, los experimentos realizados en el presente estudio muestran que un bloqueo de KAR permeables a  $Ca^{2+}$  a través del inhibidor selectivo como la filanthotoxina, impiden la facilitación sináptica mediada por KA, lo que sugiere que la entrada de  $Ca^{2+}$  vía KARs y canales de calcio es un requisito necesario para la modulación facilitadora. Por tanto, resultaría interesante que, aunque se piensa que los KARs permeables a  $Ca^{2+}$  suelen prevalecer de forma temprana durante el desarrollo neuronal, estos receptores se mantienen con actividad en el cerebelo de ratones jóvenes adultos. Se podría plantear la hipótesis de que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de KAR puede ser amplificada por medio de la movilización de  $Ca^{2+}$  desde los reservorios intracelulares, como ha sido reportado de modulaciones similares en sinapsis hipocámpales (Lauri et al., 2003; Scott et al., 2008).

Los resultados obtenidos en este estudio apoyaron la idea de que las reservas de  $Ca^{2+}$  intracelular ejercen un rol crítico, ya que se mostró que el tratamiento con thapsigargina (para agotar las reservas de  $Ca^{2+}$  intracelular), abolió la regulación facilitadora regulada por KARs. Así mismo, y corroborando esta hipótesis, el tratamiento con rianodina para inhibir de forma selectiva la liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  (Berridge, 1998), evidenció que la entrada de  $Ca^{2+}$  vía KARs y canales de calcio induce la movilización de  $Ca^{2+}$  desde las reservas intracelulares para provocar la modulación estudiada. Una vez demostrado que la entrada de  $Ca^{2+}$  vía KARs y canales de calcio, y el consecuente incremento de  $Ca^{2+}$  debido a la movilización de  $Ca^{2+}$  desde las reservas intracelulares realmente necesaria para la facilitación de KA en la transmisión sináptica en la sinapsis PF-PuC, seguidamente se determinó cómo podría un aumento del  $Ca^{2+}$  citosólico acoplarse a la señalización establecida de AC/cAMP/PKA que media la facilitación por KARs.



### **5.1.1.5. LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO REQUIERE $Ca^{2+}$ -CALMODULINA EN LA SINAPSIS PF-PuC**

Según estudios anteriores, es posible que el aumento en el  $Ca^{2+}$  citosólico active la AC dependiente de  $Ca^{2+}$  presente en los terminales de las fibras paralelas. Se han descrito 8 tipos de ACs, sin embargo, AC1 y AC8 son dos miembros de la familia que han mostrado que se activan por  $Ca^{2+}$ -calmodulina, siendo abundantes en el sistema nervioso central (para revisión ver Cooper, 2003; Wang y Storm, 2003). Curiosamente, apoyando su importancia para esta hipótesis, estudios con doble *knockouts* de AC1 y AC8 han mostrado que los ACs de  $Ca^{2+}$ -calmodulina son, en efecto, esenciales para la elevación de cAMP dependiente de  $Ca^{2+}$  (Wong et al., 1999). Utilizando los antagonistas de la calmodulina W-7 y CMZ, los resultados obtenidos muestran que la inhibición de la función de la  $Ca^{2+}$ -calmodulina elimina la modulación presináptica mediada por KAR en rodajas cerebelares. Esto apoya la hipótesis de que, tras la activación de KAR y la elevación de  $Ca^{2+}$  citosólico, un acoplamiento de  $Ca^{2+}$ -calmodulina dependiente puede activar AC1 y/o AC8, y por tanto extenderse a la iniciación de la cascada AC/cAMP/PKA, promoviendo así la facilitación sináptica a través del incremento de la liberación del neurotransmisor en las sinapsis PF-PuC.

### **5.1.2. LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE KAINATO PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PUC) DE CEREBELO DE RATÓN**

Los resultados de este estudio en rodajas de cerebelo de ratón muestran, además de un efecto de facilitación de la transmisión sináptica, que la activación de KARs presinápticos en el cerebelo en las sinapsis PF-PuC, median una depresión de la misma.

### **5.1.2.1. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO POR 3 $\mu$ M KA PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA AMPLITUD EN LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EVOCADAS DE NMDA EN LAS SINAPSIS ENTRE FIBRAS PARALELAS Y CÉLULAS DE PURKINJE (PF-PuC) DEL CEREBELO**

La disminución observada en las eEPSCs en las sinapsis PF-PuC se debe a una disminución en la liberación de glutamato, que fue monitorizada, al igual que en los experimentos anteriormente comentados, a través de las corrientes mediadas por el receptor de tipo NMDA (con los receptores AMPA antagonizados por GYKI53655). Al aplicar KA y activar los receptores de kainato se observa una depresión de la transmisión sináptica, sin embargo, cuando se aplica KA en presencia de NBQX no se observa dicha depresión, determinando así el papel específico de los KARs en la regulación en la depresión de la transmisión sináptica es claro.

### **5.1.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARs EN LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS FIBRAS PARALELAS Y LAS CÉLULAS DE PURKINJE (FP-PuC) DE CEREBELO ES PRESINÁPTICO**

Al igual que ocurre en el efecto de facilitación, los efectos de KA observados en las eEPSCs mediadas por los NMDAR y AMPAR fueron similares.

Este resultado sugiere un locus de acción presináptico de los KARs que actúan en la sinapsis PF-PuC, provocando una depresión de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC.

### **5.1.2.3. LA INHIBICIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA MEDIADA POR KAR EN LA SINAPSI PF-PUC DEPENDE DE LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE CAMP**

Al igual que ocurre con el fenómeno de facilitación, la inhibición de la PKA por el análogo de nucleótidos cíclicos permeables a las células cAMP-Rp, conduce a un bloqueo de la depresión de la transmisión sináptica mediada por KA en la sinapsis PF-PuC. De igual manera, se observó que la inhibición de la actividad catalítica de PKA por H-89 eliminó la depresión mediada por KA. Esto indica que la inhibición de la transmisión glutamatérgica mediada por KAR en esta sinapsis requiere la vía de señalización AC/cAMP/PKA.

Así mismo, al igual que ocurre en el fenómeno de facilitación mediada por KA, la proteína quinasa C no está implicada en la inhibición de la transmisión sináptica, siendo prueba de ello los resultados obtenidos al utilizar calphostina C para inhibir dicha quinasa. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en el fenómeno de facilitación, los mecanismos que median la inhibición de la liberación de glutamato mediada por KAR no implican la activación del complejo calcio-calmodulina para la activación de AC en la sinapsis PF-PuC, ya que al utilizar el antagonista de la calmodulina W-7, así como calmidazolium, la depresión no se vio bloqueada, mostrando así que el complejo de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina presináptico no es necesario para la depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR en la sinapsis PF-PuC.

### **5.1.2.4. LA DEPRESIÓN DE LA AMPLITUD EN LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EVOCADAS DE NMDA MEDIADA POR KAR REQUIERE PROTEÍNA G EN LAS SINAPSI PF-PuC**

En contraste con el mecanismo que media el aumento de la liberación de glutamato, para la depresión, impedir el funcionamiento correcto para la proteína G mediante el tratamiento con PTx impidió la depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR, mostrando que existe una transducción/iniciación mediada por proteína G, seguida de una señalización de cAMP para la subsecuente activación de PKA. Esto apoyaría los resultados donde se observa que la facilitación tiene una cinética rápida

característica de un mecanismo ionotrópico, mientras que la depresión, como se puede observar, tiene una recuperación lenta, indicando la posible acción de receptores metabotrópicos.

#### **5.1.2.5. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LAS SINAPSIS FP-CP NO ESTÁ MEDIADA POR KAR PERMEABLE AL CALCIO Y NO REQUIERE LA LIBERACIÓN DE CALCIO DE LAS RESERVAS INTRACELULARES**

En el contexto habitual, los KAR pueden mediar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  externo a través de actividad ionotrópica (Fletcher y Lodge, 1996; Perkinton y Sihra, 1999; Scott et al., 2008), o el  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser liberado de los reservorios intracelulares, sin embargo, en los resultados aquí mostrados, un bloqueo de KAR permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  a través del inhibidor selectivo philantotoxina, o a través del tratamiento de las rodajas con ryanodine, thapsigargina o nimodipina, no impidió la depresión sináptica mediada por KA, descartando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de KARs o la liberación de calcio desde las reservas intracelulares como participantes en el proceso de señalización que media la depresión observada de la liberación de glutamato mediada por la activación de KAR., al contrario de lo que ocurre en el fenómeno de facilitación de la transmisión sináptica estudiada.

Como ya se ha reportado la activación de los receptores de kainato no presentan esta propiedad bifásica en otras regiones como puede ser corteza, hipocampo o amígdala. (Negrete-Díaz et al, 2012, Andrade-Talavera et al, 2012,2013) et al, Sería interesante explorar la posible función de dicha actividad bifásica de los receptores de kainato, si se deben a la activación de diferentes receptores de kainato, ionotrópicos y metabotrópicos.

## **5.2. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA SINAPSI ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFFER Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) DEL HIPOCAMPO DE RATÓN**

### **5.2.1. LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE KAINATO PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LAS SINAPSI ESTABLECIDAS ENTRE LAS COLATERALES SCHAFFER Y LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) DEL HIPOCAMPO DE RATÓN**

Como se indicó, en el hipocampo los KARs median una depresión de la liberación de glutamato en las sinapsis SC-CA1 y tienen un efecto bifásico sobre la liberación en las sinapsis de MF-CA3, con dosis bajas de KA que median un aumento en la liberación de glutamato mientras que dosis relativamente altas que producen una disminución.

Los resultados demuestran por primera vez que los KAR están fisiológicamente presentes en las sinapsis SC-CA2 controlando la liberación de glutamato mediante un mecanismo que involucra a la PKA, y que por tanto dicho mecanismo en el hipocampo no se limita únicamente a las sinapsis SC-CA1 o MF-CA3 y se extiende a la región CA2 del hipocampo. A partir de estos resultados, está claro que la activación de presináptica Los KAR producen una disminución en la liberación de glutamato en las sinapsis SC-CA2.

### **5.2.2. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS KARs EN LA DISMINUCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSI ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES SCHAFFER Y LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) ES PRESINÁPTICO**

Esta modulación implica un acoplamiento de los receptores de kainato a la actividad de PKA, por la activación de una proteína G. Además, los resultados indican que los KARs que median esta acción tienen un locus presináptico. Los tres enfoques diferentes utilizados son indicativos de una localización presináptica para los KAR que modulan la liberación de glutamato en estas sinapsis, primero, encontramos un aumento en el PPR de los eEPSCs después de la aplicación de KA para ambos eEPSCs mediadas por receptores de tipo NMDA y AMPA, lo que sugiere un cambio en la probabilidad de liberación. En segundo lugar, se analizó el  $1/CV^2$  frente a la media amplitud de los eEPSCs antes y después de la aplicación KA, consistente con un locus presináptico, los puntos experimentales siguieron una distribución por debajo de la diagonal (Brock et al., 2020). Finalmente, el análisis de mEPSCs mostró un cambio en la frecuencia y no en la amplitud lo que es consistente con un lugar de acción presináptico para KAR.

Por lo tanto, los diferentes datos obtenidos de diferentes análisis son todos indicativos de una acción presináptica para los KARs. Aunque que los KARs que median esta disminución de la liberación de glutamato son presinápticos, una vez más no sabemos exactamente si se localizan en los axones de las neuronas presinápticas. Por lo que para determinar inequívocamente la ubicación presináptica de los KAR, se requieren más experimentos como la realización de grabaciones emparejadas para grabar simultáneamente neuronas presinápticas y postsinápticas como se hace con NMDAR (Reeve et al., 2012; Rodríguez-Moreno et al., 2010, 2011, 2013; Rodríguez-Moreno & Paulsen, 2008).

### **5.2.3. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRESINÁPTICOS EN LAS SINAPSIS ESTABLECIDAS ENTRE LAS COLATERALES SCHAFFER Y LA REGIÓN CA2 (SC-CA2) MEDIAN LA DEPRESIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA A TRAVÉS DE LA RUTA ADENILATO CICLASA/ AMP CÍCLICO/ PROTEÍNA QUINASA A**

Los resultados obtenidos en las sinapsis SC-CA2 donde la depresión de la liberación de glutamato implica la participación de PKA son similares a los encontrados en otras regiones del hipocampo y en otras áreas del cerebro como el la amígdala y el cerebelo (NegreteDíaz et al., 2006, 2012). Indicando así que esto puede ser un mecanismo general en el cerebro por el cual los receptores de kainato situados en el lado presináptico de la sinapsis modulan la liberación de glutamato para controlar los niveles de glutamato presentes en la hendidura sináptica (Rodríguez-Moreno & Sihra, 2004; Negrete-Díaz et al, 2007; Andrade-Talavera et al., 2012, 2013; Moreno & Sihra, 2013).

### **5.2.4. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR KARs EN LAS SINAPSIS SC-CA2 REQUIERE LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS G**

Curiosamente, en las sinapsis SC-CA2 encontramos una dependencia de proteínas G mediante la aplicación de toxina Pertussica que alteran su funcionamiento. Este mecanismo también es similar a lo que se ha encontrado en el hipocampo en las sinapsis SC-CA1 y en las sinapsis MF-CA3 cuando los KAR son activados por relativamente altas concentraciones del agonista. Pero a diferencia de las sinapsis SC-CA1, aquí en las sinapsis SC-CA2, se necesita actividad PKA, mientras que en las sinapsis SC-CA1, el mecanismo está delimitado por la membrana y no es necesaria la actividad de las proteínas quinasas (Frerking et al., 2001).

Es interesante apreciar que, aunque la activación de los receptores de kainato producen el mismo efecto depresivo en las distintas regiones hipocampales, el mecanismo tiene variaciones de una región a otra, delimitar que función tendrían los receptores de kainato en estas regiones podría arrojar información sobre la causa de estas diferencias y abrir más el campo de estudio.

### **5.2.5. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE KAINATO EN LAS SINAPSIS SC-CA2 NO REQUIERE CANALES DE TIPO L PERMEABLES AL CALCIO NI LIBERACIÓN DE CALCIO DE LAS RESERVAS INTRACELULARES**

También es interesante señalar que una disminución en la liberación de glutamato, mediada por KAR presinápticos no necesita elevaciones de  $Ca^{2+}$  intracelular (como se observa aquí en las sinapsis SC-CA2 y en las sinapsis MF-CA3 y el cerebelo (Negrete-Díaz et al., 2006). Por el contrario, los aumentos en la liberación de glutamato observados en otras sinapsis cuando los KAR son activados (MF-CA3, cerebelo, corteza), siempre implican elevaciones en los niveles de calcio intracelular (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2004, 2013). Lo más probable es que esto se deba al hecho de que los aumentos en la liberación de glutamato mediados por los KARs presinápticos no necesitan la actividad de la proteína G, pero necesitan la activación de la adenilato ciclasa, que normalmente se activa por  $Ca^{2+}$ -calmodulina cuando no es activada por una proteína G (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013). La razón por qué en las sinapsis SC-CA1 y aquí en SC-CA2 solo se observa una depresión de la liberación de glutamato (y no un aumento) de forma independiente de la concentración de agonista utilizada no se conoce por el momento y necesita más investigación.

### **5.2.6. LOS KARs QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUK1 ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO OBSERVADA EN LAS SINAPSIS SC-CA2**

En las sinapsis SC-CA1, la activación de KAR por domoate o ATPA no modifica la frecuencia ni la amplitud de los mEPSCs (Partovi & Frerking, 2006; Sallert et al., 2007). Por el contrario, en las sinapsis SC-CA2, la activación de los receptores de kainato por KA produce una disminución en la frecuencia de mEPSC que está completamente bloqueada al antagonizar los receptores de kainato que contienen la subunidad GluK1. Este resultado muestra una diferencia interesante entre las sinapsis SC-CA1 y SC-CA2 e



indica que la depresión de la frecuencia de mEPSCs mediada por KARs observada en SC-CA2 se debe específicamente a los KARs que contienen la subunidad GluK1.

Por el contrario, la depresión de las respuestas evocadas (EPSC) es debido a KAR que contienen subunidades GluK1 y KAR que contienen otras subunidades diferentes. Por lo tanto, estos resultados indican una intrigante diferencia entre la modulación de la liberación espontánea y el evocado. También es interesante señalar que la recuperación de las amplitudes de los EPSCs es diferente cuando se compara el efecto KAR y el efecto KA en las rodajas tratadas con UB-P302 (antagonista de GluK1) la recuperación fue más rápida. Esto indica que la presencia de subunidades GluK1 hace que la recuperación sea más lenta, lo que puede estar relacionado con un mecanismo metabotrópico, y cuando está bloqueado, la recuperación es más rápida, como es habitual en las funciones ionotrópicas.

Se han descrito diferencias entre los mecanismos de liberación evocados y espontáneos para los NMDAR presinápticos en las sinapsis L5-L5 de la corteza visual, donde la liberación evocada se ha relacionado con mecanismos ionotrópicos y la liberación espontánea con los metabotrópicos después de la activación de los NMDARs presinápticos, (Abrahamsson et al., 2017; Bouvier et al., 2018). Parece que un mecanismo similar puede estar operando aquí, tras la activación de los KAR presinápticos.

Si bien la función de esta disminución en la liberación de glutamato en las sinapsis SC-CA2 no se conoce por el momento, puede estar involucrada en diferentes formas de refinamiento sináptico que ocurren durante el desarrollo posnatal del cerebro que involucran los receptores de glutamato y la plasticidad. (Torres-García et al., 2012; Sihra et al., 2014; Andrade-Talavera et al., 2016; Mateos-Aparicio y Rodríguez-Moreno, 2019). Además, es posible que los KAR tengan un papel relacionado con la epilepsia en esta región del hipocampo (Flores et al., 2011). Si los KAR presentes en la región CA2 del hipocampo tienen un papel en el comportamiento social o en las memorias espaciales o temporales requiere más experimentación, pero está claro que al modular la liberación de glutamato, los KARs podrían controlar directamente o afectar la relación excitación/inhibición que puede tener importantes consecuencias fisiológicas. En conclusión, se ha encontrado que los KARs están funcionalmente presentes en las sinapsis de SC-CA2 donde disminuyen presinápticamente la liberación de glutamato. Para esta acción, KAR requiere actividad G para interactuar con la adenilato ciclasa para disminuir

los niveles de cAMP y producir una depresión en la liberación de glutamato en las sinapsis SC-CA2 del hipocampo.

### **5.3. CAMBIOS EN LA PLASTICIDAD EN LA SINAPSI SC-CA1 DURANTE EL DESARROLLO HIPOCAMPAL MEDIADOS POR LOS ASTROCITOS Y LA ADENOSINA**

#### **5.3.1. OCURRE UN CAMBIO DE t-LTD A t-LTP LA SINAPSI SC-CA1 DURANTE EL DESARROLLO**

En este estudio, se muestra que la t-LTD presináptica cambia a t-LTP presináptica en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo a medida que los ratones jóvenes maduran, y se muestra que esta forma de t-LTP requiere de la activación de mGluR5 presinápticos, pero no de NMDAR. Esta t-LTP presináptica requiere también flujo de calcio a través de los canales de calcio de tipo L postsinápticos, así como la liberación de calcio de las reservas intracelulares postsinápticas. Además, esta forma de t-LTP presináptica requiere la liberación postsináptica de óxido nítrico como señal retrógrada a los astrocitos, señalización astrogliar para probablemente liberar ATP/adenosina para activar los receptores A<sub>1</sub> (AR<sub>1</sub>) presinápticos y glutamato para activar mGluR. El número y frecuencia de potenciales de acción postsinápticos necesarios para inducir STDP en el hipocampo ha sido controvertido y las diferencias encontradas se han explicado por el tamaño del EPSP inicial, la edad de los animales, el nivel de inhibición, etc (Wittenberg y Wnag, 2006; Buchanan y Mellor, 2010,). En los resultados obtenidos, está claro que parear 100 veces un EPSP de 3–5 mV de tamaño, con potenciales de acción postsinápticos a 0.2 Hz induce una plasticidad robusta.

### **5.3.2. LA t-LTP ES DE EXPRESIÓN PRESINÁPTICA**

Aunque existen incertidumbres asociadas con el análisis cuántico en el sistema nervioso central, (Malinow y Tsien, 1990; Korn y Faber, 1991; Brock et al, 2020) , en el presente trabajo, sin embargo, se presentan evidencias de cuatro enfoques diferentes para determinar el lugar de expresión de esta forma de t-LTP, todos consistentes con cambios presinápticos: porcentaje de fallos, PPRs, CV y análisis de frecuencia y amplitud de mEPSP. Por lo tanto, esta forma de LTP expresada presinápticamente aparece durante el desarrollo a través de un cambio desde t-LTD, a diferencia de cualquier otra forma de t-LTP descrita hasta la fecha (McGuinness et al 2010; Padamsey et al, 2017; Monday et al, 2018).

### **5.3.3. EL CAMBIO DE t-LTD A t-LTP OCURRE DENTRO DE UN INTERVALO TEMPORAL ESPECÍFICO ENTRE EL EPSP Y EL POTENCIAL DE ACCIÓN (PA) POSTSINÁPTICO**

Al estudiar esta forma de t-LTP, aplicando el protocolo de plasticidad, que consiste en parear un evocado y un potencial de acción postsináptico, se realizaron experimentos variando el tiempo entre éstos. observamos que el cambio de t-LTD a t-LTP ocurrió en diferentes intervalos de tiempo, de -18 a -35 ms, donde hubo una robusta t-LTD a P13–21, lo que indica que este cambio ocurre con la maduración y no se debe a un cambio durante el desarrollo que afecte al intervalo de tiempo del protocolo de plasticidad.

Es interesante señalar que, en rodajas de cerebro humano adulto, la curva STDP muestra t-LTP en intervalos de tiempo positivos y negativos amplios (0 –80 ms), lo que está de acuerdo con nuestros resultados y sugiere que las reglas de aprendizaje sináptico pueden conservarse (al menos en parte) entre especies (Testa-Silva, 2010). Además, se descubrió que el cambio de t-LTD a t-LTP está presente mediante el uso de diferentes protocolos STDP como en pareamiento entre dos potenciales de acción postsinápticos seguidos de un único potencial de acción postsináptico o cuando la estimulación presináptica única fue emparejada con dos potenciales de acción postsinápticos a 100 Hz (Fig. 57). Adicionalmente también se observó el mismo efecto que usando otros protocolos que no están relacionados con la STDP, como aplicar un protocolo clásico

deLTD (15 minutos, 1 Hz), demostrando así que no es un mecanismo único de la STDP. Finalmente este cambio de LTD a LTP también se ha observado *in vivo*.

#### **5.3.4. LA t-LTP PRESINÁPTICA REQUIERE DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO**

A diferencia de la t-LTD, la t-LTP parece no requerir NMDAR. Más bien, requiere de la activación del mGluR5 que parecen residir presinápticamente. En esta sinapsis (SC-CA1), se ha descrito que los mGluR presinápticos modulan bidireccionalmente la liberación de glutamato (Rodríguez-Moreno et al, 1998) y participan en plasticidad (Gómez-Gonzalo, 2015). Además, también se sabe que las células gliales tienen mGluR que posiblemente influyen en la plasticidad (Porter and McCarthy, 1996; Perea y Araque, 2007) aunque los datos obtenidos aquí indican que los mGluR de los astrocitos no están involucrados en esta forma particular de t-LTP. Sin embargo, los resultados obtenidos dejan claro que existe un cambio de la participación de NMDAR a mGluR en la plasticidad del hipocampo asociado con la maduración.

Se han descrito formas de LTP presinápticas (PreLTP) que dependen de NMDARs presinápticos en el hipocampo (McGinness, 2010) en la corteza entorrinal (Min et al., 1998; Jourdain et al., 2007; Savtchouk et al, 2019; Pérez-Otaño y Rodríguez-Moreno, 2019) y también se han descrito formas de preLTP independientes de los NMDARs en las sinapsis MF-CA3 del hipocampo (Nicoll y Schmitz, 2005), en el cerebelo (Salin et al, 1996), tálamo (Castro-Alamancos y Calcagnotto, 1999), subículo (Behr et al, 2009), amígdala (Lopez de Armentia y Sah, 2007), y neocorteza (Chen et al, 2009). El requisito de mGluR para algunas formas de preLTP se definió previamente en el hipocampo (Perea y Araque, 2007, Gómez-Gonzalo et al, 2015), aunque estas formas de preLTP no se indujeron utilizando protocolos de STDP. En la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo, se ha descrito una preLTP que es independiente de NMDAR (Padamsey et al, 2017), esta forma de LTP comparte características con la t-LTP presináptica que se describe aquí, pero no surge a través de un cambio de LTD observada en animales jóvenes. Es importante destacar que la preLTP descrita anteriormente no parece requerir glutamato (Padamsey et al, 2017), mientras que la pre t-LTP descrita aquí claramente depende de los mGluR activados por glutamato.

### **5.3.5. LA t-LTP OBTENIDA APLICANDO UN PROTOCOLO PRE-POST SÍ DEPENDE DE RECEPTORES POSTSINÁPTICOS DE NMDA**

Se encontró que la t-LTP postsináptica que se identificó previamente en las mismas sinapsis en animales jóvenes usando un protocolo estándar para t-LTP postsináptico, es decir, un protocolo pre-post con 5–10 ms (Andrade-Talavera, 2016); todavía está presente en P35-42 y sigue dependiendo de la activación de NMDARs ionotrópicos postsinápticos. Es importante destacar que estos resultados indican que dos formas diferentes de t-LTP (una presináptica y otra postsináptica) coinciden temporalmente.

### **5.3.6. LA t-LTP REQUIERE DE CALCIO POSTSINÁPTICO**

Al igual que otras formas de LTP, la t-LTP requiere de un aumento de  $Ca^{2+}$  en la célula postsináptica (Castillo, 2012) y, de forma similar a las formas de LTP postsinápticas independientes de NMDAR descritas anteriormente (Castillo, 2012; Padamsey y Emptage 2014; Padamsey, 2017), la t-LTP requiere la liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares. Estas características de la t-LTP del hipocampo también son comunes a otras formas de preLTP (Matyash et al 2001; Navarrete et al, 2014). Aunque las reservas internas postsinápticas no son reclutadas por mGluR, se han demostrado formas independientes de mGluR para reclutar calcio de las reservas intracelulares, como por la activación de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje que se acoplan a la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular inducida por  $Ca^{2+}$  (Johanning et al 2015).

### **5.3.7. LA t-LTP REQUIERE ÓXIDO NÍTRICO PROVENIENTE DE LA CÉLULA POSTSINÁPTICA**

Utilizando enfoques diferentes, como inhibiendo la síntesis de 2-AG o bloqueando los receptores cannabinoides ( $CB_1$ ) no se obtuvo evidencia de la participación del sistema de señalización cannabinoide en esta forma de LTP. Sin embargo, se identificó al NO

como la señal retrógrada producida por la neurona postsináptica a través del aumento de  $Ca^{2+}$ , como en otros tipos de preLTP (Castillo, 2012; Padamsey y Emptage, 2014; Padamsey et al, 2017).

### **5.3.8. LA INDUCCIÓN DE t-LTP REQUIERE LA ACTIVIDAD ASTROCITARIA**

Se encontró que la activación de  $A_1$ Rs en P13–21 convierte t-LTD en t-LTP, lo que confirma el importante papel de la adenosina y los  $A_1$ R presinápticos en el cambio de plasticidad observado. Al igual que lo mostrado en este trabajo, se ha descrito previamente un aumento en la concentración de adenosina extracelular y/o en la activación de  $A_1$ Rs con la maduración (Sebastiao et al, 2000; Rex y Kramar, 2005; Kerr et al, 2013).

Si bien la identificación de la fuente de adenosina es compleja, ya que puede ser liberada directamente de las neuronas (Jo y Schlichter 1999; Klyuch et al, 2012; Lovatt et al, 2012,) o de las células gliales (Pascual et al, 2005) o a través de los hemicanales de la unión gap glial (Huckstepet al, 2010) u otros mecanismos, los resultados sugieren que la adenosina es de origen astrocítico y, por lo tanto, que los  $A_1$ Rs presinápticos podrían aumentar su activación durante el desarrollo, al menos en parte debido al aumento en la cantidad de adenosina extracelular liberada por los astrocitos.

Esta activación de  $A_1$ Rs, a su vez, inhibe la liberación de glutamato, reduciendo el glutamato ambiental, produciendo el cambio a t-LTP en asociación con un aumento en la actividad de mGluR. Por lo tanto, parece que a P13-21, cuando la probabilidad de liberación de neurotransmisores es alta, los NMDAR están presentes y activados para mediar una depresión de la liberación de glutamato, mientras que cuando la probabilidad de liberación es baja y el número de NMDARs ha disminuido (en P35-42), los receptores metabotrópicos están mejor posicionados para responder a la baja concentración de glutamato extracelular disponible. Esto puede ser posible ya que se sabe que los receptores metabotrópicos amplifican las señales débiles, en este caso los niveles extracelulares bajos de glutamato para mediar en la potenciación de la liberación de glutamato. De hecho, mGluR5 está bien acoplado a PLC y puede afectar la maquinaria excitotóxica a través de la activación de PKC (Niswender y Conn, 2010) o Munc13, que

se ha demostrado que potencia la liberación de glutamato y está directamente involucrado en el acoplamiento de vesículas de neurotransmisores como se ha demostrado para mGluR7 (Martín et al, 2010).

Es necesario determinar si los NMDARs se acoplan mejor a los mecanismos que disminuyen que a los que aumentan la liberación de glutamato. Por el momento, se desconocen los mecanismos moleculares exactos que ocurren a nivel presináptico para la t-LTP. Por lo tanto, el aumento de adenosina de los astrocitos parece alterar la liberación de glutamato, la eficacia sináptica y la t-LTP. Sin embargo, aunque existe un claro requerimiento de que los astrocitos proporcionen adenosina, no se pueden descartar otras fuentes (Manzoni et al, 1994).

Si el aumento de la adenosina extracelular a medida que el hipocampo madura se debe a un aumento en el número de astrocitos o a una mayor liberación, o si otros componentes que participan en la inducción de esta forma de t-LTP cambian con la maduración merecen más estudios.

La probabilidad de liberación parece influir en la manifestación de LTP, con una mayor probabilidad de liberación de glutamato se favorecería la inducción de LTD y una menor probabilidad de LTP (Padamsey et al, 2017). Así, un cambio en la probabilidad de liberación puede ser el mecanismo presináptico directo responsable de los efectos observados. De hecho, observamos una disminución en la frecuencia de mEPSPs y en las pendientes de las respuestas evocadas con la maduración que depende de la activación de receptores de adenosina ( $A_1$ ). En consecuencia, los resultados son consistentes con lo descrito anteriormente que cuando hay una alta probabilidad de liberación de glutamato, es probable que las sinapsis muestren preLTD, mientras que las sinapsis con una baja probabilidad de liberación son más propensas a mostrar preLTP (Larkman et al, 1992; Ryan et al, 1996; Slutsky et al 2004; Hardingham et al 2007; Sáez y Friedlander, 2009; Padamsey et al, 2017).

La disminución de la probabilidad de liberación puede contribuir a la estabilización de los circuitos del hipocampo. De hecho, se ha demostrado una disminución en la probabilidad de liberación en las sinapsis glutamatérgicas con el desarrollo en la neocorteza en desarrollo (Reyes y Sackman, 1999; Kumar y Huguenard, 2001) el estriado (Choi y Lovinger, 1997) y en la sinapsis MF-CA3 (Bolshakov y Sielgelbaum, 1995) y CA3-CA1 (Wasling et al, 2004) en el hipocampo. Como tal, este

fenómeno parecería representar un paso esencial en la maduración de las sinapsis glutamatérgicas.

La disminución en la probabilidad de liberación de glutamato encontrada puede no ocurrir en todas las sinapsis y puede ocurrir de manera heterogénea, posiblemente solo en sinapsis con alta probabilidad de liberación como se indicó anteriormente (Wasling et al, 2004). Aunque se necesita más trabajo para comprender cómo se produce este cambio de desarrollo en la probabilidad de liberación, podría explicarse por cambios en el flujo de entrada de calcio y en la expresión de los canales de calcio presinápticos que reducen la probabilidad de liberación de vesículas (Wasling et al, 2004).

### **5.3.9. LA t-LTP REQUIERE ADENOSINA Y GLUTAMATO PROVENIENTE PROBABLEMENTE DE LOS ASTROCITOS**

Los resultados muestran como al bloquear los astrocitos mediante un quelante de calcio se impide la inducción de la t-LTP y como bajo estas condiciones es necesario activar los receptores de adenosina además de aportar glutamato al medio para poder recuperarla, por tanto, aportar al medio adenosina no parece ser el único gliotransmisor necesario para la inducción de t-LTP, sino que ATP/adenosina y glutamato parecen liberarse juntos para mediar en la inducción de t-LTP. De hecho, los astrocitos individuales pueden liberar tanto adenosina como glutamato (Covelo y Araque, 2018) y al liberar estos dos gliotransmisores, los astrocitos pueden controlar la actividad sináptica basal del hipocampo (Panatier et al, 2011) y deprimir tónicamente la neurotransmisión (Pascual et al, 2005), probablemente deprimiendo algunas sinapsis y potenciando otras (Covelo y Araque, 2018).

Además, existe la posibilidad de que el glutamato de la neurona presináptica active también a los mGluR5 presinápticos, pero que esta cantidad de glutamato o mGluR5 no sea suficiente para mediar la t-LTP y, junto con el glutamato liberado por los astrocitos, sea suficiente para la t-LTP. Por lo tanto, los datos del presente trabajo han revelado componentes importantes del mecanismo que subyace al cambio a t-LTP en la ventana de plasticidad, abriendo el camino a la manipulación farmacológica de la



plasticidad y de la t-LTP, que probablemente sea relevante para comprender las funciones del cerebro durante el desarrollo.

Una cuestión interesante que queda por explicar adecuadamente es si los astrocitos liberan ATP/adenosina y glutamato de forma tónica a medida que avanza la maduración o si la liberación de estos factores está controlada por estimulación directa, y cuál es el verdadero papel de la neurona postsináptica en la inducción de t-LTP. Aunque se necesitarán más investigaciones para abordar adecuadamente estas cuestiones.

### **5.3.10. EL ÓXIDO NÍTRICO ES NECESARIO PARA LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR POR PARTE DEL ASTROCITO Y LA INDUCCIÓN DE LA t-LTP**

Los resultados descartan la participación del sistema cannabinoide en el mecanismo de la t-LTP presináptica, sin embargo, parecen indicar que es el óxido nítrico sintetizado por la neurona postsináptica el que actuaría como señalizador para el astrocito, lo que podría estimular la liberación de gliotransmisores a través de un aumento del flujo de calcio en el astrocito (Matyash et al, 2001). Además de determinar si el NO potencia la liberación de uno o ambos gliotransmisores, sería de sumo interés identificar de que forma interaccionaría el NO con el astrocito que hasta la fecha es desconocida y suscita un gran interés en el campo.

### **5.3.11. EL CAMBIO DE LTD A LTP QUE SE OBTIENE DURANTE LA DURANTE LA MADURACIÓN ESTÁ PRESENTE APLICANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE PLASTICIDAD**

Los resultados muestran que el cambio de t-LTD a t-LTP está presente mediante el uso de diferentes protocolos STDP y de protocolos diferentes, indicando que este mecanismo no es algo exclusivo de la *spike timing-dependent plasticity*. Una pregunta importante sería determinar si este cambio en la plasticidad, que no depende de un protocolo de plasticidad concreto, durante el desarrollo es algo exclusivo del hipocampo u ocurre también en otras regiones del cerebro.

### **5.3.12. EL CAMBIO DE LTD A LTP ESTÁ PRESENTE *IN VIVO***

Adicionalmente se demostró como el cambio de LTD a LTP durante el desarrollo ocurre también *in vivo*, mientras el ratón está anestesiado, demostrando en estas condiciones que el cambio plástico surge durante el desarrollo y ocurre en el animal completo, y descartando que los fenómenos observados pudieran ser debidos a algún factor relacionado con el procedimiento de extracción, corte y preparación de las rodajas cerebrales.

Al abrir e inyectar de forma local en el hipocampo un antagonista de receptores de adenosina A<sub>1</sub> se impidió la inducción de la LTP, mostrando también que los receptores de adenosina median dicho cambio y coincidiendo con los resultados que se obtuvieron *ex vivo*, confirmando los resultados y al mecanismo propuesto.

Sería interesante investigar cual es el papel de esta LTP durante el desarrollo con el animal despierto, y si tiene alguna relación con el correcto desarrollo cognitivo con la intención de poder crear medios terapéuticos interviniendo en puntos claves de este mecanismo fisiológico, para los casos donde estas capacidades estén deterioradas.

¿Cuál podría ser la relevancia fisiológica de este cambio de la depresión presináptica a la potenciación presináptica en la plasticidad?

La verdadera influencia de la STDP en el hipocampo sigue sin estar clara y serán necesarios más estudios para determinar el papel específico de t-LTD y t-LTP en estos circuitos.

La t-LTD puede estar involucrada en el refinado de las sinapsis y, de hecho, se cree que desempeña un papel importante en la plasticidad del desarrollo, debilitando potencialmente las sinapsis excitadoras que están infrutilizadas o son irrelevantes desde el punto de vista conductual (Buonomano y Merzenich, 1998; Feldman y Bretch, 2005). La forma de t-LTP descrita aquí solo es evidente a partir de la quinta semana de desarrollo, lo que indica su relevancia desde la edad adulta temprana en adelante, cuando probablemente participará en el proceso de aprendizaje y la memoria.

La plasticidad presináptica también puede implicar cambios estructurales y puede alterar la dinámica de corta duración de la liberación de neurotransmisores, lo que contribuye al desarrollo del circuito, la modificación del equilibrio excitador/inhibidor y la adaptación sensorial (Monday et al, 2018). Aún no se ha determinado por qué algunas sinapsis, como observamos en la sinapsis CA3-CA1, muestran plasticidad presináptica o postsináptica, aunque esto puede reflejar diferentes requisitos computacionales. La t-LTP presináptica puede contribuir cambiando el circuito al modificar la dinámica a corto plazo y puede cambiar las propiedades de filtrado de las sinapsis, modificando así las propiedades computacionales de la sinapsis (Min et al, 1998; Costa et al, 2017; Tong et al, 2020). En la corteza somatosensorial, en las sinapsis L4-L2/3 y L2/3-L2/3, la STDP presenta diferentes requerimientos, lo que indica que la expresión de plasticidad pre o postsináptica es fundamental para el correcto funcionamiento de los circuitos cerebrales y que es posible que estén regulados de manera diferente (Banerjee et al, 2009, 2014). Además, como predicen algunos modelos (Costa et al, 2017), la t-LTP expresada presinápticamente puede aumentar la confiabilidad de prueba a prueba, y con la t-LTP expresada postsinápticamente puede inducir un cambio más grande en la relación señal-ruido que los cambios postsinápticos solos, como se describe en la evaluación de la corteza auditiva (Froemke, 2013). Además, los sitios de expresión múltiples pueden ser favorables para el sistema, ya que puede tener más posibilidades de plasticidad cuando se interrumpe uno.

Finalmente, los moduladores pueden afectar de manera diferente las dos formas diferentes de LTP, haciendo posible asociar comportamientos particulares con un locus de expresión particular. Por lo tanto, tanto los mecanismos presinápticos como los postsinápticos podrían contribuir a la dependencia del peso de la plasticidad (Costa et al, 2017). La coexistencia de múltiples formas de plasticidad (presináptica y postsináptica) también puede reflejar el procesamiento jerárquico de la información, lo que podría permitir que la memoria se ordene según su prominencia, como se sugiere en la amígdala (Shin et al, 2010). Casi no hay información sobre la posible influencia conductual de la LTP presináptica, un campo emergente en el que solo se han proporcionado datos para las sinapsis MF-CA3 (donde la preLTP está implicada en el aprendizaje y la memoria) (Hagena y Manahan-Vaugman, 2011) y la amígdala (donde la preLTP está implicada en la memoria de formación del miedo) (Tovote et al, 2015). En las sinapsis CA3-CA1, el papel conductual de la t-LTP presináptica queda básicamente por determinar, sin

embargo, un trabajo reciente ha sugerido que en las sinapsis CA3-CA1 los cambios presinápticos dentro del engrama sináptico pueden estar asociados con el condicionamiento del miedo dependiente del contexto, lo que sugiere que la preLTP podría estar asociada con el aprendizaje y la memoria *in vivo* (Choi et al, 2018). Se sabe que los cambios morfológicos ocurren durante los períodos críticos de plasticidad y en la edad adulta (Gollona et al, 2007; Holtmaat y Caroni, 2016), pero si esta forma de plasticidad presináptica induce plasticidad estructural no está claro en la actualidad y requerirá más estudio.

En conclusión, este trabajo demuestra que puede ser posible controlar la plasticidad de forma farmacológica manipulando la disponibilidad de adenosina (Blundon et al, 2017), lo que podría ser un objetivo interesante para mejorar la salud, el aprendizaje y la memoria.

## 6. CONCLUSIONES (Español)

1. La activación de los receptores presinápticos de glutamato tipo de kainato produce un aumento en la liberación de glutamato, seguido de una depresión de la liberación del mismo (efecto bifásico) en la sinapsis establecidas de fibras paralelas y las células de Purkinje (PF-PuC) del cerebelo de ratón.
2. La facilitación de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC del cerebelo del ratón se debe a la activación de receptores de kainato presinápticos permeables al calcio.
3. La facilitación de la liberación de glutamato mediada por los receptores de Kainato en la sinapsis PF-PuC del cerebelo del ratón requiere de la activación de una cascada de señalización de calcio calmodulina/AC/cAMP/PKA, así como niveles elevados de calcio en el citosol.
4. La depresión en la liberación de glutamato mediada por la activación de los KARs en la sinapsis PF-PuC del cerebelo de ratón se debe a la activación de receptores de kainato presinápticos.
5. La depresión en la liberación de glutamato mediada por la activación de KAR en la sinapsis PF-PuC del cerebelo del ratón requiere la activación de proteína  $G_{i/o}$  que activa una cascada de señalización AC/cAMP/PKA en la que no participa calcio-calmodulina.
6. La activación de los receptores de glutamato de tipo kainato presinápticos produce una depresión en la liberación de glutamato en la sinapsis Shaffer Colateral-CA2 (SC-CA2) del hipocampo de ratón.
7. La depresión de la liberación de glutamato en la sinapsis SC-CA2 de hipocampo de ratón requiere la activación de una cascada de señalización de calcio-calmodulina/AC/cAMP/PKA.
8. La depresión de la liberación de glutamato en la sinapsis SC-CA2 de hipocampo de ratón requiere de proteínas  $G_{i/o}$ .
9. La depresión de la liberación de glutamato en la sinapsis SC-CA2 no requiere canales de tipo L permeables al calcio ni liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares.
10. Una forma de t-LTD presináptica está presente en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo a P13-21, desapareciendo a P22-30.

11. La pérdida de t-LTD en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo no se debe a un cambio en el intervalo temporal entre estímulos pre y postsinápticos.
12. La pérdida de t-LTD en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo no implica un incremento de la inhibición GABAérgica.
13. La pérdida de t-LTD durante el desarrollo en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo implica un incremento de la inhibición mediada por la activación de receptores presinápticos de adenosina tipo 1.
14. La pérdida de t-LTD en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo requiere de un incremento de adenosina por liberación probablemente por los astrocitos.
15. El protocolo que induce t-LTD a P13-21 induce una t-LTP presináptica a P35-42 en la sinapsis CA3-CA1 de hipocampo.
16. La t-LTP presináptica que está presente en las sinapsis CA3-CA1 de hipocampo no requiere de NMDARs, pero sí de mGluR5s.
17. La t-LTP presináptica que está presente en las sinapsis CA3-CA1 de hipocampo requiere de astrocitos, que liberan glutamato y adenosina, y requieren de señalización mediada por NO.
18. El cambio de t-LTD a t-LTP está presente con otros protocolos de plasticidad diferentes
19. El cambio de t-LTD a t-LTP ocurre *in vivo*.

## 6.1. CONCLUSIONS (English)

1. Activation of presynaptic kainate-type glutamate receptors produces an increase in glutamate release, followed by a depression of glutamate release (biphasic effect) at the parallel Purkinje fiber-PuC cell (PF-PuC) synapse in the cerebellum of mouse.
2. Facilitation of glutamate release at the PF-PuC synapse in the mouse cerebellum is due to activation of presynaptic calcium-permeable kainate receptors.
3. Facilitation of kainate receptor-mediated glutamate release at the mouse cerebellar PF-PuC synapse requires activation of a calmodulin/AC/cAMP/PKA calcium signaling cascade, as well as elevated levels of calcium in the cytosol.
4. The depression in glutamate release are mediated by the activation of KARs in the PF-PuC synapse of the mouse cerebellum is due to the activation of presynaptic kainate receptors.
5. Depression in glutamate release mediated by KAR activation at the PF-PuC synapse in the mouse cerebellum requires the activation of a G proteins that activates an AC/cAMP/PKA signaling cascade in which Calcium- calmodulin.
6. Activation of presynaptic kainate-type glutamate receptors results in a depression of glutamate release at the Shaffer Collateral-CA2 (SC-CA2) synapse in the mouse hippocampus.
7. Depression of glutamate release at the mouse hippocampal SC-CA2 synapse requires activation of a calcium-calmodulin/AC/cAMP/PKA signaling cascade.
8. Depression of glutamate release at the mouse hippocampal SC-CA2 synapse implicates G-protein function.
9. Depression of glutamate release at the SC-CA2 synapse does not require calcium-permeable L-type channels or release from intracellular stores.
10. A presynaptic form of t-LTD is present at hippocampal CA3-CA1 synapses at P13-21, disappearing at P22-30.
11. Loss of t-LTD at the hippocampal CA3-CA1 synapse is not due to a change in the time interval between pre- and postsynaptic stimuli.
12. Loss of t-LTD at the hippocampal CA3-CA1 synapse does not imply increased GABAergic inhibition.

13. The loss of t-LTD during development in the CA3-CA1 synapse of the hippocampus implies an increase in the inhibition mediated by the activation of presynaptic type 1 adenosine receptors.
14. Loss of t-LTD at the hippocampal CA3-CA1 synapse requires increased adenosine release from astrocytes.
15. The protocol that induces t-LTD at P13-21 induces a presynaptic t-LTP at P35-42 at the hippocampal CA3-CA1 synapse.
16. The presynaptic t-LTP that is present in the CA3-CA1 synapses of the hippocampus does not require NMDARs, but it does require mGluR5s.
17. Presynaptic t-LTP that is present at hippocampal CA3-CA1 synapses requires astrocytes, which release glutamate and adenosine, and require NO-mediated signaling.
18. The switch from t-LTD to t-LTP is present with other different plasticity protocols.
19. The switch from t-LTD to t-LTP occurs in vivo.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abraham W. C., Bear M. F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 19, 126–130.
- ❖ Abraham W. C., Jones O. D., Glanzman D. L. (2019). Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage? *NPJ Sci. Learn.* 4:9.
- ❖ Abrahamsson, T., Chou, C. Y. C., Li, S. Y., Mancino, A., Costa, R. P., Brock, J. A., Nuro, E., Buchanan, K. A., Elgar, D., Blackman, A. V., TudorJones, A., Oyrer, J., Farmer, W. T., Murai, K. K., & Sjöström, P. J. (2017). Differential regulation of evoked and spontaneous release by presynaptic NMDA receptors. *Neuron*, 96, 839–855.
- ❖ Agrawal S. G., Evans R. H. (1986) The primary afferent depolarizing action of kainate in the rat. *Br J Pharmacol*, 87(2): 345-55.
- ❖ Andoh T., Kishi H., Motoki K., Nakanishi K., Kuraishi Y., Muraguchi A. Protective Effect of IL-18 on Kainate-and IL-1  $\beta$ -induced cerebellar ataxia in mice. *J. Immunol.* 2008;180:2322–2328.
- ❖ Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Paulsen O, Rodríguez-Moreno A. Presynaptic spike timing-dependent long-term depression in the mouse hippocampus. *Cereb. Cortex.* 2016;26:3637–3654.
- ❖ Andrade-Talavera Y., Duque-Feria P., Negrete-Díaz J.V., Sihra T.S., Flores G., Rodríguez-Moreno A. Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves  $Ca^{2+}$ -calmodulin at mossy fiber-CA3 synapses. *J. Neurochem.* 2012;122:891–899.
- ❖ Andrade-Talavera Y., Duque-Feria P., Sihra T.S., Rodríguez-Moreno A. Presynaptic kainate-receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and  $Ca^{2+}$ -calmodulin at thalamocortical synapses. *J. Neurochem.* 2013;126:565–578.
- ❖ Anwyl R. Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology.* 2009;56:735–740. Ç
- ❖ Arai A, Kessler M, Lynch G. The effects of adenosine on the development of long-term potentiation. *Neurosci. Lett.* 1990;119:41–44.
- ❖ Bahn S., Volk B., Wisden W. Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.* 1994;14:5525–5547.

- ❖ Banerjee A, et al. Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptor antagonists in mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex.* 2009;19:2959–2969.
- ❖ Banerjee A, González-Rueda A, Sampaio-Baptista C, Paulsen O, Rodríguez-Moreno A. Distinct mechanisms of spike timing-dependent LTD at vertical and horizontal inputs onto L2/3 pyramidal neurons in mouse barrel cortex. *Physiol. Rep.* 2014;2:e00271.
- ❖ Bellebaum C, Daum I, Suchan B (2012) Mechanisms of cerebellar contributions to cognition in humans. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* 3:171-184.
- ❖ Behr J, Wozny C, Fidzinski P, Schmitz D. Synaptic plasticity in the subiculum. *Prog. Neurobiol.* 2009;89:334–342.
- ❖ Bender VA, Bender KJ, Brasier DJ, Feldman DE. Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 2006;16:4166–4177.
- ❖ Berlucchi G. (2002). The origin of the term plasticity in the neurosciences: ernesto lugaro and chemical synaptic transmission. *J. Hist. Neurosci.* 11, 305–309.
- ❖ Berlucchi G., Buchtel H. A. (2009). Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning. *Exp. Brain Res.* 192, 307–319.
- ❖ Berridge M.J. Neuronal calcium signalling. *Neuron.* 1998;21:13–26.
- ❖ Bettler B., Boulter J., Hermans-Borgmeyer I., O’Shea-Greenfield A., Deneris E.S., Moll C. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: Expression in the nervous system during development. *Neuron.* 1990;5:583–595.
- ❖ Bliss TV, Collingridge GL, Morris RG. Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philos. Trans. R. Soc. Biol.* 2013;369:20130129.
- ❖ Bliss, T. V., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), 331-356.
- ❖ Blundon JA, et al. Restoring auditory cortex plasticity in adult mice by restricting thalamic adenosine signaling. *Science.* 2017;356:1352–1356.
- ❖ Bolshakov VY, Siegelbaum SA. Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science.* 1995;269:1730–1734.
- ❖ Bouvier G, Larsen RS, Rodríguez-Moreno A, Paulsen O, Sjöström PJ. Towards resolving the preNMDARs debate. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2018;51:1–7.

- ❖ Breustedt J., Schmitz D. Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* 2004;24:10093–10098.
- ❖ Brzosko Z, Mierau SB, Paulsen O. Neuromodulation of spike-timing-dependent plasticity: past, present and future. *Neuron.* 2019;103:563–58.
- ❖ Bostan, A. C., Dum, R. P., & Strick, P. L. (2018). Functional anatomy of basal ganglia circuits with the cerebral cortex and the cerebellum. *Curr. Conc. Move. Dis.*, 33, 50-61.
- ❖ Buchanan KA, Mellor JR. The activity requirements for spike timing-dependent plasticity in the hippocampus. *Front. Synaptic Neurosci.* 2010;2:11.
- ❖ Buonomano DV, Merzenich MM. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998;21:149–186.
- ❖ Bullock W.M., Cardon K., Bustillo J., Roberts R.C., Perrone-Bizzozero N.I. Altered expression of genes involved in GABAergic transmission and neuromodulation of granule cell activity in the cerebellum of schizophrenia patients. *Am. J. Psych.* 2008;165:1594–1603.
- ❖ Bureau, I., Dieudonné, S., Coussen, F., & Mulle, C. (2000). Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate. *PNAS*, 97(12), 6838-6843.
- ❖ Campbell S.L., Mathew S.S., Hablitz J.J. Pre- and postsynaptic effects of kainate on layer II/III pyramidal cells in rat neocortex. *Neuropharmacology.* 2007;53:37–47.
- ❖ Castillo PE. Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012;4:a005728.
- ❖ Castro-Alamancos MA, Calcagnotto ME. Presynaptic long-term potentiation in corticothalamic synapses. *J. Neuroscience.* 1999;19:9090–9097.
- ❖ Chen HX, Jiang M, Akakin D, Roper SN. Long-term potentiation of excitatory synapses on neocortical somatostatin-expressing interneurons. *J. Neurophysiol.* 2009;102:3251–3259.
- ❖ Chevaleyre, V., & Siegelbaum, S. A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron*, 66(4), 560–572. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.013>.
- ❖ Choi S, Lovinger DM. Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal.

- ❖ Choi JH, et al. Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation. *Science*. 2018;360:430–435. synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94:2665–2670.
- ❖ Citri A., Malenka R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18–41.
- ❖ Contractor A., Sailer A., Darstein M., Maron C., Xu J., Swanson G. Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation at mossy-fiber synapses in KA2<sup>-/-</sup> mice. *J. Neurosci*. 2003;23:422–429.
- ❖ Collingridge, G. L., Herron, C. E., & Lester, R. A. (1988). Frequency-dependent N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 399(1), 301-312.
- ❖ Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD. Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist*. 2008;14:609–625.
- ❖ Costa RP, Mizusaki BE, Sjöstrom PJ, van Rossum MC. Functional consequences of pre- and postsynaptic expression of synaptic plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. B*. 2017;372:20160153.
- ❖ Covelo A, Araque A. Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *eLife*. 2018;7:e32237.
- ❖ D'Angelo, E. (2018). Physiology of the cerebellum. *Handbook of clinical neurology*, 154, 85-108.
- ❖ De Felipe J. (2006). Brain plasticity and mental processes: cajal again. *Nat. Rev. Neurosci*. 7, 811–817.
- ❖ Delaney A.J., Jahr C.E. Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron*. 2003;36:475–482.
- ❖ De Mendonça A, Ribeiro JA. Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience*. 1994;62:385–390.
- ❖ De Vera N., Camón L., Martínez E. Cerebral distribution of polyamines in kainic acid-induced models of status epilepticus and ataxia in rats. Overproduction of putrescine and histological damage. *Eur. Neuropsychopharmacol*. 2002;12:397–405.
- ❖ De Zeeuw, C. I., Lisberger, S. G., & Raymond, J. L. (2021). Diversity and dynamism in the cerebellum. *Nature neuroscience*, 24(2), 160-167.

- ❖ Dittmer, P. J., Wild, A. R., Dell'Acqua, M. L., Sather, W. A. STIM1 Ca<sup>2+</sup> sensor control of L-type Ca<sup>2+</sup> channel-dependent dendritic spine structural plasticity and nuclear signaling. *Cell Rep.* **19**, 321–334 (2017).
- ❖ Duguid I, Sjöstrom PJ. Novel presynaptic mechanisms for coincidence detection in synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006;16:312–322.
- ❖ Feldman DE, Brecht M. Map plasticity in somatosensory cortex. *Science.* 2005;310:810–815.
- ❖ Fernandes H.B., Catches J.S., Petralia R.S., Copits B.A., Xu J., Russell T.A. High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron.* 2009;63:818–829.
- ❖ Fletcher E.J., Lodge D. New developments in the molecular pharmacology of AMPA and kainate receptors. *Pharmacol. Ther.* 1996;70:65–89.
- ❖ Frerking M., Schmitz D., Zhou Q., Johansen J., Nicoll R.A. Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3 CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J. Neurosci.* 2001;21:2958–2966.
- ❖ Froemke RC. Long-term modification of cortical synapses improves sensory perception. *Nat. Neurosci.* 2013;16:79–88.
- ❖ Grabauskas G., Lancaster B., O'Connor V., Wheal H.V. Protein kinase signalling requirements for metabotropic action of kainate receptors in rat CA1 pyramidal neurones. *J. Physiol.* 2007;579:363–373.
- ❖ Gogolla N, Galimberti I, Caroni P. Structural plasticity of axon terminals in the adult. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007;17:516–524
- ❖ Gómez-Gonzalo M, et al. Endocannabinoids induce lateral long-term potentiation of glutamate release by stimulation of gliotransmission. *Cereb. Cortex.* 2015;25:3699–3712.
- ❖ Greger IH, Watson JF, and Cull-Candy SG (2017). Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* 94, 713–730.
- ❖ Gruber, S., & Ametamey, S. M. (2017). Imaging the glutamate receptor subtypes—Much achieved, and still much to do. *Drug Discovery Today: Technologies*, 25, 27–36.
- ❖ Habas, C. (2021). Functional connectivity of the cognitive cerebellum. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 15, 642225.

- ❖ Hageña H, Manahan-Vaughan D. Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cereb. Cortex*. 2011;21:2442–2449.
- ❖ Hardingham NR, Hardingham GE, Fox KD, Jack JBJ. Presynaptic efficacy directs normalization of synaptic strength in layer 2/3 rat neocortex after paired activity. *J. Neurophysiol*. 2007;97:2965–2975.
- ❖ Harrison P.J., Barton A.J., Najlerahim A., Pearson R.C. Distribution of a kainate/AMPA receptor mRNA in normal and Alzheimer brain. *Neuroreport*. 1990;1:149–152.
- ❖ Hebb D. (1949). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. New York, NY: Wiley.
- ❖ Heifets BD, Castillo PE. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol*. 2009;71:283–306.
- ❖ Herb A., Burnashev N., Werner P., Sakmann B., Wisden W., Seeburg P.H. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron*. 1992;8:775–785.
- ❖ Herron C. E., Lester R. A., Coan E. J., Collingridge G. L. (1986). Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: a novel synaptic mechanism. *Nature* 322, 265–268.
- ❖ Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci*. 2005;6:877–888.
- ❖ Hensch T. K. (2004). Critical period regulation. *Annu. Rev. Neurosci*. 27, 549–579.
- ❖ Holtmaat A, Caroni P. Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nat. Neurosci*. 2016;19:1553–1562.
- ❖ Huckstep RT, et al. Connexin hemichannel-mediated CO<sub>2</sub>-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J. Physiol*. 2010;588:3901–3920.
- ❖ Iwasaki S, Takahashi T. Developmental regulation of transmitter release at the calyx of Held in rat auditory brainstem. *J. Physiol*. 2001;534:861–871.
- ❖ Ji Z., Stäubli U. Presynaptic kainate receptors play different physiological roles in mossy fiber and associational-commissural synapses in CA3 of hippocampus from adult rats. *Neurosci. Lett*. 2002;331:71–74.

- ❖ Jo YH, Schlichter R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat. Neurosci.* 1999;2:241–245.
- ❖ Jochenning FW, et al. Ryanodine receptor activation induces long-term plasticity of spine calcium dynamics. *Plos Biol.* 2015;13:e1002181.
- ❖ Jones E. G. (1994a). The neuron doctrine 1891. *J. Hist. Neurosci.* 3, 3–20.
- ❖ Jones E. G. (1994b). Santiago Ramón y Cajal and the Croonian lecture, March 1894. *Trends Neurosci.* 17, 190–192.
- ❖ Jones E. G. (2004). Plasticity and neuroplasticity. *J. Hist. Neurosci.* 13, 293–293.
- ❖ Josselyn S. A., Tonegawa S. (2020). Memory engrams: recalling the past and imagining the future. *Science* 367.
- ❖ Jouhanneau J.S., Ball S.M., Molnár E., Isaac J.T.R. Mechanisms of bi-directional modulation of thalamocortical transmission in barrel cortex by presynaptic kainite receptors. *Neuropharmacology.* 2011;60:832–841.
- ❖ Jourdain P, et al. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 2007;10:331–339.
- ❖ Kamiya H., Umeda K., Ozawa S., Manabe T. Presynaptic Ca<sup>2+</sup> entry is unchanged during hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J.*
- ❖ Kamiya H., Ozawa S. Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 1998;509:833–845.
- ❖ Kamiya H., Ozawa S. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre. *J. Physiol.* 2000;523:653–665. *Neurosci.* 2002;22:10524–10528.
- ❖ Kandel E. R., Tauc L. (1965). Mechanism of heterosynaptic facilitation in the giant cell of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*. *J. Physiol.* 181, 28–47.
- ❖ Kerr M, Wall MJ, Richardson MJE. Adenosine A1 receptor activation mediates the developmental shift at layer 5 pyramidal cell synapses and is determinant of mature synaptic strength. *J. Physiol.* 2013;591:3371–3380.
- ❖ Klyuch BP, Dale N, Wall MJ. Deletion of ecto-5'-nucleotidase (CD73) reveals direct action potential-dependent adenosine release. *J. Neurosci.* 2012;32:3842–3847.
- ❖ Korf J., Postema F. Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *J. Neurochem.* 1984;43:1052–1060.
- ❖ Korn H, Faber DS. Quantal analysis and synaptic efficacy in the CNS. *Trends Neurosci.* 1991;14:439–445.

- ❖ Kumar SS, Huguenard JR. Properties of excitatory synaptic connections mediated by the corpus callosum in the developing rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 2001;86:2973–2985.
- ❖ Larkman A, Hannay T, Stratford K, Jack J. Presynaptic release probability influences the locus of long-term potentiation. *Nature.* 1992;360:70–73.
- ❖ Lauri S.E., Bortolotto Z.A., Bleakman D., Ornstein P.L., Lodge D., Isaac J.T.R. A critical role of a facilitatory kainate autoreceptor in mossy fiber LTP. *Neuron.* 2001;32:697–709.
- ❖ Lauri S.E., Delany C., Clarke V.E.J., Bortolotto Z.A., Ornstein P.I., Isaac J.T. Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuropharmacology.* 2001;41:907–915.
- ❖ Lauri S.E., Bortolotto Z.A., Nistico R., Bleakman D., Ornstein P.L., Lodge D. A role for Ca<sup>2+</sup> stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron.* 2003;39:327–341.
- ❖ Lerma J., Paternain A.V., Rodríguez-Moreno A., López-García J.C. Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol. Rev.* 2001;89:971–998.
- ❖ Lisman J., Spruston N. (2005). Postsynaptic depolarization requirements for LTP and LTD: a critique of spike timing-dependent plasticity. *Nat. Neurosci.* 8, 839–841.
- ❖ Lisman J., Spruston N. (2010). Questions about STDP as a general model of synaptic plasticity. *Front. Synaptic Neurosci.* 2:140. Lømo T. (2003). The discovery of long-term potentiation. *Phil. Trans. R Soc. B Biol. Sci.* 358, 617–620.
- ❖ Lopez de Armentia M, Sah P. Bidirectional synaptic plasticity at nociceptive afferents in the rat central amygdala. *J. Physiol.* 2007;581:961–970.
- ❖ Lovatt D, et al. Neuronal adenosine release and not astrocytic ATP release mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109:6265–6270.
- ❖ Lyon L., Borel M., Carrión M., Kew J.N., Corti C., Harrison P.J., Burnet P.W., Paulsen O., Rodríguez-Moreno A. Hippocampal mossy fiber long-term depression in Grm2/3 double knockout mice. *Synapse.* 2011;65:945–954.
- ❖ Lynch G. S., Dunwiddie T., Gribkoff V. (1977). Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266, 737–739.



- ❖ Maiti A., Salles K.S., Grassi S., Abood L.G. Behavior and receptor changes after kainate lesioning of nodular cerebellum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986;25:589–594.
- ❖ Markram H., Gerstner W., Sjöström P. J. (2011). A history of spike-timing-dependent plasticity. *Front. Synapt. Neurosci.* 3:4.
- ❖ Markram H., Lubke J., Frotscher M., Sakmann B. (1997). Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275, 213–215.
- ❖ Malinow R, Tsien RW. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1990;346:177–180.
- ❖ Manabe T., Willey D.J., Perkel D.J., Nicoll R.A. Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 1993;70:1451–1459.
- ❖ Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science.* 1994;265:2098–20101.
- ❖ Martín R, et al. The metabotropic glutamate receptor mGlu7 activates phospholipase C, translocates Munc-13-1 protein, and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *J. Biol. Chem.* 2010;285:17907–17917.
- ❖ Martínez-Gallego I, Pérez-Rodríguez M, Coatl-Cuaya H, Flores G, Rodríguez-Moreno A. Adenosine and astrocytes determine the developmental dynamics of spike timing-dependent plasticity in the somatosensory cortex. *J Neurosci.* 2022 Jun 28;42(31):6038–52.
- ❖ Mateos-Aparicio P., Rodríguez-Moreno A. The impact of studying brain plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* 2019;13:66.
- ❖ Matyash V, Filippov V, Mohrhagen K, Kettenmann H. Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice. *Mol. Cell. Neurosci.* 2001;18:664–670.
- ❖ McGuinness L, et al. Presynaptic NMDARs in the hippocampus facilitate transmitter release at theta frequency. *Neuron.* 2010;68:1109–1127.
- ❖ Meredith RM, Floyer-Lea AM, Paulsen O. Maturation of long-term potentiation induction rules in rodent hippocampus: role of GABAergic inhibition. *J. Neurosci.* 2003;23:11142–11146.
- ❖ Min MY, Asztely F, Kokaia M, Kullmann DM. Long-term potentiation and dualcomponent quantal signaling in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:4702–4707.

- ❖ Monday HR, Younts TJ, Castillo PE. Long-term plasticity of neurotransmitter release: emerging mechanisms and contributions to brain function and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 2018;41:299–322.
- ❖ Navarrete M, Díez A, Araque A. Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 2014;369:20130599.
- ❖ Negrete-Díaz J.V., Sihra T.S., Flores G., Rodríguez-Moreno A. Non-canonical mechanisms of presynaptic kainate receptors controlling glutamate release. *Front. Mol. Neurosci.* 2018;20:128.
- ❖ Negrete-Díaz J.V., Sihra T.S., Delgado-García J.M., Rodríguez-Moreno A. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition converges with presynaptic inhibition mediated by Group II mGluRs and long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *J. Neural Transm.* 2007;114:1425–1431.
- ❖ Negrete-Díaz J.V., Sihra T.S., Delgado-García J.M., Rodríguez-Moreno A. Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *J. Neurophysiol.* 2006;96:1829–1837.
- ❖ Negrete-Díaz J.V., Duque-Feria P., Andrade-Talavera Y., Carrión M., Flores G., Rodríguez-Moreno A. Kainate receptor-mediated depression of glutamatergic transmission involving protein kinase A in the lateral amygdala. *J. Neurochem.* 2012;121:36–43.
- ❖ Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2018). Non-canonical mechanisms of presynaptic kainate receptors controlling glutamate release. *Front. Mol. Neurosc.*, *11*, 128.
- ❖ Nevian T, Sakmann B. Spine Ca<sup>2+</sup> signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J. Neurosci.* 2006;43:11001–11013.
- ❖ Nicoll RA, Schmitz D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005;6:863–876.
- ❖ Pascual O, et al. Astrocytic purinergic signalling coordinates synaptic networks. *Science.* 2005;310:113–116.
- ❖ Padamsey Z, Emptage N. Two sides to long-term potentiation: a view towards reconciliation. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 2014;369:20130154
- ❖ Padamsey Z, Tong R, Emptage N. Glutamate is required for depression but not potentiation of long-term presynaptic function. *eLife.* 2017;6:e29688.

- ❖ Paoletti P, Bellone C, and Zhou Q (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400.
- ❖ Panatier A, et al. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell.* 2011;146:785–798.
- ❖ Park H, Popescu A, and Poo MM (2014). Essential role of presynaptic NMDA receptors in activity-dependent BDNF secretion and corticostriatal LTP. *Neuron* 84, 1009–1022
- ❖ Parpura V, Zorec R. Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes. *Brain Res. Rev.* 2010;63:83–92.
- ❖ Partovi, D., & Frerking, M. (2006). Presynaptic inhibition by kainate receptors converges mechanistically with presynaptic inhibition by adenosine and GABAB receptors. *Neuropharmacology.*
- ❖ Pawlak V., Wickens J. R., Kirkwood A., Kerr J. N. (2010). Timing is not everything: neuromodulation opens the STDP gate. *Front. Synaptic Neurosci.* 2:146
- ❖ Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science.* 2007;317:1083–1086.
- ❖ Pérez-Otaño I, Rodríguez-Moreno A. Presynaptic NMDARs and astrocytes ally to control circuit-specific information flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116:13166–13168.
- ❖ Pérez-Rodríguez M, et al. Adenosine receptor-mediated developmental loss of spike timing-dependent depression in the hippocampus. *Cereb. Cortex.* 2019;29:3266–3281.
- ❖ Perkinton M.S., Sihra T.S. A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes) *Neuroscience.* 1999;90:1281–1292.
- ❖ Petralia R.S., Wang Y.X., Wenthold R.J. Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* 1994;349:85–110.
- ❖ Pigott BM, Garthwaite J. Nitric oxide is required for l-type Ca(2+) channel-dependent long-term potentiation in the hippocampus. *Front. Synaptic Neurosci.* 2016;8:17.

- ❖ Pinheiro P.S., Perrais D., Coussen F., Barhanin J., Bettler B., Mann J.R. GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;1004:12181–12186.
- ❖ Porter JT, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci*. 1996;16:5073–5081.
- ❖ Prius-Mengual J, Pérez-Rodríguez M, Andrade-Talavera Y, Rodríguez-Moreno A. NMDA receptors containing GluN2B/2C/2D subunits mediate an increase in glutamate release at hippocampal CA3–CA1 synapses. *Mol. Neurobiol*. 2018;56:1694–1706.
- ❖ Ramón y Cajal S. (1899/1904). *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados*. Madrid: Moya.
- ❖ Reeve J.E., Kohl M.M., Rodríguez-Moreno A., Paulsen O., Anderson H.L. Caged intracellular NMDA receptor blockers for the study of subcellular ion channel function. *Commun. Integr. Biol*. 2012;5:240–242.
- ❖ Reiner, A., & Levitz, J. (2018). Glutamatergic signaling in the central nervous system: ionotropic and metabotropic receptors in concert. *Neuron*, 98(6), 1080-1098.
- ❖ Reyes A, Sakmann B. Developmental switch in the short-term modification of unitary EPSPs evoked in layer 2/3 and layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex. *J. Neurosci*. 1999;19:3827–3835.
- ❖ Rex CS, Kramar EA, et al. Long-term potentiation is impaired in middle-aged rats: regional specificity and reversal by adenosine receptor antagonists. *J. Neurosci*. 2005;25:5956–5966.
- ❖ Rodríguez-Moreno A., González-Rueda A., Banerjee A., Upton A.L., Craig M.T., Paulsen O. Presynaptic self-depression at developing neocortical synapses. *Neuron*. 2013;77:35–42.
- ❖ Rodríguez-Moreno A., Kohl M.M., Reeve J.E., Eaton T.R., Collins H.A., Anderson H.L., Paulsen O. Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci*. 2011;31:8564–8569.
- ❖ Rodríguez-Moreno A., Paulsen O. Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat. Neurosci*. 2008;11:744–745.
- ❖ Rodríguez-Moreno A., Sihra T.S. Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J. Neurochem*. 2007;103:2121–2135.

- ❖ Rodríguez-Moreno A., Sihra T.S. Kainate receptors with a metabotropic modus operandi. *Trends Neurosci.* 2007;30:630–637.
- ❖ Rodríguez-Moreno A., Sihra T.S. Metabotropic actions of kainate receptors in the control of glutamate release in the hippocampus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011;717:39–48.
- ❖ Rodríguez-Moreno A., Sihra T.S. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 2004;557:733–745.
- ❖ Rodríguez-Moreno A., Sihra T.S. Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves  $Ca^{2+}$ -calmodulin and PKA in cerebrocortical synaptosomes. *FEBS Lett.* 2013;587:788–792.
- ❖ Rodríguez-Moreno A, Sistiaga A, Lerma J, Sánchez-Prieto J. Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. *Neuron.* 1998;21:1477–1486.
- ❖ Rozo, J. A., & Rodriguez-Moreno, A. (2015). Santiago Ramón y Cajal and Ivan Petrovich Pavlov: does complementarity exist between their theories?. *Rev. Neurolo.*, 61(3), 125-136.
- ❖ Ryan TA, Ziv NE, Smith SJ. Potentiation of evoked vesicle turnover at individually resolved synaptic boutons. *Neuron.* 1996;17:125–134.
- ❖ Sáez I, Friedlander MJ. Plasticity between neuronal pairs in layer 4 of visual cortex varies with synapse state. *J. Neurosci.* 2009;29:15286–15298.
- ❖ Salin PA, Malenka RC, Nicoll RA. Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron.* 1996;16:797–803.
- ❖ Sallert, M., Malkki, H., Segerstråle, M., Taira, T., & Lauri, S. E. (2007). Effects of the kainate receptor agonist ATPA on glutamatergic synaptic transmission and plasticity during early postnatal development. *Neuropharmacology*, 52, 1354–1365.
- ❖ Sanderson JL, Gorski JA, and Dell'Acqua ML (2016). NMDA receptor-dependent LTD requires transient synaptic incorporation of  $Ca^{2+}$ -permeable AMPARs mediated by AKAP150-anchored PKA and calcineurin. *Neuron* 89, 1000–1015.
- ❖ Sardinha VM, et al. Astrocytic signaling supports hippocampal-prefrontal theta synchronization and cognitive function. *Glia.* 2017;65:1944–1960.

- ❖ Savidge J.R., Bleakman D., Bristow D.R. Identification of kainate receptor-mediated intracellular calcium increases in cultured rat cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 1997;69:1763–1766.
- ❖ Savtchouk I, et al. Circuit-specific control of the medial entorhinal inputs to the dentate gyrus by atypical presynaptic NMDARs activated by astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116:13602–13610.
- ❖ Schmahmann JD, Guell X, Stoodley CJ, Halko MA (2019) The Theory and Neuroscience of Cerebellar Cognition. *Annu Rev Neurosci* 42:337-364
- ❖ Sebastiao AM, Cunha RA, de Mendonça A, Ribeiro JA. Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *Br. J. Pharm.* 2000;131:1629–1634.
- ❖ Shin RM, et al. Hierarchical order of coexisting pre- and postsynaptic forms of long-term potentiation at synapses in amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:19073–19078.
- ❖ Sihra T.S., Flores G., Rodríguez-Moreno A. Kainate receptors: multiple roles in neuronal plasticity. *Neuroscientist.* 2014;20:29–43
- ❖ Sihra T.S., Rodríguez-Moreno A. Metabotropic actions of kainate receptors in the control of GABA release. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011;717:1–10.
- ❖ Sihra T.S., Rodríguez-Moreno A. Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: Mechanisms. *Neurochem. Int.* 2013;62:982–987.
- ❖ Slutsky I, Sadeghpour S, Li B, Liu G. Enhancement of synaptic plasticity through chronically reduced Ca<sup>+</sup> flux during uncorrelated activity. *Neuron.* 2004;44:835–849.
- ❖ Schmitz D., Mellor J., Nicoll R.A. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science.* 2001;291:1972–1976.
- ❖ Scott R., Lalic T., Kullmann D.M., Capogna M., Rusakov D.A. Target-cell specificity of kainate autoreceptor and Ca<sup>2+</sup> store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fibers. *J. Neurosci.* 2008;28:13139–13149.
- ❖ Skrede K. K., Westgaard R. H. (1971). The transverse hippocampal slice: a well-defined cortical structure maintained *in vitro*. *Brain Res.* 35, 589–593.
- ❖ Smith T.C., Wang L.Y., Howe J.R. Distinct kainate receptor phenotypes in immature and mature mouse cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 1999;517:51–58.

- ❖ Srinivas, K. V., Buss, E. W., Sun, Q., Santoro, B., Takahashi, H., Nicholson, D. A., & Siegelbaum, S. A. (2017). The dendrites of CA2 and CA1 pyramidal neurons differentially regulate information flow in the Cortico-Hippocampal circuit. *The Journal of Neuroscience*, 37(12).
- ❖ Stahnisch F. W., Nitsch R. (2002). Santiago Ramon y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on. *Trends Neurosci.* 25, 589–591.
- ❖ Sultan S, et al. Synaptic integration of adult-born hippocampal neurons is locally controlled by astrocytes. *Neuron.* 2015;88:957–972.
- ❖ Sun, Q., Srinivas, K. V., Sotayo, A., & Siegelbaum, S. A. (2014). Dendritic Na<sup>+</sup> spikes enable cortical input to drive action potential output from hippocampal CA2 pyramidal neurons. *Elife*, 3.
- ❖ Swanson G.T., Feldmeyer D., Kaneda M., Cull-Candy S.G. Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J. Physiol.* 1996;492:129–142.
- ❖ Testa-Silva G, et al. Human synapses show a wide temporal window for spike timing-dependent plasticity. *Front. Synaptic Neurosci.* 2010;2:12.
- ❖ Tong R, Emptage NJ, Padamsey Z. A two-compartment model of synaptic computation and plasticity. *Mol. Brain.* 2020;13:79.
- ❖ Torres-García M.E., Solís O., Patricio A., Rodríguez-Moreno A., Camacho-Abrego I., Limón I.D., Flores G. Dendritic morphology changes in neurons from the prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens in rats after lesion of the thalamic reticular nucleus. *Neuroscience.* 2012;223:429–438.
- ❖ Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16:317–331.
- ❖ Turrigiano G. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a.
- ❖ Turrigiano G. G., Leslie K. R., Desai N. S., Rutherford L. C., Nelson S. B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391, 892–896.
- ❖ Turrigiano G. G., Nelson S. B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 97–107.
- ❖ Valbuena, S., & Lerma, J. (2021). Losing balance: Kainate receptors and psychiatric disorders comorbidities. *Neuropharmacology*, 191, 108558.

- ❖ Wasling P, Hanse E, Gustafsson B. Developmental changes in release properties of the CA3-CA1 synapse in rat hippocampus. *J. Physiol.* 2004;92:2714–2724.
- ❖ Witterberg GM, Wang SS-H. Malleability of spike timing-dependent plasticity at the CA3-CA1 synapse. *J. Neurosci.* 2006;26:6610–6617.
- ❖ Yamaguchi T., Hayashi K., Murakami H., Maruyama S., Yamaguchi M. Distribution and characterization of the glutamate receptors in the CNS of ataxic mutant mouse. *Neurochem. Res.* 1984;9:497–505.
- ❖ Zucker R. S., Regehr W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405.
- ❖ Zur Nedden S, et al. Intracellular ATP influences synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampus via metabolism to adenosine and activity-dependent activation of A1 receptors. *J. Neurosci.* 2011;31:6221–6234.



## **8. ANEXOS**



# Cerebellar Kainate Receptor-Mediated Facilitation of Glutamate Release Requires Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin and PKA

Rafael Falcón-Moya<sup>1</sup>, Pilar Losada-Ruiz<sup>1</sup>, Talvinder S. Sihra<sup>2</sup> and Antonio Rodríguez-Moreno<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Neurociencia Celular y Plasticidad, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain, <sup>2</sup>Department of Physiology, Pharmacology and Neuroscience, University College London, London, United Kingdom

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Inmaculada M. Gonzalez-Gonzalez,  
University of Central Lancashire,  
United Kingdom

### Reviewed by:

James P. Clement,  
Jawaharlal Nehru Centre for  
Advanced Scientific Research, India  
Elek Molnar,  
University of Bristol, United Kingdom

### \*Correspondence:

Antonio Rodríguez-Moreno  
arodmor@upo.es

**Received:** 17 March 2018

**Accepted:** 16 May 2018

**Published:** 06 June 2018

### Citation:

Falcón-Moya R, Losada-Ruiz P, Sihra TS and Rodríguez-Moreno A (2018) Cerebellar Kainate Receptor-Mediated Facilitation of Glutamate Release Requires Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin and PKA. *Front. Mol. Neurosci.* 11:195. doi: 10.3389/fnmol.2018.00195

We elucidated the mechanisms underlying the kainate receptor (KAR)-mediated facilitatory modulation of synaptic transmission in the cerebellum. In cerebellar slices, KA (3 μM) increased the amplitude of evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) at synapses between axon terminals of parallel fibers (PF) and Purkinje neurons. KA-mediated facilitation was antagonized by NBQX under condition where AMPA receptors were previously antagonized. Inhibition of protein kinase A (PKA) suppressed the effect of KA on glutamate release, which was also obviated by the prior stimulation of adenylyl cyclase (AC). KAR-mediated facilitation of synaptic transmission was prevented by blocking Ca<sup>2+</sup> permeant KARs using philanthotoxin. Furthermore, depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by thapsigargin, or inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release by ryanodine, abrogated the synaptic facilitation by KA. Thus, the KA-mediated modulation was conditional on extracellular Ca<sup>2+</sup> entry through Ca<sup>2+</sup>-permeable KARs, as well as and mobilization of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. Finally, KAR-mediated facilitation was sensitive to calmodulin inhibitors, W-7 and calmidazolium, indicating that the increased cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] sustaining KAR-mediated facilitation of synaptic transmission operates through a downstream Ca<sup>2+</sup>/calmodulin coupling. We conclude that, at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses, presynaptic KARs mediate glutamate release facilitation, and thereby enhance synaptic transmission through Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent activation of adenylyl cyclase/cAMP/protein kinase A signaling.

**Keywords:** kainate receptors, glutamate, presynaptic, Ca<sup>2+</sup>-calmodulin, PKA, slices

## INTRODUCTION

Kainate-type glutamate receptors are well established mediators of canonical, ionotropic postsynaptic synaptic transmission and, presynaptically, the receptors support a modulatory regulation of neurotransmitter release. In the latter regard, kainate receptors (KARs) evince a non-canonical metabotropic capacity, through which they effect the control of both glutamate and GABA release (for review see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b; Jane et al., 2009; Shira and Rodríguez-Moreno, 2013; Valbuena and Lerma, 2016).

At several excitatory glutamatergic synapses, the KAR-mediated modulation is found to be biphasic, such that low agonist concentrations facilitate glutamate release, as opposed to higher agonist concentrations, which inhibit neurotransmitter release (for review see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b, 2013; Lerma and Marques, 2013). How this diametrically opposite modulation is mechanistically manifest is subject of considerable debate and investigation, as is the question of the subcellular location of KARs responsible for presynaptic modulation (for review see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b, 2013; Lerma and Marques, 2013).

KARs are expressed in the cerebellar cortex in the axons of cerebellar granule cells that form parallel fibers (PF), and make excitatory synapses with Purkinje cells (PuC, Smith et al., 1999). Messenger RNA transcripts encoding for different KAR subunits (GluK1, GluK2 and GluK5) have been detected in granule cells and functional expression of KAR subtypes has been reported (Bettler et al., 1990; Herb et al., 1992; Bahn et al., 1994; Petralia et al., 1994). The subunits GluK1 and GluK2 have been detected on parallel fibers, Petralia et al., 1994). Biophysical studies with single-channel recordings have shown GluK1 activity (Swanson et al., 1996), suggesting these KARs are  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable. A biphasic action of KARs, activated by the agonist domoate, has been shown previously at PF-PuC synapse, with low agonist concentrations facilitating synaptic transmission, and higher concentrations depressing synaptic transmission (Delaney and Jahr, 2002). However, the precise mechanism of action by which KARs mediate potentiation (and depression) of synaptic transmission at PF-PuC synapses is completely unknown. Here, we have examined the mechanism underpinning the facilitatory effect of KA in cerebellar slices at synapses between granule cell terminals and Purkinje cells.

First, establishing mechanistic features of the modulation, we found that the KAR-mediated facilitation of glutamate release and synaptic transmission has an obligatory dependency on adenylyl cyclase (AC) and cAMP-mediated protein kinase A (PKA) activity. Furthermore, the KAR-mediated modulation of transmission is reliant on both external  $\text{Ca}^{2+}$  entry via  $\text{Ca}^{2+}$ -permeant KARs, and functional intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -stores. Finally, obviation of facilitation by calmodulin inhibition invokes a mechanistic coupling of KARs through  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin/AC/cAMP/PKA signaling, at PF-PuC synapses in the cerebellum.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The experiments were performed on 4–6 week old C57Bl/6 male mice obtained from Harlan Laboratories (Spain). Experiments were conducted in accordance with the European Union directive for the use of laboratory animals in acute experiments and were approved by the local Ethical Committee (Junta de Andalucía and University Pablo de Olavide, Sevilla, Spain).

### Slice Preparation

Cerebellar parasagittal slices were prepared. Briefly, after decapitation, the whole brain was removed under ice-cold buffered salt solution consisting of (in mM) 124 NaCl, 2.69 KCl, 1.25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , and 10 glucose (pH 7.2, 300 mOsm), and positioned on the stage of a vibratome slicer (Leica 1000S), and cut to obtain cerebellar slices (350  $\mu\text{m}$  thick) containing parallel fibers-Purkinje cells synapses. Slices were maintained continuously oxygenated for at least 1 h before use. All experiments were carried out at room temperature (22–25°C). During experiments, slices were continuously perfused with buffered salt solution as detailed above.

### Electrophysiological Recordings

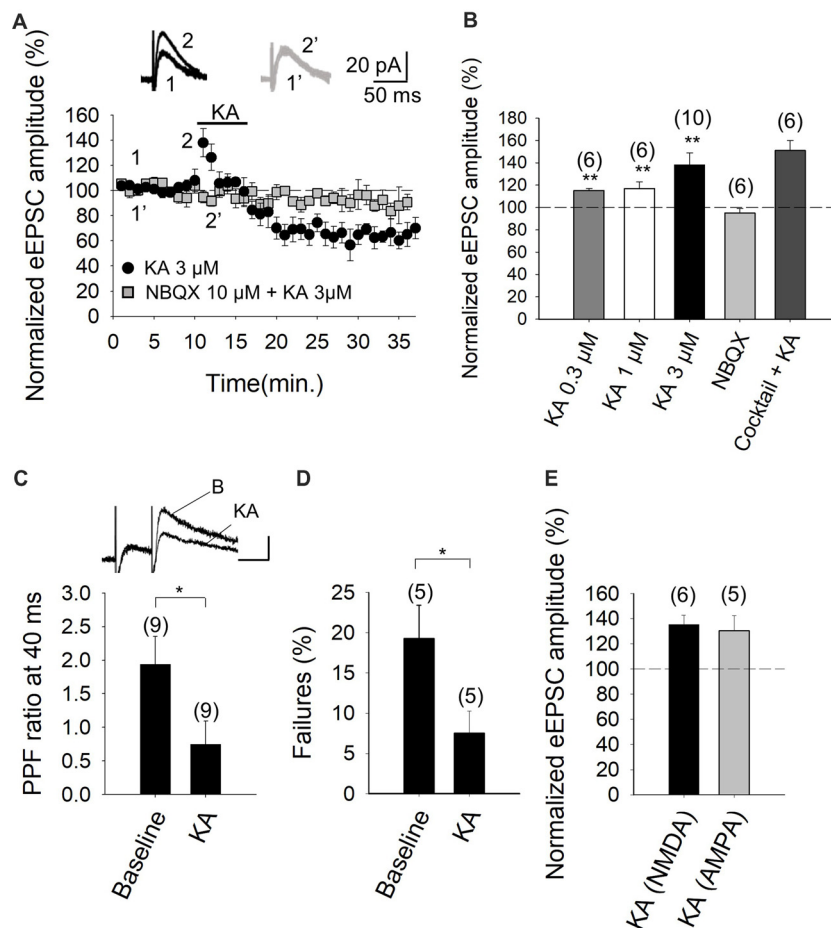
Whole-cell patch-clamp recordings were made from Purkinje neurons. NMDA receptor-mediated evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) were recorded at +40 mV from these neurons visually identified by infrared-differential interference contrast (IR-DIC) microscopy using a 40 $\times$  water immersion objective. Perfusion solution contained GYKI53655 (30  $\mu\text{M}$ ), to block AMPA receptors, and bicuculline (10  $\mu\text{M}$ ), to block GABA<sub>A</sub> receptors. In experiments involving AMPA receptor-mediated currents, performed at –70 mV, no GYKI53655 was used, but D-AP5 (50  $\mu\text{M}$ ) was included to block NMDA receptors. To evoke eEPSCs, electrical pulses were delivered to granule cells axons (parallel fibers) using a monopolar electrode placed in the molecular layer at a frequency of 0.2 Hz. Patch electrodes were made from borosilicate glass and had a resistance of 4–7 M $\Omega$  when filled with (mM): 120 CsCl, 8 NaCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\text{CaCl}_2$ , 10 HEPES, 2 EGTA and 20 QX-314 (pH 7.2, 290 mOsm). A 40 ms paired-pulse stimulation protocol was used for pair pulse ratio (PPR) analysis. Neurons were voltage clamped, using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Foster City, CA, USA). Access resistance was regularly monitored during recordings, and cells were rejected if it changed >15% during the experiment. Data were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz, and stored on a computer using pClamp software (Molecular Devices). Synaptic failures were identified as the lack of synaptic responses after presynaptic stimulation with the amplitude of these responses being no different from basal noise amplitude.

### Data Analysis

Data were normalized taking the control as 100% of the response and presented as means  $\pm$  SEM. Signals were averaged every 12 traces. Effects of KA were measured at peak (maximum) compared to averaged 10 min baseline points. Significance was assessed at  $P < 0.05$ . Statistical comparisons were made using two-tailed Student's *t*-test for comparison of two data sets and ANOVA for comparison of multiple data set using the Bonferroni as a *post hoc* test.

### Compounds

Salts and general reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA); GYKI 53655, D-AP5, NBQX, bicuculline,



**FIGURE 1 |** Kainate (KA) increases the evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) amplitude at parallel fibers-Purkinje cells (PF-PuC) synapses of the cerebellum. **(A)** Time course of KA (3 μM) effect on eEPSCs amplitude in the absence (circles) and presence of NBQX (squares). Inset show traces before and after 4 min KA perfusion in the absence (1, 2) and in the presence of 10 μM NBQX (1', 2'). **(B)** Quantification of modulation observed in **(A)** and dose dependency. **(C)** KA (3 μM) perfusion produces a decrease of the paired pulse ratio, inset shows scaled representative traces. **(D)** Effect of KA on the number of failures of NMDA receptor-mediated currents. **(E)** Effect of KA (3 μM) on NMDA and AMPA receptor-mediated currents, respectively. Note that the effect of kainate on these currents is indistinguishable. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means ± SEM (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Student's *t*-test).

Rp-Br-cAMP, H-89, forskolin, philanthotoxin, ryanodine, thapsigargin, kainate, Pertussis toxin CMZ and W-7 were obtained from Tocris (Bristol, UK).

## RESULTS

### The Activation of Kainate Receptors By 3 μM KA Produces an Increase in the Amplitude of NMDA-Evoked Postsynaptic Currents at PF-PuC Synapses

Following the observation that glutamatergic transmission at PF-PuC synapses of juvenile rats pups is modulated by KARs in a biphasic manner (Delaney and Jahr, 2002), as is also the case in the hippocampus (for review see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b, 2013; Lerma and Marques, 2013), we established

the parallel fiber-Purkinje (PF-PuC) synapse paradigm in slices from early adult mouse cerebellum.

The experimental paradigm we used was the stimulation of parallel fiber axons while measuring NMDA receptor-mediated eEPSCs in PuCs, by whole-cell patch clamp recordings, with the membrane potential held at +40 mV. Recording were made in the presence of 30 μM GYKI53655, in order to obviate AMPA receptor activation, as well as the presence of 10 μM bicuculline, to antagonize GABA<sub>A</sub> receptors. In our experiments, young adult cerebellar synapses evince detectable facilitation of NMDA receptor-mediated eEPSC amplitudes at 3 μM KA (138 ± 11%,  $n = 10$ , **Figures 1A,B**), with 0.3 μM and 1 μM agonist concentrations having smaller effects (115 ± 2%,  $n = 6$ , 117 ± 6%,  $n = 6$ , respectively). With 3 μM KA, synaptic facilitation was followed by a 36 ± 8% (to 64 ± 8% of baseline,  $n = 10$ ) decrease in the eEPSC amplitude (**Figure 1B**). To analyze the mechanistic details of the KAR-mediated facilitation

of glutamatergic transmission, we hereafter utilized 3  $\mu\text{M}$  KA in subsequent electrophysiological experiments as 3  $\mu\text{M}$  KA produced the maximum level of facilitation observable (**Figures 1A,B**).

To determine whether the effect of KA recorded from Purkinje neurons in slices was mediated by the activation of KARs, analogous to that observed in other brain regions, such as the hippocampus and cortex (Lauri et al., 2001a,b, 2003; Schmitz et al., 2001; Ji and Stäubli, 2002; Contractor et al., 2003; Breustedt and Schmitz, 2004; Rodríguez-Moreno and Sihra, 2004, 2013; Campbell et al., 2007; Pinheiro et al., 2007; Scott et al., 2008; Fernandes et al., 2009; Jouhanneau et al., 2011; Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), we performed experiments in the presence of NBQX. We showed that the 3  $\mu\text{M}$  KA biphasic effect on the eEPSC amplitude was abolished in the presence of 10  $\mu\text{M}$  NBQX ( $95 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ , **Figures 1A,B**). In these experiments, because AMPA receptors are antagonized in the presence of the selective blocker GYKI53655 in the bath, the observation of full antagonism by NBQX invokes the modulation to be due to KARs specifically. Further, in line with the notion that the facilitation (and the depression) of synaptic transmission observed is exclusively contingent on KAR activation. KA-mediated facilitation was retained ( $151 \pm 9\%$  increase of eEPSCs amplitude,  $n = 6$ ) when other transmitter influences were obviated by the inclusion of a cocktail of inhibitors including the receptor antagonists: MCPG and MPPG (1.5 mM), naloxone (100  $\mu\text{M}$ ), bicuculline (20  $\mu\text{M}$ ), 2-OH-saclofen (150  $\mu\text{M}$ ), atropine sulfate (50  $\mu\text{M}$ ) and DPCPX (0.1  $\mu\text{M}$ ), to block metabotropic glutamate, opioid, GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, muscarinic and adenosine receptors, respectively. Indeed, the synaptic depression that followed the facilitation of EPSCs, was also present in the presence of the inhibitor cocktail (to  $65 \pm 8\%$  of the baseline,  $n = 6$ ). These data therefore exclude the possibility that KA-mediated modulation was a secondary consequence of the synaptic release of diverse neurotransmitters, but rather, support the hypothesis that a direct effect of KA on KARs at cerebellar synapses underpins the observed modulation.

Previously, the facilitatory action of KA at the PF-PuC synapses have been attributed to presynaptic regulation (Delaney and Jahr, 2002). In our studies, we confirmed a presynaptic locus of action by using several approaches. First, we performed paired-pulse recordings and measured the paired-pulse ratio (PPR; pair-pulse depression was observed at 40 ms pulse interval). PPR was  $1.9 \pm 0.4$  ( $n = 9$ ) under control/baseline conditions. After KA treatment, PPR decreased to  $0.7 \pm 0.3$  ( $n = 9$ ; **Figure 1C**), implying an effect on release probability (Manabe et al., 1993), thereby corroborating the presynaptic origin of the KA receptor-mediated regulation. Second, we determined the proportion of synaptic failures in presence of KA. Under control conditions, synaptic failure rate was  $19 \pm 4\%$ ,  $n = 5$ . Following the application of KA, the failure rate was measurably decreased (to  $7 \pm 3\%$ ,  $n = 5$ , **Figure 1D**), again indicating a presynaptic locus of KA action. Finally, we compared the KA-mediated modulation of NMDA receptor-mediated eEPSCs (with GYKI53655 present) and

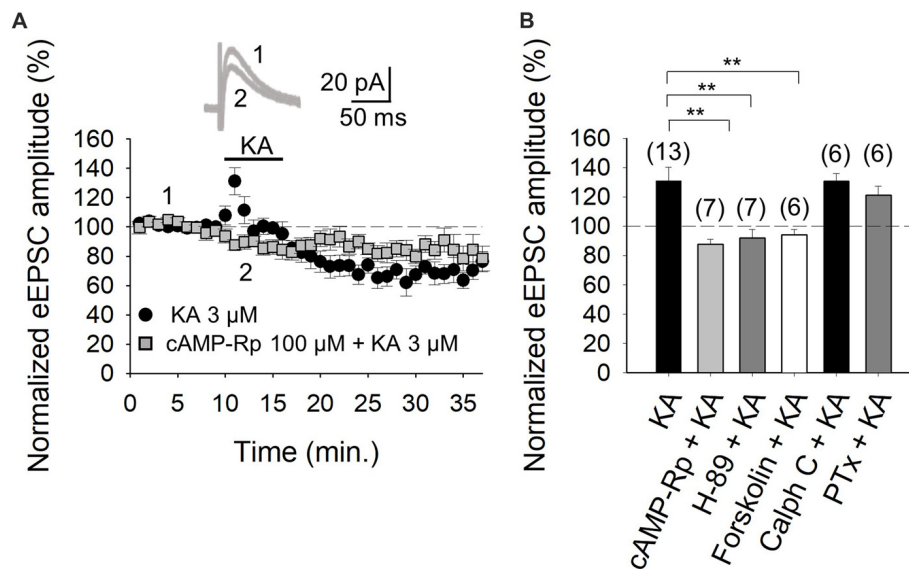
AMPA receptor-mediated eEPSCs recorded at  $-70$  mV (without GYKI53655, but with D-AP5 and bicuculline, to respectively block NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors). KA mediated a comparable increase in the NMDA receptor-mediated eEPSCs ( $135 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , **Figure 1E**) and the AMPA receptor-mediated eEPSCs ( $130 \pm 12\%$ ,  $n = 5$ , **Figure 1E**). This congruent facilitation of NMDA and AMPA receptor-mediated eEPSC amplitudes intimates that KA-modulation acts upstream of postsynaptic receptor activation, i.e., at the level of presynaptic terminal, through increased glutamate release. Together the preceding evaluation reliably evinces a presynaptic locus of action of KA at the PF-PuC synapses under investigation. However, it remains to be seen where the respondent KARs are physically located i.e., terminal, axonal or somatodendritic presynaptic compartments.

### KAR-Mediated Facilitation of Glutamatergic Transmission at PF-PuC Is Contingent on cAMP-Dependent Signaling

With the selectivity of the action of KA verified, in subsequent experiments we examined the second messenger system that mediates the facilitation of eEPSCs. First, we tested whether PKA was involved in the increased eEPSCs, by inhibiting either the cAMP-mediated activation of PKA, or the catalytic activity of the kinase, by respectively treating slices with the inhibitors cAMP-Rp or H-89. With the addition of 100  $\mu\text{M}$  cAMP-Rp or 2  $\mu\text{M}$  H-89, the facilitation of the eEPSC amplitude by 3  $\mu\text{M}$  KA was eliminated ( $88 \pm 3\%$ ,  $n = 7$  after cAMP-Rp and  $92 \pm 6\%$ ,  $n = 7$  after H-89, vs. KA 3  $\mu\text{M}$ ,  $131 \pm 9\%$ ,  $n = 13$  **Figures 2A,B**). cAMP-Rp and H-89 alone produced only small decrements in the eEPSC amplitude ( $7 \pm 3\%$  and  $10 \pm 4\%$ , respectively,  $n = 5$ , data not shown). The data together point to PKA playing an obligatory part in the observed KA-mediated modulation of PF-PuC cerebellar glutamatergic transmission.

For further corroboration, we next examined the KA-mediated facilitation of eEPSCs in presence of direct AC activation by forskolin. Given that forskolin produces long-lasting effects (Tong et al., 1996), slices were preincubated for 1 h with the diterpene in these experiments. KA application to forskolin (30  $\mu\text{M}$ )-treated slices failed to alter eEPSC amplitudes ( $95 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ , **Figure 2B**). This observation evinces that the previous AC activation by forskolin, obviates KAR-mediated regulation at PC-PuC synapses. To ensure that the forskolin-mediate abrogation of KAR regulation was indeed due the elevation of cAMP production, rather than a non-specific effect, we used 1,9-dideoxyforskolin, the inactive diterpene analog of forskolin, in control experiments. With dideoxyforskolin (100  $\mu\text{M}$ ) incubation of slices, KA (3  $\mu\text{M}$ ) invoked a facilitation of  $42 \pm 5\%$  (to  $142 \pm 5\%$  of baseline,  $n = 5$ ) in the amplitude of the eEPSCs, comparable to KA controls. This corroborates that occlusion of the KA receptor-mediated modulation by forskolin can indeed be ascribed to an increase in cAMP levels due to a pharmacological stimulation of AC. In sum, these data support the hypothesis





**FIGURE 2 |** Activation of adenylyl cyclase (AC) and downstream protein kinase A (PKA) underlies the kainate-mediated facilitation of glutamate release in PF-PuC synapses. **(A)** Time-course of the effect of KA on eEPSC amplitude in cAMP-Rp treated slices. Inset shows representative traces showing that KA (3  $\mu$ M) does not increase the amplitude of the eEPSCs in cAMP-Rp treated slices. **(B)** Inhibition of PKA by cAMP-Rp (100  $\mu$ M) or H-89 (2  $\mu$ M) and activation of AC by forskolin (30  $\mu$ M) prevented the facilitatory action of KA. Inhibition of protein kinase c (PKC) with calphostin C (1  $\mu$ M) has no effect on the KA enhancement of the eEPSC amplitude. The facilitatory effect of KA is not affected in slices treated with pertussis toxin. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (\*\* $P < 0.01$ , ANOVA test).

that forskolin, through an AC/cAMP/PKA pathway, occludes the metabotropic, facilitatory and presynaptic action of KARs at PF-PuC synapses.

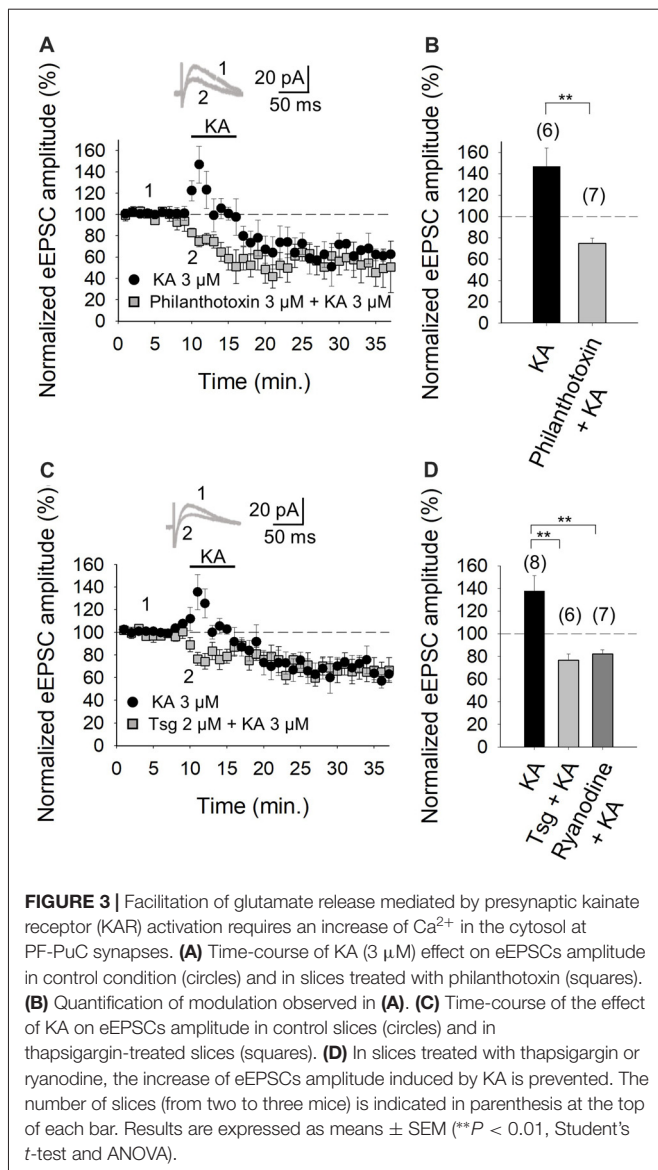
The aforementioned data in **Figure 2** indicate that the KA receptor-mediated facilitation of glutamatergic transmission at these cerebellar PF-PuC synapses is manifest through an AC/cAMP/PKA signaling pathway. However, given that in other slice preparations, protein kinase C (PKC) has also been implicated in aspects of the KAR-mediated modulation (for reviews see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b), we examined whether this kinase plays a role in the modulation of the PF-PuC cerebellar synapse by KA. In slice experiments using calphostin C (1  $\mu$ M) to specifically inhibit PKC, no significant effect on the KA-mediated facilitation was observed ( $131 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ , **Figure 2B**), this result therefore obviating involvement of PKC in the modulation observed.

Next, we determined whether the facilitatory effect of presynaptic KAR activation involves G-protein function, by examining the effect of KA on slices treated with Pertussis toxin (PTx, 5  $\mu$ g/ml). Intriguingly, in the presence of PTx, the KAR-mediated facilitation of synaptic transmission was retained, unaffected by G-protein block ( $122 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , vs.  $131 \pm 9\%$ ,  $n = 13$  without PTx, **Figure 2B**). Interestingly, and as an important positive control for the activity of PTx, we found that the inhibitory effect of KA at the same synapse was indeed suppressed by PTx; implying selective G-protein involvement in inhibitory modulation by KAR in the preparation under

study ( $90 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ; vs. control  $65 \pm 7\%$ ,  $n = 13$ , not shown).

### Facilitation of Synaptic Transmission/Glutamate Release at PF-PuC Synapses Is Mediated by a $\text{Ca}^{2+}$ Permeant Presynaptic KAR: Contingency on the Mobilization of Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ Stores and $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Dependence

The role of  $\text{Ca}^{2+}$  in mediating KAR-mediated synaptic facilitation has been subject of debate and controversy, for instance, at the hippocampal mossy fiber-CA3 (MF-CA3) synapses. Some studies suggest that permeation of  $\text{Ca}^{2+}$  through KARs and subsequent  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores is obligatory for short-term and long-term plasticity at MF-CA3 synapses (Lauri et al., 2003; Scott et al., 2008). Others have registered no effect of KA on cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Kamiya et al., 2002) and yet others advocate that a decrement  $\text{Ca}^{2+}$  concentration underpins the modulation due to KAR activation (Kamiya and Ozawa, 1998, 2000). To examine the former possibility and the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  permeant KARs at these cerebellar synapses, we investigated the effect of KA on the eEPSC amplitudes in the presence of philanthotoxin, a toxin shown to block unedited,  $\text{Ca}^{2+}$  permeable KARs (Fletcher and Lodge, 1996; Scott et al., 2008). After treatment of slices with 3  $\mu$ M philanthotoxin, the synaptic facilitation mediated by 3  $\mu$ M KA was completely abrogated (to  $75 \pm 5\%$  of initial amplitude,  $n = 7$  vs.  $147 \pm 17\%$ ,



$n = 6$  observed in interleaved slices, **Figures 3A,B**). These results evince that  $\text{Ca}^{2+}$  permeation through KAR is essential for the synaptic facilitation observed at PF-PuC synapses. To establish whether the aforementioned  $\text{Ca}^{2+}$  signal produced by KAR activation required amplification by  $\text{Ca}^{2+}$ -induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -store mobilization, we examined the effect of KA following depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -stores, using thapsigargin to inhibit the SERCA pump responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation into the stores. Treatment with thapsigargin ( $2 \mu\text{M}$ ) eliminated the facilitatory effect of  $3 \mu\text{M}$  KA, and, indeed, rather produced a depression of the response ( $77 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ , with thapsigargin vs.  $138 \pm 13\%$ ,  $n = 8$ , without thapsigargin, in interleaved slices; **Figures 3C,D**). These data unequivocally demonstrate the mandatory requirement for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in the modulation elicited by KA. However, the question remains whether KA treatment mobilizes these intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by first triggered an initial rise of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$

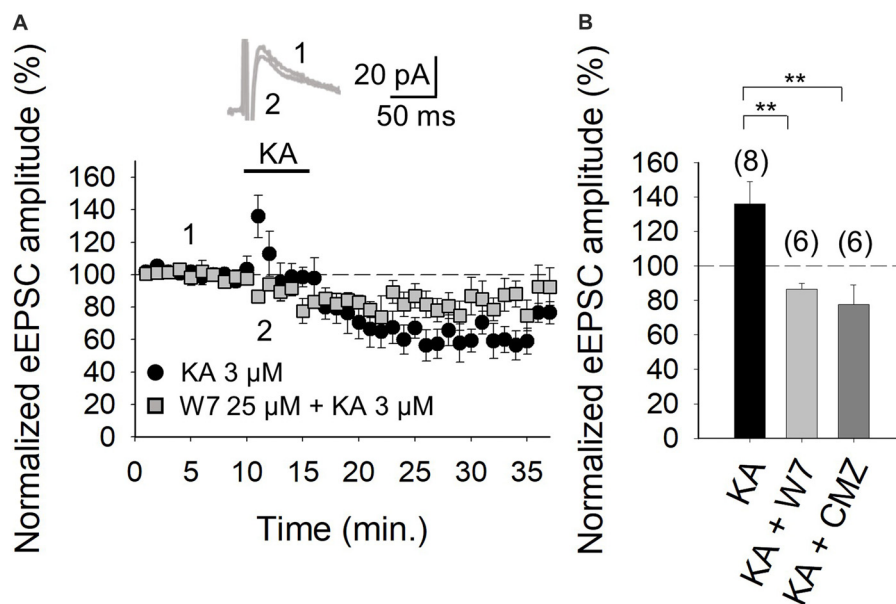
concentrations due to extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx. To answer this, we examined the effect of ryanodine, which selectively inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (Berridge, 1998), to elucidate whether this underpins KAR-mediated facilitation. Ryanodine ( $10 \mu\text{M}$ ) treatment eliminated the KAR-mediated facilitation of transmission at these PF-PuC synapses ( $82 \pm 4\%$ ,  $n = 7$ , with ryanodine vs.  $138 \pm 13\%$ ,  $n = 7$ , without ryanodine, in interleaved slices; **Figure 3D**). Taken together, the foregoing results support the hypothesis that presynaptic KARs at PF-PuC synapses are  $\text{Ca}^{2+}$  permeable, and that  $\text{Ca}^{2+}$  entry effected by these KARs and  $\text{Ca}^{2+}$  channels, triggers  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release from intraterminal  $\text{Ca}^{2+}$ -stores to produce synaptic facilitation.

It is evident from the foregoing data that an entry of  $\text{Ca}^{2+}$  via KARs is obligatory for the mediation of the facilitation invoked by KA. Given that in the hippocampus and the cortex, where we have previously examined KAR-mediated modulation, the activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin complex was shown to be mandatory for AC activation (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), we examined this regulatory pathway at the cerebellar PF-PuC synapse by treating slices with the calmodulin antagonist, W-7, before recording eEPSCs. With W-7 ( $25 \mu\text{M}$ ) present, KA ( $3 \mu\text{M}$ )-mediated facilitation was convincingly blocked ( $86 \pm 3\%$ ,  $n = 6$ , with W-7 vs.  $136 \pm 13\%$ ,  $n = 8$  without W7, in interleaved slices; **Figures 4A,B**). Corroboration of calmodulin dependence of the modulation, was also evident from experiments performed in the presence of calmidazolium (CMZ,  $1 \mu\text{M}$ ), an alternative calmodulin antagonist. As with W-7, in presence of CMZ, KA ( $3 \mu\text{M}$ )-mediated facilitation of synaptic transmission was abrogated ( $78 \pm 11\%$ ,  $n = 6$ , **Figure 4B**). These data support the postulate that a presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin complex is obligatory for the KAR-mediated synaptic regulation and operates upstream of the activation of AC/cAMP/PKA signaling.

## DISCUSSION

The results in this study, utilizing electrophysiological experiments in cerebellar slices, show that the activation of presynaptic KARs in the cerebellum, at PF-PuC synapses, invokes a facilitation of synaptic transmission/glutamate release. Analysis of this modulation suggests a mechanistic coupling of KARs through  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin/AC/cAMP/PKA activity, but independently of G-protein activation.

We would hypothesize that the observed KA-mediated enhancement of the eEPSPs at PF-PuC synapses is due to increased glutamate release, which could be monitored by NMDA receptor-mediated currents (with AMPA receptors antagonized by GYKI53655), and blocked by the KAR/AMPA receptor antagonist NBQX. Under conditions where AMPA receptor activation is obviated by GYKI53655, this therefore delineates the specific role of KARs in the facilitatory regulation, particularly given that a receptor antagonist cocktail, formulated to eliminate the presynaptic effects of neurotransmitters that might be secondarily released, also had no effect on the observed synaptic modulation due to KA.



**FIGURE 4 |** Facilitation of glutamate release mediated by presynaptic KAR activation requires  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin at PF-PuC synapses. **(A)** Time-course of KA ( $3 \mu\text{M}$ ) effect on eEPSCs amplitude in control condition (circles) and in the slices treated with  $25 \mu\text{M}$  W-7 (squares). Inset show traces before and after 4 min KA perfusion from W-7 treated slices. **(B)** Quantification of modulation observed in **(A)** and in the presence of  $1 \mu\text{M}$  CMZ. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (\*\* $P < 0.01$ , ANOVA test).

In assessing synaptic regulation, it is indeed of utmost importance to identify the subcellular location of the KAR postulated. We corroborated the presynaptic presence of KARs by electrophysiological analysis of a presynaptically manifest parameter, i.e., the PPR (pair-pulse ratio) of consecutive eEPSCs mediated by neurotransmitter release. A clear decrease in the PPR of eEPSCs observed with KA application in our experiments, suggested a change in release probability (by definition a presynaptic property in synaptic transmission). Secondly, we assessed the proportion of synaptic failures in response to KA application. With KA application, the failure proportion was evidently diminished, supportive of an increase in the probability of presynaptic transmitter release and corroborative of the observed facilitation occurring through KAR activation. Finally, importantly, the effects of KA observed on NMDA and AMPA receptor-mediated currents were similar. Given that no such equivalence would be predicted if the observed modulation was postsynaptic, the data here are supportive of a presynaptic mode of action for KARs being activated. Altogether, three independent analyses mutually corroborate and emphasize a presynaptic locus of action of KARs functioning at PF-PuC synapses.

It remains to be elucidated whether the presynaptic regulation by KA at PF-PuCs reports the activity of KARs subcellularly localized at nerve terminal/axonal or somatodendritic compartments. The technically challenging paradigms needed to address this question is beyond the scope of the present paper. However, to directly elucidate the presynaptic compartmentalization of KARs, future work necessitates: (i) high resolution immunolocalization (immunogold-based)

of the receptor (contingent on the availability of high affinity antibodies with appropriate KAR subunit-specificity); and (ii) targeted blockade of KARs using caged-antagonists (contingent on the pending development of reagents) (see NMDA receptor studies, Rodríguez-Moreno et al., 2011; Reeve et al., 2012).

Corresponding with our previous studies in the hippocampus and cortex (Rodríguez-Moreno and Sihra, 2004, 2013; Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), PKA inhibition by the cell-permeant cyclic nucleotide analog cAMP-Rp, also led to the abrogation of KA-mediated enhancement of synaptic transmission/glutamate release at PF-PuC synapses. The congruence of the mechanism between synapses was also highlighted in the current studies, by the observation that the inhibition PKA catalytic activity by H-89 also eliminated the KA-mediated facilitation. Similarly and congruently, direct activation of AC by preincubation with forskolin, produced refractoriness of the facilitatory effect of KA. Collectively, these results consistently suggest that AC/cAMP/PKA signaling underpins the facilitatory modulation of synaptic transmission/glutamate release at the synapse under study here.

Consistently, there has been a notable absence of any evidence to support G-protein mediated initiation/transduction of the AC/cAMP/PKA cascade posited to be involved in presynaptic KAR-mediated enhancement of glutamate release. We therefore addressed the conceivable role of  $\text{Ca}^{2+}$  as the initiator of a G-protein independent signaling cascade, in the modulation being investigated at defined cerebellar PF-PuC synapses. In the canonical context, KARs may mediate external  $\text{Ca}^{2+}$  entry through an ionotropic activity which would depolarize nerve



terminals (Perkinton and Sihra, 1999) and thus activate voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Non-canonically, direct  $\text{Ca}^{2+}$  influx via  $\text{Ca}^{2+}$  permeable KARs *per se* is also possible (Fletcher and Lodge, 1996; Scott et al., 2008). Notably in the studies reported herein, a blockade of the  $\text{Ca}^{2+}$  permeable KARs by the selective inhibitor, philanthotoxin, abrogated the KA-mediated synaptic facilitation in the current studies, pointing to a strict requirement for external  $\text{Ca}^{2+}$  entering via KARs to support facilitatory modulation. Interestingly therefore, it would appear that, although it is thought that unedited  $\text{Ca}^{2+}$  permeable KARs typically prevail earlier during neuronal development, these receptors evidently persevere with activity in the cerebellum of the early adult, mouse brain.

We extended the analysis of properties of KAR-mediated regulation by examining the hypothesis that the essential core, albeit perhaps limited,  $\text{Ca}^{2+}$  entry via KARs may be amplified by  $\text{Ca}^{2+}$  mobilized from intraterminal stores, as reported for similar modulation at hippocampal synapses (Lauri et al., 2003; Scott et al., 2008). Emphatically supporting a critical role for intraterminal  $\text{Ca}^{2+}$  stores, were our results showing that thapsigargin treatment, to deplete intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores (Irving et al., 1992), abolished the facilitatory regulation by KARs. Again, in corroboration of the hypothesis, use of ryanodine to selectively inhibit  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release (Berridge, 1998), evinced that  $\text{Ca}^{2+}$  entry via KARs induces  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from intraterminal  $\text{Ca}^{2+}$  stores to invoke the modulation seen herein.

Having demonstrated that  $\text{Ca}^{2+}$  entering via KARs and subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  increases due to mobilization of intraterminal  $\text{Ca}^{2+}$  stores is actually obligatory for the KA facilitation of synaptic transmission at PF-PuC synapse, we questioned how might such an increase in cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  couple to the postulated AC/cAMP/PKA signaling mediating the facilitation by KARs. From previous studies, it is plausible that the rise in cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  activates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ACs present in parallel fiber terminals. A number of ACs have been described, however, AC1 and AC8 are two members of the family, that have been shown to be activated by  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin and are abundant in the central nervous system (for reviews see Cooper, 2003; Wang and Storm, 2003). Interestingly, supporting their significance to the hypothesis, studies with double knockouts of AC1 and AC8, have shown that the  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin ACs are indeed essential for the widely reported  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent elevation of cAMP (Wong et al., 1999). Using the calmodulin antagonists W-7 and CMZ, our data shows that inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin function, abolishes the presynaptic KAR-mediated modulation in cerebellar slices. This supports the hypothesis that, following KAR activation and elevation of cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$ , a  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent coupling may activate AC1 and/or AC8, and thereby extend to the initiation of the AC/cAMP/PKA cascade, hence promoting synaptic facilitation through increased neurotransmitter release at PF-PuCs synapses.

This report shows the PF-PuC synapse is a reliable and robust model for the study of KAR mediated modulation. Interestingly, however, we observed a facilitation of synaptic transmission/glutamate release at 3  $\mu\text{M}$  KA, contrary to previous work with the same synapse, where 500 nM agonist induced

a depression in glutamate release (Delaney and Jahr, 2002). The discrepancy may reflect the notably different agonist concentrations employed, and indeed the difference in the age of animals, and perhaps the species of animals used in the previous experiments (Delaney and Jahr, 2002 utilized P13-P17 rats). The higher concentration of KA necessary for the activation of KARs at young adult synapses may indeed be indicative of the different efficacy of KA at KARs at this age, perhaps dependent on the expression of specific glutamate receptor subunit subtypes composing the resident KARs.

From our results, it is clear that KAR function is preserved in early adult animals at PF-PuC synapses and is not temporally limited to the two firsts postnatal weeks as reported previously (Delaney and Jahr, 2002). KARs have an autoreceptor role in developing animals, with the concentration of agonist determining presynaptic modulation: facilitation (at low  $[\text{KA}]$ ) and depression (at high  $[\text{KA}]$ ) and, thereby, putatively determining synapse consolidation and stability. Although the precise role(s) of these KARs in adult animals remains to be explicated, the modulation of presynaptic function reported herein might manifest some forms of plasticity. For instance, KARs have been shown to be involved in plasticity at PF-PuCs synapses (for review see Hirano, 2013; Sihra et al., 2014).

Our experiments here do show that KAR activation has a biphasic effect at PF-PuC synapses as previously reported (Delaney and Jahr, 2002); inducing a depression of glutamate release at relatively high concentrations of KA (>1–3  $\mu\text{M}$ ) rather than facilitation. The aim of the current study was to elucidate the mechanistic details of the observed facilitation, rather than the factors underpinning in the synaptic depression. However, notably, our results did reveal that the transient synaptic depression observed with high KA concentrations is abolished in the presence of cAMP-Rp (inhibition of PKA activation), but not affected by any of the experimental manipulations speaking to regulation of cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  or function thereof, i.e., philanthotoxin, thapsigargin, W-7 or CMZ. These observations point to the synaptic depression seen likely involving an AC/cAMP/PKA pathway, as described for facilitation, but without the proposed  $\text{Ca}^{2+}$ -AC coupling. The indications are therefore, that KARs have alternative mechanistic modes for facilitatory and depressive action. Indeed, KAR coupling to an increase in cAMP concentrations (and subsequent enhancement of PKA activity), or to a decrease in cAMP concentrations (and subsequent diminution of PKA activity), has been reported in studies investigating the mossy fiber-CA3 synapse of the hippocampus (Negrete-Díaz et al., 2006, 2007; Andrade-Talavera et al., 2012), the amygdala (Negrete-Díaz et al., 2012) and in the cortex (Andrade-Talavera et al., 2013). The key difference that our current results point to is the differing direction and means of regulation of the AC/cAMP/PKA cascade in the bimodal regulation by KARs. Whereas, presynaptic facilitatory function by KARs evidently involves an increase in AC/cAMP/PKA signaling instigated by the  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin complex, KARs appear to be negatively coupled to the AC/cAMP/PKA pathway to effect depression synaptic transmission. Previous studies at MF-CA3 synapses and thalamocortical synapses (and as

confirmed here) have reported that the depression of presynaptic function occurs through a negative coupling to AC/cAMP/PKA and is actually invoked by the action of a PTx sensitive G-protein (Negrete-Díaz et al., 2006; Andrade-Talavera et al., 2013). Notwithstanding the postulated differential upstream coupling to AC to achieve facilitation and depression, it is also plausible that the diametric mechanisms reflect the operation of two distinct types of KARs. Future studies will elucidate the exact instruments involved in the observed KAR-mediated modulation and address the question as to whether different populations of presynaptic KARs reside at the PF-PuC synapse.

In conclusion, our studies show that presynaptic KARs activation by KA, at PF-PuC synapses produces a facilitation of synaptic transmission consistent with an increase in neurotransmitter release. We postulate that, mechanistically, KAR-mediated presynaptic facilitation involves an increase in cytosolic  $[Ca^{2+}]$ , first by external  $Ca^{2+}$ -entry via  $Ca^{2+}$ -permeable KARs, and second by this then triggering the

mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$  from stores in granule cells terminals. The raised  $Ca^{2+}$  binds to calmodulin to form a  $Ca^{2+}$ -calmodulin complex, which we postulate activates AC1 or AC8 to elevate cAMP levels and thus effect PKA stimulation. The latter invokes an enhancement of glutamate release and hence synaptic transmission at the PF-PuC synapse in the cerebellum.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RF-M and PL-R performed the experiments. TS and AR-M wrote the manuscript. AR-M designed the study.

## FUNDING

This study was supported by Grants BFU2006-1455 (from the Ministerio de Economía y Competitividad) and a grant from the “Eugenio Rodríguez-Pascual Foundation” 2011 to AR-M.

## REFERENCES

- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Flores, G., and Rodríguez-Moreno, A. (2012). Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves  $Ca^{2+}$ -calmodulin at mossy fiber-CA3 synapses. *J. Neurochem.* 122, 891–899. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07844.x
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Sihra, T. S., and Rodríguez-Moreno, A. (2013). Presynaptic kainate-receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and  $Ca^{2+}$ -calmodulin at thalamocortical synapses. *J. Neurochem.* 126, 565–578. doi: 10.1016/j.jneurochem.2013.01.071
- Bahn, S., Volk, B., and Wisden, W. (1994). Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.* 14, 5525–5547. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-09-05525.1994
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signalling. *Neuron* 21, 13–26. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80510-3
- Bettler, B., Boulter, J., Hermans-Borgmeyer, I., O’Shea-Greenfield, A., Deneris, E. S., Moll, C., et al. (1990). Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* 5, 583–595. doi: 10.1016/0896-6273(90)90213-y
- Breustedt, J., and Schmitz, D. (2004). Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* 24, 10093–10098. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3078-04.2004
- Campbell, S. L., Mathew, S. S., and Hablitz, J. J. (2007). Pre- and postsynaptic effects of kainate on layer II/III pyramidal cells in rat neocortex. *Neuropharmacology* 53, 37–47. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.04.008
- Contractor, A., Sailer, A., Darstein, M., Maron, C., Xu, J., Swanson, G., et al. (2003). Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation at mossy-fiber synapses in  $KA2^{-/-}$  mice. *J. Neurosci.* 23, 422–429. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-02-00422.2003
- Cooper, D. M. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem. J.* 375, 517–529. doi: 10.1042/bj20031061
- Delaney, A. J., and Jahr, C. E. (2002). Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron* 36, 475–482. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01008-5
- Fernandes, H. B., Catches, J. S., Petralia, R. S., Copits, B. A., Xu, J., Russell, T. A., et al. (2009). High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron* 63, 818–829. doi: 10.1016/j.neuron.2009.08.010
- Fletcher, E. J., and Lodge, D. (1996). New developments in the molecular pharmacology of AMPA and kainate receptors. *Pharmacol. Ther.* 70, 65–89. doi: 10.1016/0163-7258(96)00014-9
- Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W., and Seeburg, P. H. (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 8, 775–785. doi: 10.1016/0896-6273(92)90098-x
- Hirano, T. (2013). Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol.* 89, 183–195. doi: 10.2183/pjab.89.183
- Irving, A. J., Collingridge, G. L., and Schofield, J. G. (1992). Interactions between  $Ca^{2+}$  mobilising mechanisms in cultured rat cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 456, 667–680. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019360
- Jane, D. E., Lodge, D., and Collingridge, G. L. (2009). Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology* 56, 90–113. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.023
- Ji, Z., and Stäubli, U. (2002). Presynaptic kainate receptors play different physiological roles in mossy fiber and associational-commissural synapses in CA3 of hippocampus from adult rats. *Neurosci. Lett.* 331, 71–74. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00865-0
- Jouhannau, J. S., Ball, S. M., Molnár, E., and Isaac, J. T. R. (2011). Mechanisms of bi-directional modulation of thalamocortical transmission in barrel cortex by presynaptic kainate receptors. *Neuropharmacology* 60, 832–841. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.12.023
- Kamiya, H., and Ozawa, S. (1998). Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic  $Ca^{2+}$  influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 509, 833–845. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.833bm.x
- Kamiya, H., and Ozawa, S. (2000). Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre. *J. Physiol.* 523, 653–665. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00653.x
- Kamiya, H., Umeda, K., Ozawa, S., and Manabe, T. (2002). Presynaptic  $Ca^{2+}$  entry is unchanged during hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J. Neurosci.* 22, 10524–10528. doi: 10.1523/jneurosci.22-24-10524.2002
- Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Bleakman, D., Ornstein, P. L., Lodge, D., Isaac, J. T. R., et al. (2001a). A critical role of a facilitatory kainate autoreceptor in mossy fiber LTP. *Neuron* 32, 697–709. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00511-6
- Lauri, S. E., Delany, C., Clarke, V. E. J., Bortolotto, Z. A., Ornstein, P. I., Isaac, J. T., et al. (2001b). Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuropharmacology* 41, 907–915. doi: 10.1016/S0028-3908(01)00152-6
- Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Nistico, R., Bleakman, D., Ornstein, P. L., Lodge, D., et al. (2003). A role for  $Ca^{2+}$  stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 39, 327–341. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00369-6
- Jerma, J., and Marques, J. M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron* 80, 292–311. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.045

- Manabe, T., Willey, D. J., Perkel, D. J., and Nicoll, R. A. (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 70, 1451–1459. doi: 10.1152/jn.1993.70.4.1451
- Negrete-Díaz, J. V., Duque-Feria, P., Andrade-Talavera, Y., Carrión, M., Flores, G., and Rodríguez-Moreno, A. (2012). Kainate receptor-mediated depression of glutamatergic transmission involving protein kinase A in the lateral amygdala. *J. Neurochem.* 121, 36–43. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07665.x
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Delgado-García, J. M., and Rodríguez-Moreno, A. (2006). Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *J. Neurophysiol.* 96, 1829–1837. doi: 10.1152/jn.00280.2006
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Delgado-García, J. M., and Rodríguez-Moreno, A. (2007). Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition converges with presynaptic inhibition mediated by Group II mGluRs and long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *J. Neural Transm. Vienna* 114, 1425–1431. doi: 10.1007/s00702-007-0750-4
- Perkinton, M. S., and Sihra, T. S. (1999). A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 90, 1281–1292. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00573-9
- Petralia, R. S., Wang, Y. X., and Wenthold, R. J. (1994). Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* 349, 85–110. doi: 10.1002/cne.903490107
- Pinheiro, P. S., Perrais, D., Coussen, F., Barhanin, J., Bettler, B., Mann, J. R., et al. (2007). GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1004, 12181–12186. doi: 10.1073/pnas.0608891104
- Reeve, J. E., Kohl, M. M., Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O., and Anderson, H. L. (2012). Caged intracellular NMDA receptor blockers for the study of subcellular ion channel function. *Commun. Integr. Biol.* 5, 240–242. doi: 10.4161/cib.19400
- Rodríguez-Moreno, A., Kohl, M. M., Reeve, J. E., Eaton, T. R., Collins, H. A., Anderson, H. L., et al. (2011). Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci.* 31, 8564–8569. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0274-11.2011
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T. S. (2004). Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 557, 733–745. doi: 10.1113/jphysiol.2004.065029
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T. S. (2007a). Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J. Neurochem.* 103, 2121–2135. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04924.x
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T. S. (2007b). Kainate receptors with a metabotropic modus operandi. *Trends Neurosci.* 30, 630–637. doi: 10.1016/j.tins.2007.10.001
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T. S. (2013). Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin and PKA in cerebrocortical synaptosomes. *FEBS Lett.* 587, 788–792. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.071
- Schmitz, D., Mellor, J., and Nicoll, R. A. (2001). Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* 291, 1972–1976. doi: 10.1126/science.1057105
- Scott, R., Lalic, T., Kullmann, D. M., Capogna, M., and Rusakov, D. A. (2008). Target-cell specificity of kainate autoreceptor and  $\text{Ca}^{2+}$  store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fibers. *J. Neurosci.* 28, 13139–13149. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2932-08.2008
- Shira, T. S., and Rodríguez-Moreno, A. (2013). Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: mechanisms. *Neurochem. Int.* 62, 982–987. doi: 10.1016/j.neuint.2013.03.012
- Sihra, T. S., Flores, G., and Rodríguez-Moreno, A. (2014). Kainate receptors: multiple roles in neuronal plasticity. *Neuroscientist* 20, 29–43. doi: 10.1177/1073858413478196
- Smith, T. C., Wang, L. Y., and Howe, J. R. (1999). Distinct kainate receptor phenotypes in immature and mature mouse cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 517, 51–58. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0051z.x
- Swanson, G. T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., and Cull-Candy, S. G. (1996). Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J. Physiol.* 492, 129–142. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021295
- Tong, G., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. (1996). Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: a presynaptic form of plasticity. *Neuron* 16, 1147–1157. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80141-5
- Valbuena, S., and Lerma, J. (2016). Non-canonical signalling, the hidden life of ligand-gated ion channels. *Neuron* 92, 316–329. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.016
- Wang, H., and Storm, D. R. (2003). Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Mol. Pharmacol.* 63, 463–468. doi: 10.1124/mol.63.3.463
- Wong, S. T., Athos, J., Figueroa, X. A., Pineda, V. V., Schaefer, M. L., Chavkin, C. C., et al. (1999). Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 23, 787–798. doi: 10.1016/s0896-6273(01)80036-2


**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Falcón-Moya, Losada-Ruiz, Sihra and Rodríguez-Moreno. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Article

# Kainate Receptor-Mediated Depression of Glutamate Release Involves Protein Kinase A in the Cerebellum

Rafael Falcón-Moya, Pilar Losada-Ruiz and Antonio Rodríguez-Moreno \* 

Laboratorio de Neurociencia Celular y Plasticidad, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, ES-41013 Sevilla, Spain

\* Correspondence: arodmor@upo.es; Tel.: +34-95497-7393

Received: 20 July 2019; Accepted: 23 August 2019; Published: 23 August 2019



**Abstract:** Kainate (KA) receptors (KAR) have important modulatory roles of synaptic transmission. In the cerebellum, the action mechanisms of KAR-mediated glutamatergic depression are unknown. We studied these mechanisms by recording evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) from cerebellar slices using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. We observed that 3  $\mu$ M KA decreased the amplitude of eEPSCs and increased the number of failures at the synapses established between parallel fibers (PF) and Purkinje neurons, and the effect was antagonized by NBQX under the condition where AMPA receptors were previously blocked. The inhibition of protein kinase A (PKA) suppressed the effect of KAR activation on eEPSC, and effect was not prevented by protein kinase C inhibitors. Furthermore, in the presence of Pertussis toxin, the depression of glutamate release mediated by KAR activation was prevented, invoking the participation of a  $G_{i/o}$  protein in this modulation. Finally, the KAR-mediated depression of glutamate release was not prevented by blocking calcium-permeable KARs or by treatments that affect calcium release from intracellular stores. We conclude that KARs present at these synapses mediate an inhibition of glutamate release through a mechanism that involves the activation of G-protein and protein kinase A.

**Keywords:** kainate receptor; cerebellum; glutamate; protein kinase A; G-protein

## 1. Introduction

Kainate-type glutamate receptors are well-established mediators of canonical, ionotropic postsynaptic transmission and, presynaptically, these receptors support a modulatory regulation of neurotransmitter release. In the latter regard, kainate receptors (KARs) have a non-canonical metabotropic capacity, through which they effect the control of both glutamate and GABA release (for review see [1–9]). At several excitatory glutamatergic synapses, the KAR-mediated modulation is found to be biphasic, such that low agonist concentrations facilitate glutamate release, as opposed to higher agonist concentrations, which inhibit neurotransmitter release (see [2–5,9,10] for reviews). How this diametrically opposite modulation is mechanistically manifest is the subject of considerable debate and investigation, as is the question of the subcellular location of KARs responsible for presynaptic modulation [2–7].

KARs are expressed in the cerebellar cortex in the axons of cerebellar granule cells that form parallel fibers (PF) and form excitatory synapses with Purkinje cells (PuC) [11]. Messenger RNA transcripts encoding different KAR subunits (GluK1, GluK2 and GluK5) have been detected in granule cells, and functional expression of KAR subtypes has been reported ([12–15]. The subunits GluK1 and GluK2 have been detected on parallel fibers [15]. Biophysical studies with single-channel recordings have shown GluK1 activity [16], suggesting these KARs are  $Ca^{2+}$ -permeable. A biphasic action of KARs, activated by the agonist domoate, has been shown previously at the PF-PuC synapse, with low agonist concentrations facilitating synaptic transmission and higher concentrations depressing synaptic



transmission [17]. Recently we determined the mechanism by which the activation of KAR mediated the facilitation of glutamate release found at these synapses involving a calcium-calmodulin-adenylate cyclase (AC)-protein kinase A (PKA) involvement pathway [18]. Here, we have determined the mechanism underpinning the depressant effect of KA in cerebellar slices at synapses between granule cell terminals and PuC.

We found that the KAR-mediated depression of glutamate release has an obligatory dependency on G protein function and cAMP-mediated PKA activity at PF-PuC synapses in the cerebellum.

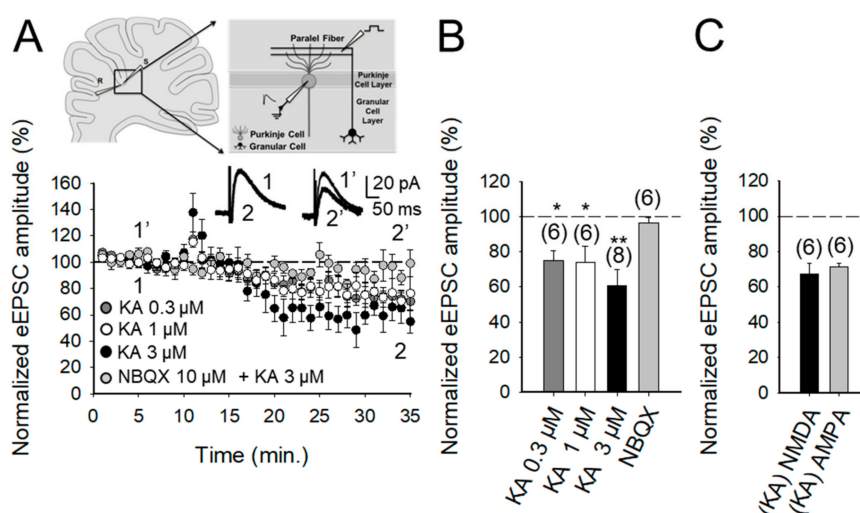
## 2. Results

### 2.1. The Activation of Kainate Receptors by 3 $\mu$ M KA Produces A Decrease in the Amplitude of NMDA Receptor-Mediated Postsynaptic Currents at PF-PuC Synapses

Following the observation that glutamatergic transmission at PF-PuC synapses of juvenile rat pups is modulated by KARs in a biphasic manner [17], as is also the case in the hippocampus [2–5], we established the parallel fiber-Purkinje (PF-PuC) synapse paradigm in slices from early adult mouse cerebellum to study the mechanisms involved in glutamate release modulation mediated by KAR-activation. The experimental paradigm we used was the stimulation of parallel fiber axons while measuring NMDA receptor-mediated eEPSCs in PuCs, by obtaining whole-cell patch clamp recordings, with the membrane potential held at +40 mV. Recordings were made in the presence of 30  $\mu$ M GYKI53655, in order to obviate AMPA receptor activation, as well as the presence of 10  $\mu$ M bicuculline, to antagonize GABA<sub>A</sub> receptors (in the presence of GYKI53655, AMPA currents were completely blocked from  $80 \pm 7$  pA in control to  $3 \pm 2$  pA in the presence of 30  $\mu$ M GYKI53655,  $n = 6$ ). In the presence of bicuculline, GABA<sub>A</sub> currents were completely blocked (from  $130 \pm 12$  pA in control to  $4 \pm 3$  pA in the presence of 10  $\mu$ M bicuculline,  $n = 6$ ). In the presence of GYKI53655 and bicuculline, the addition of 50  $\mu$ M D-AP5 completely blocked the remaining current indicating that was an NMDA current (from  $60 \pm 8$  pA in control to  $4 \pm 3$  pA in the presence of 50  $\mu$ M D-AP5,  $n = 6$ ). In our experiments, young adult cerebellar synapses showed detectable depression (after a transient increase) of NMDA receptor-mediated eEPSC amplitudes when 3  $\mu$ M KA was applied ( $61 \pm 7\%$ ,  $n = 8$ , Figure 1A,B), with 0.3 and 1  $\mu$ M agonist concentrations having smaller effects ( $75 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ,  $73 \pm 9\%$ ,  $n = 6$ , respectively; transient increases in eEPSC amplitudes to:  $117 \pm 5\%$ ,  $n = 6$  for KA 0.3  $\mu$ M;  $122 \pm 6\%$ ,  $n = 6$  for KA 1  $\mu$ M and  $138 \pm 13\%$ ,  $n = 8$ , for KA 3  $\mu$ M). To analyze the mechanistic details of the KAR-mediated depression of glutamatergic transmission, we hereafter utilized 3  $\mu$ M KA in subsequent electrophysiological experiments as 3  $\mu$ M KA produced the maximum level of depression observable. To determine whether the effect of KA recorded from Purkinje neurons in slices was mediated by the activation of KARs, analogous to that observed in other brain regions, such as the hippocampus and cortex [18–34], we performed experiments in the presence of NBQX. We showed that the 3  $\mu$ M KA biphasic effect on the eEPSC amplitude was abolished in the presence of 10  $\mu$ M NBQX ( $95 \pm 3\%$ ,  $n = 6$ , Figure 1A). In these experiments, because AMPA receptors were previously antagonized in the presence of the selective blocker GYKI53655 in the bath, the observation of full antagonism by NBQX invoked the modulation to be due to KARs specifically. Further, in line with the notion that the depression (and the facilitation) of synaptic transmission observed was exclusively contingent on KAR activation.

In our studies, we confirmed a presynaptic locus of action by using several approaches. First, we performed paired-pulse recordings and measured the paired-pulse ratio (PPR; pair-pulse facilitation was observed at 40 ms pulse interval). PPR was  $1.9 \pm 0.4$  ( $n = 8$ ) under control/baseline conditions. After KA treatment, PPR increased to  $2.2 \pm 0.2$  ( $n = 8$ ), implying an effect on release probability [35], thereby corroborating the presynaptic origin of the KA receptor-mediated regulation. Second, we determined the proportion of synaptic failures in the presence of KA. Under control conditions, the synaptic failure rate was  $19 \pm 4\%$ ,  $n = 5$ . Following the application of KA, the failure rate was measurably increased (to  $37 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ), again indicating a presynaptic locus of KA action. Finally, we compared the KA-mediated modulation of NMDA receptor-mediated eEPSCs (with GYKI53655 present) and

AMPA receptor-mediated eEPSCs recorded at  $-70$  mV (without GYKI53655, but with D-AP5 and bicuculline, to respectively block NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors). KA mediated a comparable decrease in the NMDA receptor-mediated eEPSCs ( $67 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ) and the AMPA receptor-mediated eEPSCs ( $71 \pm 2\%$ ,  $n = 5$ , Figure 1C). This congruent depression of NMDA and AMPA receptor-mediated eEPSC amplitudes intimates that KA-modulation occurs presynaptically, through decreased glutamate release. Together, the preceding evaluation reliably shows a presynaptic locus of action of KA at the PF-PuC synapses under investigation.



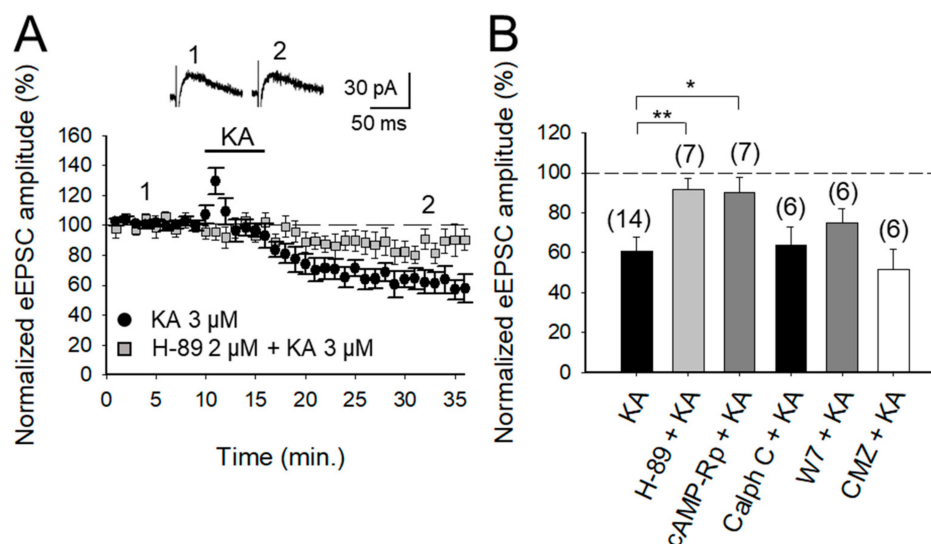
**Figure 1.** Kainate (KA) reduces the evoked excitatory postsynaptic current (eEPSC) amplitude at parallel fibers-Purkinje cell (PF-PuC) synapses of the cerebellum. (A) The picture shows the experimental setup. The graph shows the time course of the KA (0.3, 1 and 3 μM) effect on eEPSC amplitude in the absence (dark grey, white and black symbols) and presence of NBQX for KA3 μM (grey). The inset shows traces before and after KA 3 μM treatment in the absence (1, 2) and in the presence of 10 μM NBQX (1', 2'). (B) Quantification of modulation and dose dependency of the KA effect on eEPSC amplitude in the absence and presence of NBQX. (C) Effect of KA (3 μM) on NMDA and AMPA receptor-mediated currents. Note that the effect of KA on these currents is indistinguishable. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parentheses at the top of each bar. Results are expressed as the means  $\pm$  SEM (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , Student's *t*-test).

## 2.2. KAR-Mediated Depression of Glutamatergic Transmission at PF-PuC Is Contingent on cAMP-Dependent Signaling

With the selectivity of the action of KA and the locus of action verified, in subsequent experiments we examined the second messenger system that mediates the depression of eEPSCs. First, we tested whether PKA was involved in the decreased eEPSCs, by inhibiting either the modulatory or catalytic activity of the kinase, by using the cAMP-Rp or H-89. With the addition of 2 μM H-89 or 100 μM cAMP-Rp, the depression of the eEPSC amplitude by 3 μM KA was prevented ( $93 \pm 5\%$ ,  $n = 7$  after H-89 and  $91 \pm 8\%$ ,  $n = 7$  after cAMP-Rp, vs. KA 3 μM,  $60 \pm 7\%$ , after a transient increase of eEPSCs to  $126 \pm 5\%$  of baseline amplitude,  $n = 14$  Figure 2A,B). The data together point to PKA playing an obligatory part in the observed KAR-mediated modulation of PF-PuC cerebellar glutamatergic transmission. However, given that in other slice preparations, protein kinase C (PKC) has also been implicated in aspects of the KAR-mediated modulation [2,3,9], we examined whether this kinase plays a role in the modulation of the PF-PuC cerebellar synapse by KA. In slice experiments using calphostin C (1 μM) to specifically inhibit PKC, no prevention of KAR-mediated depression was found ( $64 \pm 9\%$ ,  $n = 6$ , Figure 2B), therefore obviating an involvement of PKC in the modulation observed.

The mechanisms mediating KAR-mediated facilitation of glutamate release involve calcium-calmodulin activation of AC [18]. We wanted to check if for the observed depression

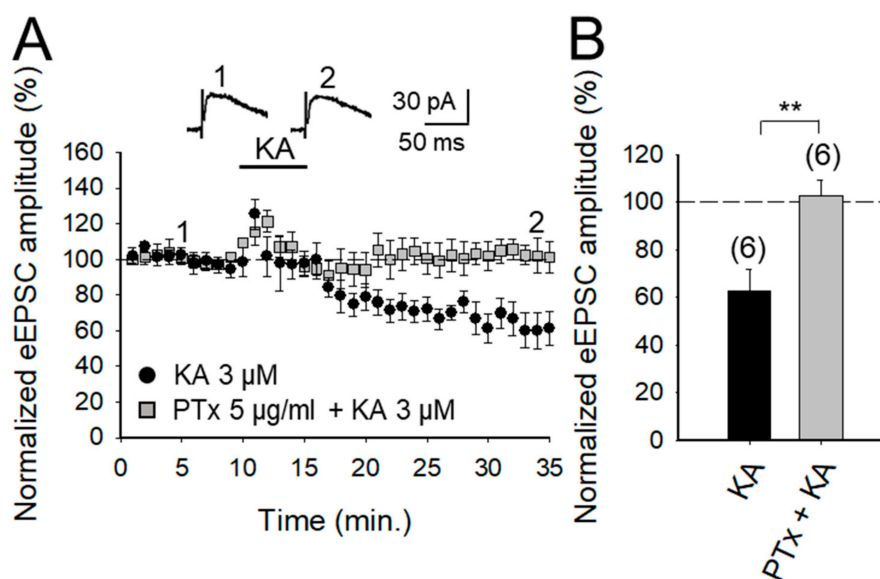
of the transmission the same mechanism operates. We examined this at the cerebellar PF-PuC synapse by treating slices with the calmodulin antagonist, W-7, before recording eEPSCs. With W-7 (25  $\mu$ M) present, KA (3  $\mu$ M)-mediated depression was not affected ( $75 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , with W-7 vs.  $60 \pm 7\%$ ,  $n = 8$  without W7, in interleaved slices; Figure 2B). We additionally performed experiments in the presence of calmidazolium (CMZ, 1  $\mu$ M), an alternative calmodulin antagonist. As with W-7, in presence of CMZ, KA (3  $\mu$ M)-mediated depression of synaptic transmission was not abrogated ( $52 \pm 10$ ,  $n = 6$ , Figure 2B). These data show that a presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin complex is not necessary for KAR-mediated depression of glutamate release at PF-PuC synapses.



**Figure 2.** Adenylyl cyclase (AC) and downstream protein kinase A (PKA) underly the KA-mediated depression of glutamate release in PF-PuC synapses. (A) Time-course of the effect of KA on eEPSC amplitude in control and H-89 treated slices. Inset shows representative traces showing that KA (3  $\mu$ M) does not decrease the amplitude of the eEPSCs in H-89 treated slices. (B) Summary of results. Blockade of PKA by H-89 (2  $\mu$ M) or cAMP-Rp (100  $\mu$ M) prevented the depressive action of KA. Blockade of protein kinase C (PKC) with calphostin C (1  $\mu$ M) had no effect on the KAR-mediated decrease of the eEPSC amplitude (when compared to the first bar, KA). Depression similar to non-treated slices was observed on eEPSC amplitude in slices treated with 25  $\mu$ M W-7 or 1  $\mu$ M CMZ. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parentheses at the top of each bar. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , ANOVA test).

### 2.3. KAR-Mediated Depression of Glutamate Release Requires G Protein at PF-PuC Synapses

$G_{i/o}$  proteins have been reported to be involved in KAR signaling previously since the discovery of a role in KAR-mediated modulation of GABA release in the hippocampus (see [9] for review). Additionally, a role of G protein in KAR-mediated modulation of glutamate release has also been described in the hippocampus [36] and in the amygdala [37]. To determine whether a similar mechanism operates in the cerebellum to modulate glutamate release, we examined here the effect of KA on slices treated with Pertussis toxin (PTx, 5  $\mu$ g/mL). We found that the inhibitory effect of KA was indeed suppressed by PTx, implying selective G-protein involvement in inhibitory modulation by KAR in the preparation under study ( $102 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; vs. control  $62 \pm 9\%$ , after a transient increase of eEPSC to  $131 \pm 9\%$  of baseline amplitude,  $n = 6$ , Figure 3A,B).



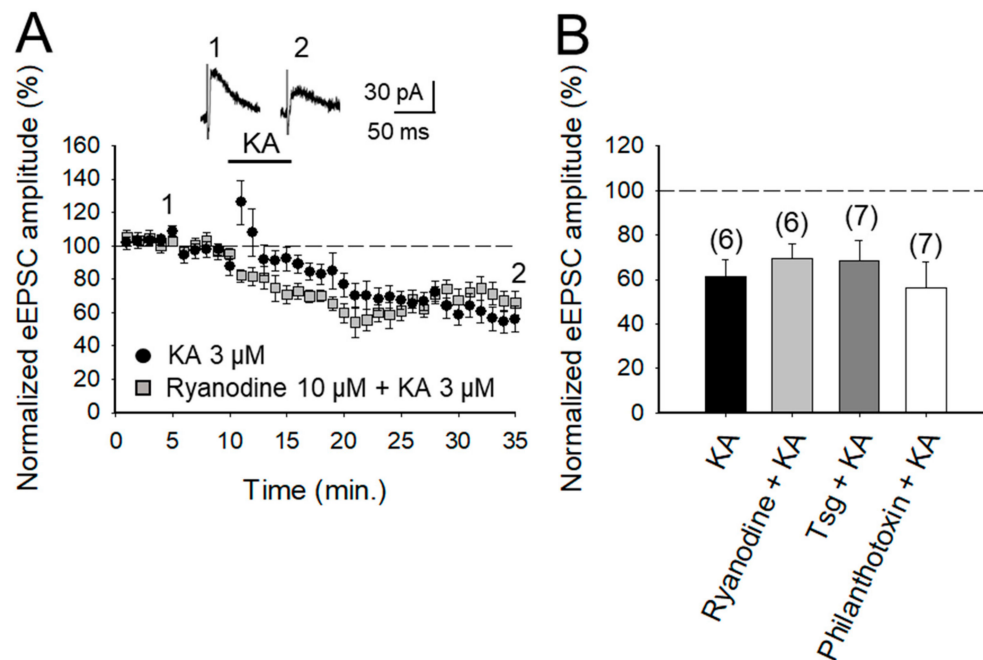
**Figure 3.** KAR-mediated depression of glutamate release is prevented in slices treated with pertussis toxin. (A) Time-course of the effect of KA on eEPSC amplitude in control slices and in slices treated with pertussis toxin. Inset shows representative traces showing that KA (3  $\mu\text{M}$ ) does not affect the amplitude of the eEPSCs in pertussis toxin-treated slices. (B) Summary of results. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parentheses at the top of each bar. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (\*\*  $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test).

#### 2.4. The Depression of Glutamate Release at PF-PuC Synapses is not Mediated by Calcium-Permeable KAR and does not Require Calcium Release from Intracellular Stores

The role of  $\text{Ca}^{2+}$  in mediating KAR-mediated synaptic transmission has been subject of debate and controversy, for instance, at the hippocampal mossy fiber-CA3 (MF-CA3) synapses. Some studies suggest that permeation of  $\text{Ca}^{2+}$  through KARs and subsequent  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores is obligatory for short-term and long-term plasticity at MF-CA3 synapses [21,30,38]. Others have registered no effect of KA on cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  [39] and yet others advocate that a decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration underpins the modulation due to KAR activation [40,41]. To examine the requirement of  $\text{Ca}^{2+}$  at these cerebellar synapses to depress glutamate release, we investigated first the effect of ryanodine, which selectively inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release [42], to elucidate whether this underpins KAR-mediated depression. Ryanodine (10  $\mu\text{M}$ ) treatment had no effect on the KAR-mediated depression of transmission at these PF-PuC synapses ( $69 \pm 9\%$ ,  $n = 7$ , with ryanodine vs.  $62 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , without ryanodine, in interleaved slices after a transient increase of eEPSCs to  $124 \pm 9\%$  of baseline amplitude; Figure 4A,B). Second, to establish whether the activation of KAR causes a  $\text{Ca}^{2+}$  signal that requires amplification by mobilization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  storage, we examined the effect of KA after depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores, using thapsigargin to inhibit the accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  in the SERCA pump. Treatment with thapsigargin (2  $\mu\text{M}$ ) did not affect KAR-mediated depression ( $68 \pm 9\%$ ,  $n = 6$ , with thapsigargin vs.  $62 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , without thapsigargin, in slices interspersed, Figure 4B). Finally, to corroborate the previous results and rule out that the presence of permeating  $\text{Ca}^{2+}$  KAR plays some role in the KA-dependent mechanism in these cerebellar synapses, we investigated the effect of KA on the eEPSC amplitudes in the presence of philanthotoxin, a toxin shown to block unedited,  $\text{Ca}^{2+}$  permeable KARs [30,43]. After treatment of slices with 3  $\mu\text{M}$  philanthotoxin, the synaptic depression mediated by 3  $\mu\text{M}$  KA was not prevented (to  $56 \pm 11\%$  of initial amplitude,  $n = 7$  vs.  $62 \pm 7\%$ ,  $n = 6$  observed in interleaved slices, Figure 3B). All of these compounds were acting at the concentrations used, and while they did not block depression, they blocked the transient increase in eEPSCs observed in control slices:  $84 \pm 6\%$ ,  $n = 6$  in ryanodine,  $76 \pm 6\%$ ,  $n = 7$  in thapsigargin, and  $77 \pm 6\%$ ,  $n = 7$  in philanthotoxin vs.  $62 \pm 7\%$ ,  $n = 6$  transient increase observed in control interleaved



slices). Together, these results show that  $\text{Ca}^{2+}$  permeation through KAR and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from internal stores has no role in the synaptic depression observed at PF-PuC synapses.



**Figure 4.** KAR-mediated depression of glutamate release does not require changes in  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytosol at the PF-PuC synapses. **(A)** Time-course of KA (3  $\mu\text{M}$ ) effect on eEPSC amplitude under the control condition (circles) and in slices treated with Ryanodine (squares). **(B)** Quantification of results for slices treated with ryanodine, thapsigargin and Philanthotoxin. The decrease of eEPSC amplitudes induced by KA is not prevented in any case. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parentheses at the top of each bar. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (Student's *t*-test and ANOVA).

### 3. Discussion

Presynaptic KARs are well known to have a biphasic effect on the release of neurotransmitters, so that low doses of agonists produce an increase in the release of neurotransmitters, while higher concentrations produce a decrease in eEPSCs [2–9]. Although the role of the PKC pathway in some KAR actions is well recognized [2–9], some authors have found that KAR activities are not adequately ionotropic and are not mediated by protein kinases [44] or are mediated by PKA in the hippocampus [26,36,45,46] and in the amygdala [37]. Here, we show that this mechanism involving PKA is not restricted to the hippocampus and the amygdala and extend it to the cerebellum.

The results in this study, utilizing electrophysiological experiments in cerebellar slices, show that the activation of presynaptic KARs, at PF-PuC synapses, invokes a depression of synaptic transmission/glutamate release. Analysis of this modulation suggests a mechanistic coupling of KARs to PKA activity, by the activation of a G-protein. The observed KA-mediated decrease of the eEPSCs at PF-PuC synapses is due to decreased glutamate release, which could be monitored by NMDA receptor-mediated currents (with AMPA receptors antagonized by GYKI53655), and blocked by the KAR/AMPA receptor antagonist NBQX. Under conditions where the AMPA receptor activation is obviated by GYKI53655, this therefore delineates the specific role of KARs in the depressive regulation.

In assessing synaptic regulation, it is of utmost importance to identify the subcellular location of the KAR postulated. We corroborated the presynaptic presence of KARs by electrophysiological analysis of a presynaptically manifest parameter, i.e., the PPR (pair-pulse ratio) of consecutive eEPSCs mediated by neurotransmitter release. A clear increase in the PPR of eEPSCs observed with KA application

in our experiments suggested a change in release probability (by definition a presynaptic property in synaptic transmission). Secondly, we assessed the proportion of synaptic failures in response to KA application. With KA application, the failure proportion was evidently increased, supportive of a decrease in the probability of presynaptic transmitter release and corroborative of the observed depression occurring through KAR activation. Finally, and importantly, the effects of KA observed on NMDA and AMPA receptor-mediated currents were similar. Given that no such equivalence would be predicted if the observed modulation was postsynaptic, the data here are supportive of a presynaptic mode of action for KARs being activated. Altogether, three independent analyses mutually corroborate and emphasize a presynaptic locus of action of KARs functioning at PF-PuC synapses. It remains to be elucidated whether the presynaptic regulation by KA at PF-PuCs reports the activity of KARs subcellularly localized at the nerve terminal/axonal or somatodendritic compartments. The technically challenging paradigms needed to address this question are beyond the scope of the present paper. However, to directly elucidate the presynaptic compartmentalization of KARs, future work necessitates: (i) high-resolution immunolocalization (immunogold-based) of the receptor (contingent on the availability of high affinity antibodies with appropriate KAR subunit-specificity); (ii) targeted blockade of KARs using caged-antagonists (contingent on the pending development of reagents) and (iii) paired recordings (see NMDA receptor studies), [47–51].

In agreement with our previous studies on the hippocampus and the amygdala [36,37] the inhibition of PKA by the cyclic nucleotide analog cAMP-Rp results in the cancellation of the depression mediated by KA of synaptic transmission/release of glutamate in the PF-PuC synapses. The congruence of the mechanism between the synapses is also highlighted in the current study, by observing the inhibition of the catalytic activity of PKA by H-89 [18,26,27,33,34].

In contrast to the mechanism mediating the increase in glutamate release, for depression, preventing the correct functioning of G protein by PTx treatment impedes KAR-mediated depression of glutamate release, showing that there is an initiation / transduction mediated by the G protein followed by cAMP signaling for the subsequent activation of PKA. In the canonical context, the KAR can mediate the entry of external  $Ca^{2+}$  through ionotropic activity [30,43,52], or  $Ca^{2+}$  can be released from intracellular stores, but in our results, a blockade of KAR permeable to  $Ca^{2+}$  by the selective inhibitor, philanthotoxin, or the treatment of the slices with ryanodine, or thapsigargin did not cancel the synaptic depression mediated by KA, ruling out the entry of  $Ca^{2+}$  through KARs or the release of calcium from intracellular stores as the participants in the signaling process that mediate the observed depression of glutamate release mediated by KAR-activation. From our results, it is also clear that the KAR function is conserved at the PF-PuC synapses and is not limited to the first two postnatal weeks as previously reported [17]. KARs have a self-receptor role in developing animals, with the concentration of agonist that determines the presynaptic modulation: facilitation (at low [KA]) and depression (at high [KA]) and, therefore, supposedly determining the consolidation and stability of synapses. However, the modulation of the presynaptic function reported in this document may manifest some forms of plasticity as synaptic refinement may involve glutamate receptors and plasticity [53,54] and KARs have been shown to be involved in plasticity at the PF-PuC synapses (for a review, see [55–57]). Additionally, KARs have been involved in some brain alterations such as epilepsy [58] but whether this involves the cerebellum has not been determined yet. A direct relationship exists between KA injection and cerebellar ataxia. Thus, the cerebellum is an important target to study functions of KARs and their possible role causing ataxia [59–62]. Furthermore, in patients with schizophrenia, an increase in KARs containing GluK2 and GluK5 subunits is observed [63,64]. In neurodegeneration, it has been found that local application of KA in some areas of the cerebellum produces changes in different ion levels, highly increasing  $Ca^{2+}$  levels for weeks, which mediate calcification [65]. KARs have been described as producing increases in intracellular calcium [18,66] and KARs seems to signal increasing intracellular calcium without putting the cell at risk due to excitotoxicity, due to its low conductance in contrast to AMPARs. Due to the lack of knowledge on the subject, further exploration is necessary to determine the KAR role in cerebellum development and cerebellar alterations.

In conclusion, our study shows that the presynaptic activation of KAR by KA at the PF-PuC synapses produces a depression of synaptic transmission and a decrease in the amount of glutamate released. We postulate that mechanically, KAR-mediated presynaptic depression involves the activation of a G protein that would signal the activation of AC1 or AC8 to reduce cAMP levels to mediate a decrease in glutamate release and, therefore, in synaptic transmission at the PF-PuC synapses in the cerebellum.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Animals

The experiments were performed on 4–6-week-old C57Bl/6 male mice obtained from Harlan Laboratories (Spain). Experiments were conducted in accordance with the European Union directive for the use of laboratory animals in acute experiments and were approved by the local Ethical Committee (Junta de Andalucía and University Pablo de Olavide, Sevilla, Spain) (Session 2/12, 8 February 2012).

### 4.2. Slice Preparation

Cerebellar parasagittal acute slices were prepared as described previously [18] (Falcón-Moya et al., 2018). Briefly, after decapitation, the whole brain was removed under ice-cold buffered salt solution consisting of (in mM) 124 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, and 10 glucose (pH 7.2, 300 mOsm) and was positioned on the stage of a vibratome slicer (Leica 1000S) and cut to obtain cerebellar slices (350 µm thick) containing parallel fibers-Purkinje cells synapses. Slices were maintained continuously oxygenated for at least 1 h before use. All experiments were carried out at room temperature (22–25 °C). In total, 6–14 slices from 2–3 animals were used for each experiment.

### 4.3. Electrophysiological Recordings

Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from Purkinje neurons. NMDA receptor-mediated evoked postsynaptic currents (eEPSCs) were recorded at +40 mV from these neurons visually identified by infrared-differential interference contrast (IR-DIC) microscopy using a 40× water immersion objective. Perfusion solution contained GYKI53655 (30 µM), to block AMPA receptors, and bicuculline (10 µM), to block GABA<sub>A</sub> receptors. In experiments involving AMPA receptor-mediated currents, performed at −70 mV, no GYKI53655 was used, but D-AP5 (50 µM) was included to block NMDA receptors. To evoke eEPSCs, electrical pulses were delivered to granule cells axons (parallel fibers) using a monopolar electrode placed in the molecular layer at a frequency of 0.2 Hz. Patch electrodes were made from borosilicate glass and had a resistance of 4–7 MΩ when filled with (mM): 120 CsCl, 8 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 2 EGTA and 20 QX-314 (pH 7.2, 290 mOsm). A 40 ms paired-pulse stimulation protocol was used for pair pulse ratio (PPR) analysis. Neurons were voltage clamped, using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Foster City, CA, USA). Access resistance was regularly monitored during recordings, and cells were rejected if it changed >15% during the experiment. Data were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz, and stored on a computer using pClamp software (Molecular Devices). Synaptic failures were identified as the lack of synaptic responses after presynaptic stimulation with the amplitude of these responses being no different from basal noise amplitude.

### 4.4. Data Analysis

Data were normalized, taking the control as 100% of the response, and are presented as means ± SEM. Signals were averaged every 12 traces. Effects of KA were measured at peak (maximum) compared to averaged 10 min baseline points. Significance was assessed at  $p < 0.05$ . A normality and equal variance test was performed before statistical comparisons. Statistical comparisons were made using two-tailed Student's *t*-test for comparison of two data sets and analysis of variance (ANOVA) for comparison of multiple data sets using the Bonferroni as a *post hoc* test.

#### 4.5. Compounds

Salts and general reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA); GYKI 53655, D-AP5, NBQX, bicuculline, Rp-Br-cAMP, H-89, forskolin, philanthotoxin, ryanodine, thapsigargin, kainate, Pertussis toxin, CMZ and W-7 were obtained from Tocris (Bristol, UK).

**Author Contributions:** Conceptualization, A.R.-M.; methodology, A.R.-M.; formal analysis, R.F.-M. and P.L.-R.; investigation, A.R.-M., R.F.-M. and P.L.-R.; resources, A.R.-M.; data curation, R.F.-M. and P.L.-R.; writing—original draft preparation, A.R.-M.; writing—review and editing, A.R.-M.; visualization, A.R.-M.; supervision, A.R.-M.; project administration, A.R.-M. and R.F.-M.; funding acquisition, A.R.-M.

**Funding:** This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, grant number BFU2012-38208-P.

**Acknowledgments:** We thank Dr. Cristina Calvino for technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Lerma, J.; Paternain, A.V.; Rodríguez-Moreno, A.; López-García, J.C. Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol. Rev.* **2001**, *89*, 971–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J. Neurochem.* **2007**, *103*, 2121–2135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Kainate receptors with a metabotropic modus operandi. *Trends Neurosci.* **2007**, *30*, 630–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jane, D.E.; Lodge, D.; Collingridge, G.L. Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutical potential. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 90–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Metabotropic actions of kainate receptors in the control of glutamate release in the hippocampus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *717*, 39–48.
6. Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Metabotropic actions of kainate receptors in the control of GABA release. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *717*, 1–10.
7. Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: Mechanisms. *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 982–987. [[CrossRef](#)]
8. Valbuena, S.; Lerma, J. Non-canonical signalling, the hidden life of ligand-gated ion channels. *Neuron* **2016**, *92*, 316–329. [[CrossRef](#)]
9. Negrete-Díaz, J.V.; Sihra, T.S.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Non-canonical mechanisms of presynaptic kainate receptors controlling glutamate release. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *20*, 128. [[CrossRef](#)]
10. Lerma, J.; Marques, J.M. Kainate receptors in health and disease. *Neuron* **2013**, *80*, 292–311. [[CrossRef](#)]
11. Smith, T.C.; Wang, L.Y.; Howe, J.R. Distinct kainate receptor phenotypes in immature and mature mouse cerebellar granule cells. *J. Physiol.* **1999**, *517*, 51–58. [[CrossRef](#)]
12. Bettler, B.; Boulter, J.; Hermans-Borgmeyer, I.; O’Shea-Greenfield, A.; Deneris, E.S.; Moll, C. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: Expression in the nervous system during development. *Neuron* **1990**, *5*, 583–595. [[CrossRef](#)]
13. Herb, A.; Burnashev, N.; Werner, P.; Sakmann, B.; Wisden, W.; Seeburg, P.H. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* **1992**, *8*, 775–785. [[CrossRef](#)]
14. Bahn, S.; Volk, B.; Wisden, W. Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 5525–5547. [[CrossRef](#)]
15. Petralia, R.S.; Wang, Y.X.; Wenthold, R.J. Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* **1994**, *349*, 85–110. [[CrossRef](#)]
16. Swanson, G.T.; Feldmeyer, D.; Kaneda, M.; Cull-Candy, S.G. Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J. Physiol.* **1996**, *492*, 129–142. [[CrossRef](#)]
17. Delaney, A.J.; Jahr, C.E. Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron* **2003**, *36*, 475–482. [[CrossRef](#)]

18. Falcón-Moya, R.; Losada-Ruiz, P.; Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Cerebellar kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release requires  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin and PKA. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 195. [[CrossRef](#)]
19. Lauri, S.E.; Bortolotto, Z.A.; Bleakman, D.; Ornstein, P.L.; Lodge, D.; Isaac, J.T.R. A critical role of a facilitatory kainate autoreceptor in mossy fiber LTP. *Neuron* **2001**, *32*, 697–709. [[CrossRef](#)]
20. Lauri, S.E.; Delany, C.; Clarke, V.E.J.; Bortolotto, Z.A.; Ornstein, P.I.; Isaac, J.T. Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuropharmacology* **2001**, *41*, 907–915. [[CrossRef](#)]
21. Lauri, S.E.; Bortolotto, Z.A.; Nistico, R.; Bleakman, D.; Ornstein, P.L.; Lodge, D. A role for  $\text{Ca}^{2+}$  stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* **2003**, *39*, 327–341. [[CrossRef](#)]
22. Schmitz, D.; Mellor, J.; Nicoll, R.A. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* **2001**, *291*, 1972–1976. [[CrossRef](#)]
23. Ji, Z.; Stäubli, U. Presynaptic kainate receptors play different physiological roles in mossy fiber and associational-commissural synapses in CA3 of hippocampus from adult rats. *Neurosci. Lett.* **2002**, *331*, 71–74. [[CrossRef](#)]
24. Contractor, A.; Sailer, A.; Darstein, M.; Maron, C.; Xu, J.; Swanson, G. Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation at mossy-fiber synapses in  $\text{KA2}^{-/-}$  mice. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 422–429. [[CrossRef](#)]
25. Breustedt, J.; Schmitz, D. Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10093–10098. [[CrossRef](#)]
26. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *J. Physiol.* **2004**, *557*, 733–745. [[CrossRef](#)]
27. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin and PKA in cerebrocortical synaptosomes. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 788–792. [[CrossRef](#)]
28. Campbell, S.L.; Mathew, S.S.; Hablitz, J.J. Pre- and postsynaptic effects of kainate on layer II/III pyramidal cells in rat neocortex. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 37–47. [[CrossRef](#)]
29. Pinheiro, P.S.; Perrais, D.; Coussen, F.; Barhanin, J.; Bettler, B.; Mann, J.R. GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12181–12186. [[CrossRef](#)]
30. Scott, R.; Lalic, T.; Kullmann, D.M.; Capogna, M.; Rusakov, D.A. Target-cell specificity of kainate autoreceptor and  $\text{Ca}^{2+}$  store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fibers. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 13139–13149. [[CrossRef](#)]
31. Fernandes, H.B.; Catches, J.S.; Petralia, R.S.; Copits, B.A.; Xu, J.; Russell, T.A. High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron* **2009**, *63*, 818–829. [[CrossRef](#)]
32. Jouhanneau, J.S.; Ball, S.M.; Molnár, E.; Isaac, J.T.R. Mechanisms of bi-directional modulation of thalamocortical transmission in barrel cortex by presynaptic kainate receptors. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 832–841. [[CrossRef](#)]
33. Andrade-Talavera, Y.; Duque-Feria, P.; Negrete-Díaz, J.V.; Sihra, T.S.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin at mossy fiber-CA3 synapses. *J. Neurochem.* **2012**, *122*, 891–899. [[CrossRef](#)]
34. Andrade-Talavera, Y.; Duque-Feria, P.; Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic kainate-receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin at thalamocortical synapses. *J. Neurochem.* **2013**, *126*, 565–578. [[CrossRef](#)]
35. Manabe, T.; Willey, D.J.; Perkel, D.J.; Nicoll, R.A. Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* **1993**, *70*, 1451–1459. [[CrossRef](#)]
36. Negrete-Díaz, J.V.; Sihra, T.S.; Delgado-García, J.M.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *J. Neurophysiol.* **2006**, *96*, 1829–1837. [[CrossRef](#)]
37. Negrete-Díaz, J.V.; Duque-Feria, P.; Andrade-Talavera, Y.; Carrión, M.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptor-mediated depression of glutamatergic transmission involving protein kinase A in the lateral amygdala. *J. Neurochem.* **2012**, *121*, 36–43. [[CrossRef](#)]



38. Lyon, L.; Borel, M.; Carrión, M.; Kew, J.N.; Corti, C.; Harrison, P.J.; Burnet, P.W.; Paulsen, O.; Rodríguez-Moreno, A. Hippocampal mossy fiber long-term depression in Grm2/3 double knockout mice. *Synapse* **2011**, *65*, 945–954. [[CrossRef](#)]
39. Kamiya, H.; Umeda, K.; Ozawa, S.; Manabe, T. Presynaptic Ca<sup>2+</sup> entry is unchanged during hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 10524–10528. [[CrossRef](#)]
40. Kamiya, H.; Ozawa, S. Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Physiol.* **1998**, *509*, 833–845. [[CrossRef](#)]
41. Kamiya, H.; Ozawa, S. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre. *J. Physiol.* **2000**, *523*, 653–665. [[CrossRef](#)]
42. Berridge, M.J. Neuronal calcium signalling. *Neuron* **1998**, *21*, 13–26. [[CrossRef](#)]
43. Fletcher, E.J.; Lodge, D. New developments in the molecular pharmacology of AMPA and kainate receptors. *Pharmacol. Ther.* **1996**, *70*, 65–89. [[CrossRef](#)]
44. Frerking, M.; Schmitz, D.; Zhou, Q.; Johansen, J.; Nicoll, R.A. Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3 CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 2958–2966. [[CrossRef](#)]
45. Negrete-Díaz, J.V.; Sihra, T.S.; Delgado-García, J.M.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition converges with presynaptic inhibition mediated by Group II mGluRs and long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *J. Neural Transm.* **2007**, *114*, 1425–1431. [[CrossRef](#)]
46. Grabauskas, G.; Lancaster, B.; O'Connor, V.; Wheal, H.V. Protein kinase signalling requirements for metabotropic action of kainate receptors in rat CA1 pyramidal neurones. *J. Physiol.* **2007**, *579*, 363–373. [[CrossRef](#)]
47. Rodríguez-Moreno, A.; Paulsen, O. Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 744–745. [[CrossRef](#)]
48. Rodríguez-Moreno, A.; Kohl, M.M.; Reeve, J.E.; Eaton, T.R.; Collins, H.A.; Anderson, H.L.; Paulsen, O. Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 8564–8569. [[CrossRef](#)]
49. Reeve, J.E.; Kohl, M.M.; Rodríguez-Moreno, A.; Paulsen, O.; Anderson, H.L. Caged intracellular NMDA receptor blockers for the study of subcellular ion channel function. *Commun. Integr. Biol.* **2012**, *5*, 240–242. [[CrossRef](#)]
50. Rodríguez-Moreno, A.; González-Rueda, A.; Banerjee, A.; Upton, A.L.; Craig, M.T.; Paulsen, O. Presynaptic self-depression at developing neocortical synapses. *Neuron* **2013**, *77*, 35–42. [[CrossRef](#)]
51. Pérez-Rodríguez, M.; Arroyo-García, L.E.; Prius-Mengual, J.; Andrade-Talavera, Y.; Armengol, J.A.; Pérez-Villegas, E.M.; Duque-Feria, P.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Adenosine receptor-mediated developmental loss of spike timing-dependent depression in the hippocampus. *Cereb. Cortex.* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)]
52. Perkinson, M.S.; Sihra, T.S. A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* **1999**, *90*, 1281–1292. [[CrossRef](#)]
53. Torres-García, M.E.; Solís, O.; Patricio, A.; Rodríguez-Moreno, A.; Camacho-Abrego, I.; Limón, I.D.; Flores, G. Dendritic morphology changes in neurons from the prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens in rats after lesion of the thalamic reticular nucleus. *Neuroscience* **2012**, *223*, 429–438. [[CrossRef](#)]
54. Andrade-Talavera, Y.; Duque-Feria, P.; Paulsen, O.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic spike timing-dependent long-term depression in the mouse hippocampus. *Cereb. Cortex.* **2016**, *26*, 3637–3654. [[CrossRef](#)]
55. Hirano, T. Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol.* **1992**, *89*, 183–195. [[CrossRef](#)]
56. Sihra, T.S.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptors: multiple roles in neuronal plasticity. *Neuroscientist* **2014**, *20*, 29–43. [[CrossRef](#)]
57. Mateos-Aparicio, P.; Rodríguez-Moreno, A. The impact of studying brain plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 66. [[CrossRef](#)]
58. Falcón-Moya, R.; Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptors: Role in epilepsy. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 217. [[CrossRef](#)]
59. Maiti, A.; Salles, K.S.; Grassi, S.; Abood, L.G. Behavior and receptor changes after kainate lesioning of nodular cerebellum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1986**, *25*, 589–594. [[CrossRef](#)]

60. De Vera, N.; Camón, L.; Martínez, E. Cerebral distribution of polyamines in kainic acid-induced models of status epilepticus and ataxia in rats. Overproduction of putrescine and histological damage. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2002**, *12*, 397–405. [[CrossRef](#)]
61. Yamaguchi, T.; Hayashi, K.; Murakami, H.; Maruyama, S.; Yamaguchi, M. Distribution and characterization of the glutamate receptors in the CNS of ataxic mutant mouse. *Neurochem. Res.* **1984**, *9*, 497–505. [[CrossRef](#)]
62. Andoh, T.; Kishi, H.; Motoki, K.; Nakanishi, K.; Kuraishi, Y.; Muraguchi, A. Protective Effect of IL-18 on Kainate-and IL-1  $\beta$ -induced cerebellar ataxia in mice. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 2322–2328. [[CrossRef](#)]
63. Harrison, P.J.; Barton, A.J.; Najlerahim, A.; Pearson, R.C. Distribution of a kainate/AMPA receptor mRNA in normal and Alzheimer brain. *Neuroreport* **1990**, *1*, 149–152. [[CrossRef](#)]
64. Bullock, W.M.; Cardon, K.; Bustillo, J.; Roberts, R.C.; Perrone-Bizzozero, N.I. Altered expression of genes involved in GABAergic transmission and neuromodulation of granule cell activity in the cerebellum of schizophrenia patients. *Am. J. Psych.* **2008**, *165*, 1594–1603. [[CrossRef](#)]
65. Korf, J.; Postema, F. Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *J. Neurochem.* **1984**, *43*, 1052–1060. [[CrossRef](#)]
66. Savidge, J.R.; Bleakman, D.; Bristow, D.R. Identification of kainate receptor-mediated intracellular calcium increases in cultured rat cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 1763–1766. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Kainate receptor modulation of glutamatergic synaptic transmission in the CA2 region of the hippocampus

Rafael Falcón-Moya | Irene Martínez-Gallego | Antonio Rodríguez-Moreno 

Laboratorio de Neurociencia Celular y Plasticidad, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain

## Correspondence

Antonio Rodríguez-Moreno, Laboratorio de Neurociencia Celular y Plasticidad, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Ctra. de Utrera, Km. 1 41013 Sevilla, Spain.  
Email: arodmor@upo.es

## Funding information

Agencia Estatal de Investigación; FEDER, Grant/Award Number: BFU2015-68655-P; Funding for open access publishing: Universidad Pablo de Olavide/CBUA

## Abstract

Kainate (KA) receptors (KARs) are important modulators of synaptic transmission. We studied here the role of KARs on glutamatergic synaptic transmission in the CA2 region of the hippocampus where the actions of these receptors are unknown. We observed that KA depresses glutamatergic synaptic transmission at Schaffer collateral-CA2 synapses; an effect that was antagonized by NBQX (a KA/AMPA receptors antagonist) under condition where AMPA receptors were previously blocked. The study of paired-pulse facilitation ratio, miniature responses, and fluctuation analysis indicated a presynaptic locus of action for KAR. Additionally, we determined the action mechanism for this depression of glutamate release mediated by the activation of KARs. We found that inhibition of protein kinase A suppressed the effect of KAR activation on evoked excitatory post-synaptic current, an effect that was not suppressed by protein kinase C inhibitors. Furthermore, in the presence of Pertussis toxin, the depression of glutamate release mediated by KAR activation was not present, invoking the participation of a  $G_{i/o}$  protein in this modulation. Finally, the KAR-mediated depression of glutamate release was not suppressed by treatments that affect calcium entry through voltage-dependent calcium channels or calcium release from intracellular stores. We conclude that KARs present at these synapses mediate a depression of glutamate release through a mechanism that involves the activation of G protein and protein kinase A.

## KEYWORDS

CA2, G protein, GluK1, glutamate, hippocampus, kainate receptor, protein kinase A

## 1 | INTRODUCTION

Kainate-type glutamate receptors are well-established mediators of ionotropic post-synaptic transmission and presynaptic modulators of

neurotransmitter release. In their modulatory role, kainate receptors (KARs) control both glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) release (for review see Jane et al., 2009; Negrete-Díaz et al., 2018; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2007a, 2011a; Sihra & Rodríguez-Moreno, 2011, 2013;

**Abbreviations:** AC, adenylate cyclase; AMPA,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; ATPA, (RS)-2-Amino-3-(3-hydroxy-5-tert-butylisoxazol-4-yl)propanoic acid; CA, cornu ammonis; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; D-AP5, (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid; eEPSCs, evoked excitatory post-synaptic currents; GABA, gamma-aminobutyric acid; KA, kainate; KAR, kainate receptor; MF, mossy fiber; NBQX, 2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline; NMDA, N-methyl-D-aspartate acid; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PPR, paired-pulse ratio; PTx, pertussis toxin; SC, Schaffer collateral.

Rafael Falcón-Moya and Irene Martínez-Gallego contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2021 The Authors. *Journal of Neurochemistry* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of International Society for Neurochemistry



Valbuena & Lerma, 2016). At mossy fiber (MF)-cornu ammonis 3 (CA3) synapses of the hippocampus, thalamocortical synapses of somatosensory cortex, and parallel fiber-Purkinje cell synapses of the cerebellum, the KAR-mediated modulation is found to be biphasic, with low agonist concentrations facilitating glutamate release and higher agonist concentrations inhibiting neurotransmitter release (see Negrete-Díaz et al., 2018; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2007a, 2011a; Sihra & Rodríguez-Moreno, 2011, 2013 for reviews).

KARs are expressed in the hippocampus and mRNA transcripts for KAR subunits (GluK1-GluK5) have been detected and functional expression of KAR subtypes has been reported (Bahn et al., 1994; Bettler et al., 1990; Herb et al., 1992; Paternain et al., 2000; Petralia et al., 1994; Swanson et al., 1996). The function of KARs as modulators of neurotransmitter release in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus is relatively well known for both GABA and glutamate (see Rodríguez-Moreno & Sihra, 2007a, 2013 for reviews). Controlling glutamate release, KARs have been described to mediate a depression at Schaffer collateral (SC)-CA1 synapses (Chittajallu et al., 1996; Frerking et al., 2001; Kamiya & Ozawa, 1998). At MF-CA3 synapses, they have a biphasic action on glutamate release, with low agonist concentrations facilitating synaptic transmission, and higher concentrations depressing synaptic transmission (see Rodríguez-Moreno & Sihra, 2013 for review).

The region CA2 of the hippocampus is a relatively small area interposed between CA3 and CA1 that forms the nexus linking the input of EC to the output of CA1 (Chevalleyre & Siegelbaum, 2010). While this area was discovered by Lorente de Nó in 1934 little is known about its functions (Hitti & Siegelbaum, 2014). Recent discoveries have revealed that this region is involved in the formation of social and spatio/temporal memories (Hitti & Siegelbaum, 2014; Piskorowski & Chevalleyre, 2018). In addition, CA2 network seems to play a critical role in balancing levels of excitation (E) and inhibition (I) in the hippocampus (Boehringer et al., 2017). Importantly, E/I imbalances have been implicated in many brain and neurodevelopmental disorders (Sohal & Rubenstein, 2019). The physiological presence of KARs in this region has not been investigated and is not known. CA2 neurons also receive SC input from CA3 neurons, much like the cells of area CA1 (Lorente de Nó, 1934). For this, here we studied whether KARs are physiologically present in this region and their synaptic role at SC-CA2 principal neurons synapses.

We found for first time, that functional KAR are present at the CA2 region of the hippocampus, where they mediate a depression (and not a facilitation) of glutamate release that has an obligatory dependency on G protein function and requires cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-mediated PKA activity.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Animals

The experiments were performed on P13–21 C57Bl/6 mice of either sex obtained from Harlan Laboratories (Spain). Animals were housed in small groups (3–5 mice) at temperatures between 18° and 24° at 40%–60%

humidity and had free access to water and food. Forty-five animals were used. Three animals per experiment were used. No randomization was performed to allocate subjects in the study. Animals were allocated arbitrarily. No exclusion criteria were predetermined. Experiments were conducted all day long. Experiments were conducted in accordance with the European Union directive for the use of laboratory animals in acute experiments and were approved by the local Ethical Committee (Junta de Andalucía and University Pablo de Olavide, Sevilla, Spain), reference number: 18/01/2017/002. The study was not pre-registered.

### 2.2 | Slice preparation

Hippocampal slices were prepared as described previously (Falcón-Moya et al., 2020). Briefly, for general and sufficient anesthesia animals were anesthetized with isoflurane and after decapitation, the whole brain was removed under ice-cold-buffered salt solution consisting of (in mM) 124 NaCl, 2.69 KCl, 1.25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , and 10 glucose (pH 7.2, 300 mOsm), and positioned on the stage of a vibratome slicer (Leica 1000S), and cut to obtain transverse hippocampal slices (350- $\mu\text{m}$  thick). Slices were maintained continuously oxygenated for at least 1 hr before use. All experiments were carried out at near physiological temperature (32°C).

### 2.3 | Electrophysiological recordings

Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from CA2 pyramidal neurons. CA2 neurons, situated between CA3 and CA1 regions were identified by their characteristic and distinctive physiological properties. As KA is an agonist of kainate and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors, we mostly studied NMDA receptor-mediated evoked post-synaptic currents (eEPSCs) were recorded at +40 mV from these neurons visually identified by infrared-differential interference contrast (IR-DIC) microscopy using a 40 $\times$  water immersion objective. Perfusion solution contained GYKI53655 (30  $\mu\text{M}$ ), to block AMPA receptors, and picrotoxin or Gabazine (10  $\mu\text{M}$ ), to block GABA<sub>A</sub> receptors. In experiments involving AMPA receptor-mediated currents, performed at -70 mV, no GYKI53655 was used, but (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (D-AP5) (50  $\mu\text{M}$ ) was included to block NMDA receptors. To evoke eEPSCs, electrical pulses were delivered to CA3 pyramidal neuron axons (Schaffer collaterals) using a monopolar electrode at a frequency of 0.2 Hz. Patch electrodes were made from borosilicate glass and had a resistance of 4–7 M $\Omega$  when filled with (mM): 120 CsCl, 8 NaCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\text{CaCl}_2$ , 10 HEPES, 2 EGTA, and 20 QX-314 (pH 7.2, 290 mOsm). A 40 ms paired-pulse stimulation protocol was used for paired-pulse ratio (PPR) analysis. Neurons were voltage clamped, using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices). Access resistance was regularly monitored during recordings, and cells were rejected if it changed >15% during the experiment. Data were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz, and stored on a computer using pClamp software (Molecular Devices).

## 2.4 | Data analysis

Analysis was not performed blind to the condition of the experiments. The same and consistent criteria were applied for data acquisition and analysis. Samples sizes used are similar to those used in the field and are the result of the use of power analysis on preliminary results using  $\alpha = 0.005$  and  $\beta = 0.2$ . No test for outliers was used. No animals or data were excluded from analysis. Shapiro–Wilk normality and equal variance tests, with a confidence interval of 95% were performed before the statistical comparisons. Data were normalized taking the control as 100% of the response and presented as means  $\pm$  SEM. Signals were averaged every 12 traces. Effects of KA were measured at peak (maximum) compared to averaged 10 min baseline points. Significance was assessed at  $p < .05$ . Statistical comparisons were made using two-tailed Student's *t* test for comparison of two datasets and ANOVA for comparison of multiple dataset using the Bonferroni as a *post hoc* test. Analysis was performed with Sigmaplot 11.0.

## 2.5 | Compounds

Salts and general reagents were purchased from Sigma. Gabazine (SR-95531) (Cat. No. S106) was acquired from Sigma. GYKI53655 (Cat. No. 2555), Picrotoxin (Cat. No. 1128), D-AP5 (Cat. No. 0106), 2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzof[quinoxaline] (NBQX) (Cat. No. 0373), Ryanodine (Cat. No. 1329), Calphostin C (Cat. No. 1626), H89 (Cat. No. 2910), Kainic acid (Cat. No. 0222), Rp-Br-cAMP (Cat. No. 1337), Thapsisargin (Cat. No. 1138), Pertussis Toxin (Cat. No. 3097), (RS)-2-Amino-3-(3-hydroxy-5-tert-butylisoxazol-4-yl)propanoic acid (ATPA) (Cat. No. 1107), and UBP302 (Cat. No. 2079) were obtained from Tocris.

Gabazine, GYKI53655, Picrotoxin, D-AP5, NBQX, Kainate, nimodipine, ATPA, and UBP302 were bath-applied using the perfusion system. Antagonists Gabazine, GYKI53655, picrotoxin, NBQX, and UBP302 did not affect baseline when recording NMDAR-mediated currents. For Rp-Br-cAMP, H-89, Calphostin C, Thapsisargin, and Ryanodine experiments, slices were pre-incubated for 60 min in the presence of these compounds. For Pertussis toxin experiments, slices were pre-incubated for 120–180 min. Control slices received the same treatment. When pre-incubated, compounds were not included in the extracellular solution during recordings.

## 3 | RESULTS

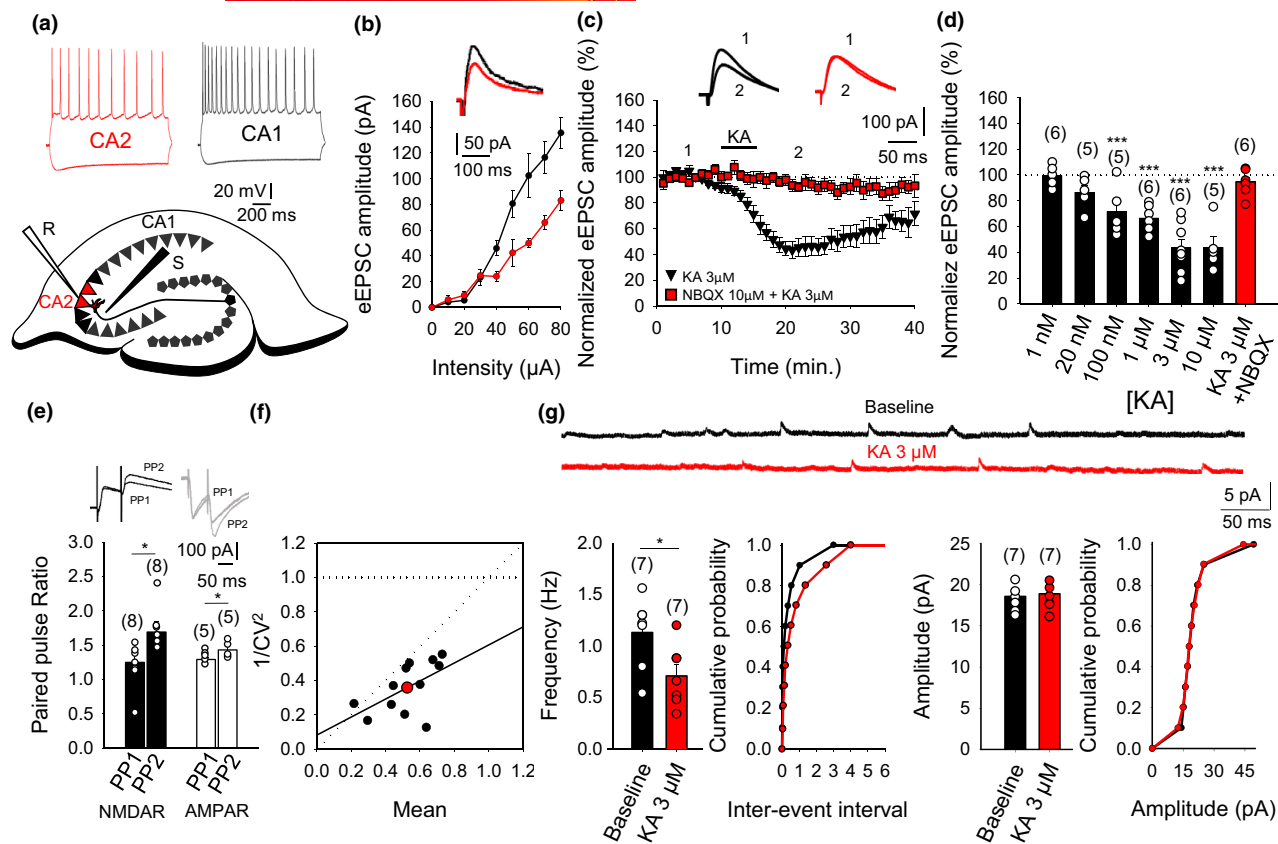
### 3.1 | The activation of kainate receptors by 3 $\mu$ M KA produces a decrease in the amplitude of NMDA receptor-mediated post-synaptic currents at SC-CA2 synapses

In the hippocampus, glutamatergic transmission at SC-CA1 synapses is depressed by the activation of KARs, whereas these receptors mediate a biphasic effect of glutamate release at MF-CA3 synapses.

We studied here the action of KA on glutamate release at SC-CA2 synapses of the hippocampus in slices from mouse. We stimulated SC axons while measuring NMDA receptor-mediated eEPSCs in CA2 pyramidal cells, by obtaining whole-cell patch clamp recordings, with the membrane potential held at +40 mV. CA2 principal cells were identified by their location along the transverse axis of the slice, and distinct intrinsic electrophysiological properties (Chevalyere & Siegelbaum, 2010; Sun et al., 2014). Thus, compared with CA1, CA2 pyramidal neurons fire action potentials after a longer delay and had a lower input resistance, (CA1 =  $102 \pm 12$  M $\Omega$ ; CA2 =  $73 \pm 14$  M $\Omega$ ) (Figure 1a). Next, we confirmed previously reported (Srinivas et al., 2017) differences in the magnitude of EPSCs recorded in CA2 and CA1 pyramidal neurons in response to stimulation (input/output curve, Figure 1b) and evaluated resting membrane potentials (CA2 pyramidal neurons resting potential,  $76.7 \pm 0.1$  mV is more negative than that of CA1 pyramidal neurons,  $67.2 \pm 1.1$  mV).

Recordings were made in the presence of 30  $\mu$ M GYKI53655, to avoid AMPA receptor activation, and 10  $\mu$ M picrotoxin or gabazine, to antagonize GABA<sub>A</sub> receptors. In this experimental condition a depression of NMDA receptor-mediated eEPSC amplitudes was observed when 20 nM–3  $\mu$ M KA was applied (20 nM:  $86 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; 100 nM:  $71 \pm 9\%$ ,  $n = 5$ ; 1  $\mu$ M:  $66 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ ; 3  $\mu$ M:  $44 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ ; 10  $\mu$ M:  $44 \pm 8\%$ ,  $n = 5$ ; Figure 1c,d). Different from what was observed at MF-CA3 and similar to that observed at SC-CA1 synapses, none of the concentrations used produced an increase in glutamate release as can be observed in the dose-response curve shown in Figure 1d. We used 3  $\mu$ M KA in subsequent experiments as 3  $\mu$ M KA produced the maximum level of depression observed. To determine whether the effect of KA recorded from CA2 pyramidal cells (PC) in slices was mediated by the activation of KARs, similar to what has been observed in other brain regions, such as other synapses of the hippocampus and in the cortex (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013; Breustedt & Schmitz, 2004; Campbell et al., 2007; Contractor et al., 2003; Fernandes et al., 2009; Ji & Stäubli, 2002; Jouhanneau et al., 2011; Lauri et al., 2001, 2003; Negrete-Díaz et al., 2006, 2007, 2012; Pinheiro et al., 2007; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2004; Schmitz et al., 2001; Scott et al., 2008), we performed experiments in the presence of NBQX. We found that the 3  $\mu$ M KA effect on the eEPSC amplitude was suppressed in the presence of 10  $\mu$ M NBQX ( $95 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ , Figure 1a). In these experiments, as AMPA receptors were previously antagonized by GYKI53655 in the bath, the antagonism by NBQX indicates that the observed depression was due to the selective and specific activation of KARs.

Then, we wanted to determine the locus of action of KARs. First, we performed paired-pulse recordings and measured the PPR (pair-pulse facilitation was observed at 40 ms pulse interval). PPR was  $1.2 \pm 0.11$  ( $n = 8$ ) under control conditions. After KA treatment, PPR increased to  $1.6 \pm 0.16$  ( $n = 8$ ), indicating an effect on release probability (Manabe et al., 1993), suggesting a presynaptic action of KA to depress glutamate release (Figure 1e). This presynaptic locus of action for KA was confirmed when studying PPR on AMPA receptor-mediated currents. AMPA receptor-mediated eEPSCs recorded at  $-70$  mV (without GYKI53655, but with D-AP5 and picrotoxin, to,



**FIGURE 1** Kainate (KA) reduces the evoked excitatory post-synaptic currents (eEPSCs) amplitude at Schaffer-cornu ammonis 2 (CA2) principal cells (Schaffer collateral [SC]-CA2 PC) synapses of the hippocampus by activating presynaptic kainate receptors (KARs). (a) Scheme showing the general experimental set-up: R, recording electrode; S stimulating electrode. Traces show spike pattern of CA2 (red) and CA1 (black) pyramidal neurons. (b) Input/output curve showing amplitudes of EPSC in function of the applied stimulus intensity and the amplitude from SC-CA2 synapses (Red) and SC-CA1 synapses (Black). (c) Time course of KA ( $3 \mu\text{M}$ ) effect on eEPSCs amplitude in the absence (black) and presence of NBQX (red). Inset show traces before (1) and after (2) KA treatment in the absence (black) and in the presence of  $10 \mu\text{M}$  NBQX (red). (d) Quantification of modulation and dose dependency of KA effect on eEPSCs amplitude in the absence and presence of NBQX. (e) KA perfusion an increase in the paired pulse ratio of NMDAR AMPAR-mediated currents. Inset shows scaled traces (f) Normalized plot of  $\text{CV}^2$  versus mean EPSC amplitude yields data points mainly below the diagonal after KA. (g) Miniature EPSC (mEPSCs) monitored during the baseline and after applying KA ( $3 \mu\text{M}$ ) in the presence of TTX ( $500 \text{ nM}$ ). Histograms and cumulative graphs show that after KA application, the frequency of mEPSCs decreases, whereas the amplitude of mEPSCs remains constant. The number of slices (from three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means  $\pm$  SEM ( $*p < .05$ ,  $***p < .001$ , Student's *t* test)

respectively, block NMDA and  $\text{GABA}_A$  receptors). KA was used at a low concentration ( $0.3 \mu\text{M}$ ) that activates KARs but not AMPARs (Lerma et al., 2001). In this experimental condition, KA produced a decrease in eEPSCs amplitude ( $64 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ ) and an increase in PPR ( $1.29 \pm 0.3$  ( $n = 5$ )) under control conditions. After KA treatment, PPR increased to  $1.43 \pm 0.05$  ( $n = 5$ , Figure 1e). Second, we performed fluctuation analysis and estimated the noise-subtracted coefficient of variation (CV) of the synaptic responses before and after KA application. A plot of  $\text{CV}^2$  versus the change in the mean evoked EPSC amplitude (M) before and after KA application yielded points mainly below the diagonal line consistent with a presynaptic modification of the release parameters (Figure 1f, Brock et al., 2020). Finally, we recorded and analyzed miniature responses (mEPSC) in the presence of  $500 \text{ nM}$  TTX, before and after the addition of KA. In this experimental condition, we found that after KA application, the frequency of mEPSC decreased (baseline  $1.13 \pm 0.13 \text{ Hz}$ ,  $n = 7$ ;

after KA  $0.70 \pm 0.16 \text{ Hz}$ ,  $n = 8$ , Figure 1g) with no effect on mEPSC amplitude (baseline  $18.5 \pm 1 \text{ pA}$ ,  $n = 7$ ; after KA  $18.8 \pm 1.3 \text{ pA}$ ,  $n = 6$ , Figure 1g). These results again indicating a presynaptic locus for KA. These results indicate that the decrease in eEPSCs amplitude is due to a decrease in glutamate release mediated by the activation of presynaptic KARs.

### 3.2 | KAR-mediated depression of glutamate release at SC-CA2 PC requires cAMP-dependent signaling

We examined the possible intracellular cascade that mediates a decrease in glutamate release. We checked a possible role of protein kinase A (PKA) in the decrease in glutamate release observed by the activation of presynaptic KARs. For

this, we treated the slices first with H-89 and Rp-cAMP, inhibitors of PKA. In slices pre-incubated with 2  $\mu$ M H-89 or 100  $\mu$ M Rp-cAMP, the depressing effect of 3  $\mu$ M KA was abolished ( $90 \pm 4\%$ ,  $n = 6$  after H-89 and  $92 \pm 4\%$ ,  $n = 7$  after Rp-cAMP, versus. KA 3  $\mu$ M,  $49 \pm 9\%$ ,  $n = 8$  in non-treated slices, Figure 2a,b). These results indicate that PKA activity is necessary for the observed KAR-mediated depression of SC-CA2 PC glutamatergic transmission. Protein kinase C (PKC) has been described to participate in KAR-mediated modulation of neurotransmitter release at other synapses (Negrete-Díaz et al., 2018; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2007a,b), for this, we determined whether this kinase was involved in the decrease in glutamate release observed here at SC-CA2 PC synapses. In slices pre-incubated with the PKC inhibitor calphostin C (1  $\mu$ M), the KAR-mediated depression of glutamate release was not affected ( $56 \pm 4\%$ ,  $n = 6$  versus.  $49 \pm 9\%$ ,  $n = 8$  in non-treated slices, Figure 2b), thus indicating that PKC is not involved in this depression of glutamate release.

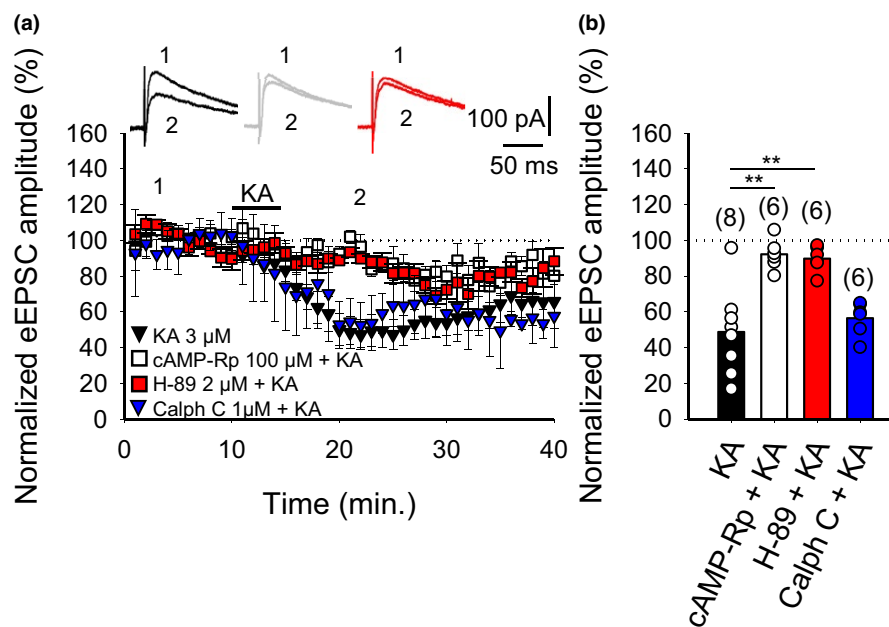
### 3.3 | KAR-mediated depression of glutamate release at SC-CA2 PC synapses involves G protein function

KAR have been defined as having metabotropic functions involving  $G_{i/o}$  proteins in the modulation of GABA (Rodríguez-Moreno

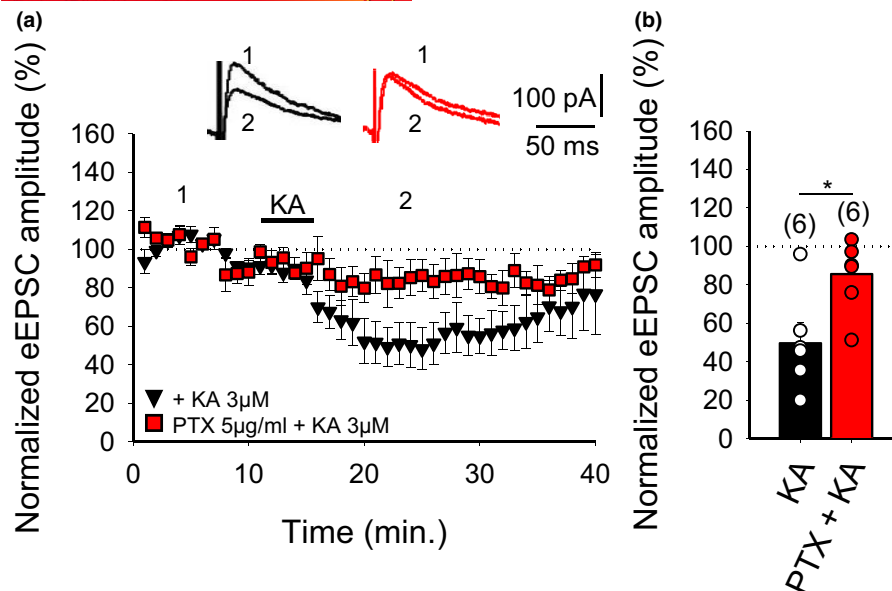
and Lerma, 1998) and glutamate release in the hippocampus at SC-CA1 (Frerking et al., 2001) and MF-CA3 synapses (Negrete-Díaz et al., 2006) and in the cerebellum (Falcón-Moya et al., 2018a; Losada-Ruiz et al., 2019) (see Negrete-Díaz et al., 2018 for review). To determine whether the KAR function modulating glutamate release at SC-CA2 PC synapses requires  $G_{i/o}$  proteins, we repeated the experiments in slices pre-incubated with Pertussis toxin (5  $\mu$ g/ml). In this experimental condition, the KA effect decreasing glutamate release was not present; indicating a  $G_{i/o}$  protein activity is required downstream KAR activation to decrease glutamate release ( $87 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ ; versus. control non-treated slices  $50 \pm 10\%$ ,  $n = 6$ , Figure 3a,b).

### 3.4 | The depression of glutamate release at SC-CA2 PC synapses does not require calcium-permeable L-type channels nor release from intracellular stores

KAR-mediated modulation of synaptic transmission has been described previously to require  $Ca^{2+}$  either from extracellular and/or intracellular origin (Kamiya & Ozawa, 1998, 2000; Kamiya et al., 2002; Lyon et al., 2011; Scott et al., 2008). To determine whether  $Ca^{2+}$  at SC-CA2 synapses is required to depress glutamate release, we studied the effect of nimodipine, which selectively blocks L-type voltage-dependent calcium channels. In this experimental condition, the effect of KA was not prevented ( $75 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , versus.



**FIGURE 2** Adenylyl cyclase (AC) and downstream PKA underlies the KA-mediated depression of glutamate release at SC-CA2 synapses. (a) Time-course of the effect of KA on eEPSC amplitude in control (black) and Rp-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (white) or H-89 (red) treated slices. Inset shows representative traces showing that KA (3  $\mu$ M) does not decrease the amplitude of the eEPSCs in Rp-cAMP or H-89-treated slices. Inset shows traces before (1) and after (2) KA treatment in the absence (black) and in the presence of Rp-cAMP (white) or H-89 (red). (b) Summary of results. Blockade of PKA by cAMP-Rp (100  $\mu$ M) or H-89 (2  $\mu$ M) prevented the depressive action of KA. Blockade of protein kinase C (PKC) with calphostin C (1  $\mu$ M) has no effect on the KAR-mediated decrease in the eEPSC amplitude. The number of slices (from three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (\*\* $p < .01$ , ANOVA test)



**FIGURE 3** KAR-mediated depression of glutamate release is prevented in slices treated with pertussis toxin at SC-CA2 synapses. (a) Time-course of the effect of KA on eEPSC amplitude in control slices (black) and in slices treated with pertussis toxin (red). Inset shows representative traces showing that KA (3 μM) does not significantly affect the amplitude of the eEPSCs in pertussis toxin-treated slices. Inset shows traces before (1) and after (2) KA treatment in the absence (black) and in the presence of pertussis toxin (red). (b) Summary of results. The number of slices (from three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means ± SEM (\* $p < .05$ , Student's  $t$  test)

61 ± 5%,  $n = 8$  in non-treated slices, Figure 4a,b). Then, we used ryanodine, which selectively inhibits  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release (Berridge, 1998). Pre-incubation of slices with ryanodine (10 μM) did not prevent the KAR-mediated decrease in glutamate release at SC-CA2 synapses (62 ± 7%,  $n = 6$ , with ryanodine versus. 61 ± 5%,  $n = 8$ , without ryanodine, in interleaved slices; Figure 4a,b). Finally, to determine whether the activation of KAR causes an increase in cytoplasmic intracellular  $Ca^{2+}$ , we repeated the experiments in slices pre-incubated with thapsigargin (2 μM). In this experimental condition, KAR-mediated decrease in glutamate release was not affected (76 ± 6%,  $n = 6$ , with thapsigargin versus. 61 ± 5%,  $n = 8$ , without thapsigargin, in non-treated slices, Figure 4a,b). Together, these results indicate that  $Ca^{2+}$ , either from extracellular or intracellular origin, is not necessary for the observed decrease in glutamate release at hippocampal SC-CA2 synapses.

### 3.5 | GluK1 subunit-containing KARs are involved in the depression of glutamate release observed at SC-CA2 synapses

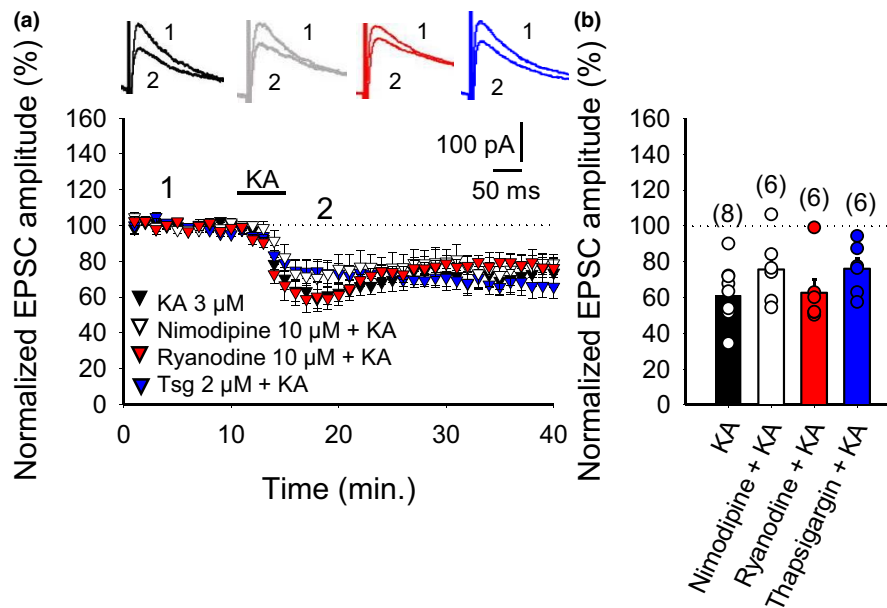
KARs containing the GluK1 subunit have been involved in synaptic transmission at SC-CA1 synapses (Clarke & Collingridge, 2002; Partovi & Frerking, 2006; Sallert et al., 2007). To determine whether GluK1 subunit-containing KARs participate in the depression of evoked and spontaneous release we have found at SC-CA2 synapses we repeated the experiments in the presence of the selective GluK1 KA antagonist UBP-302 (20 μM). In this experimental condition, we observed that the depressive effect of KA on NMDAR currents

amplitude was partially blocked (54 ± 6%,  $n = 8$ , control KA versus. 70 ± 3%,  $n = 7$ , KA in the presence of UBP-302, in interleaved slices; Figure 5a,b). Interestingly, in the presence of UBP-302, both mEPSC frequency and amplitude were unaffected in the presence of KA (frequency, baseline: 0.93 ± 0.22 Hz,  $n = 6$ ; UBP-302 + KA: 0.99 ± 0.22 Hz,  $n = 6$ . Amplitude, baseline: 19.3 ± 0.82 pA,  $n = 6$ ; UBP + KA: 19 ± 0.9 pA,  $n = 6$ ; Figure 5c,d). These results indicate that the depressive effect of KAR activation on NMDAR EPSC amplitude is due in part to KARs containing GluK1 subunits (with KARs receptors containing other subunits also involved). The depressive effect found for KA on NMDAR-mediated miniature responses is due specifically to KARs containing GluK1 subunits.

## 4 | DISCUSSION

KARs situated presynaptically are recognized as neurotransmitter release modulators. As indicated, in the hippocampus they mediate a depression of glutamate release at SC-CA1 synapses and have a biphasic effect on release at MF-CA3 synapses, with low doses of agonists mediating an increase in the release of neurotransmitter, and relatively high doses producing a decrease in neurotransmitter release. While the role of the PKC pathway in some of the functions of KAR is well established (see Jane et al., 2009; Negrete-Díaz et al., 2018; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2007a, 2007b, 2011a, 2011b; Sihra & Rodríguez-Moreno, 2011, 2013; Valbuena & Lerma, 2016), other KAR functions are not properly ionotropic nor require protein kinases (Frerking et al., 2001). In addition, some functions of KAR require PKA activity in the hippocampus (Grabauskas et al., 2007;





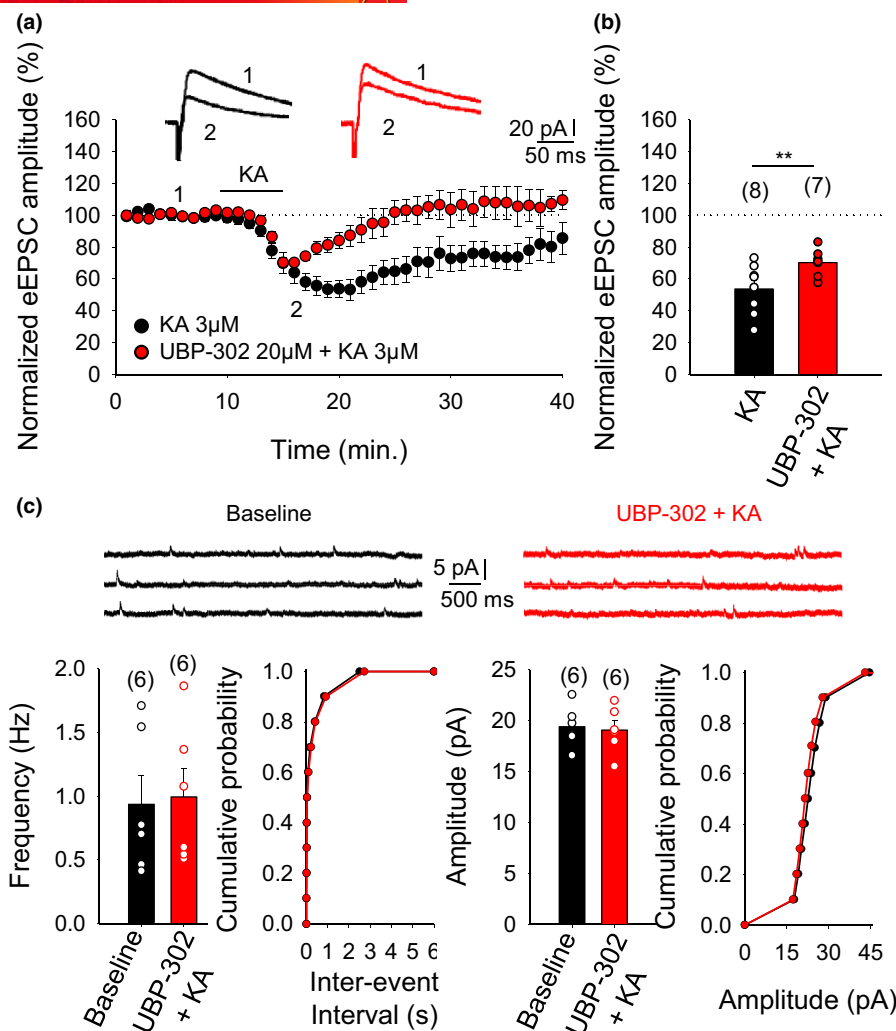
**FIGURE 4** KAR-mediated depression of glutamate release does not require calcium entry through L-type calcium channels nor changes in  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytosol at the SC-CA2 synapses. (a) Time-course of KA (3  $\mu\text{M}$ ) effect on eEPSCs amplitude in control condition (black) and in slices treated with nimodipine (white), ryanodine (red) or thapsigargin (blue). Inset show traces before (1) and after (2) KA treatment in the absence (black) and in the presence of nimodipine (white), ryanodine (red) or thapsigargin (blue). (b) Quantification of results in slices treated with thapsigargin, nimodipine, and ryanodine. The decrease in eEPSC amplitudes induced by KA is not prevented in any case. The number of slices (from three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means  $\pm$  SEM

Negrete-Díaz et al., 2006, 2007; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2004), the amygdala (Negrete-Díaz et al., 2012) and the cerebellum (Falcón-Moya et al., 2019). Here, we demonstrate for the first time that KARs are physiologically present at SC-CA2 synapses controlling glutamate release and show that the mechanism involving PKA is not restricted to the SC-CA1 or MF-CA3 synapses and is extended to the CA2 region of the hippocampus.

From our results, it is clear that the activation of presynaptic KARs produces a decrease in glutamate release at SC-CA2 PC synapses. This modulation involves a coupling of KARs to PKA activity, by the activation of a  $G_{i/o}$  protein. Additionally, our results indicate that KAR mediating this action is presynaptically located. Thus, the three different approaches utilized are indicative of a presynaptic action for KARs at these synapses modulating glutamate release, first, we found an increase in PPR of eEPSCs after KA application for both NMDA and AMPA receptor-mediated eEPSCs, suggesting a change in release probability. Second, we plotted the  $\text{CV}^{-2}$  versus the mean amplitude of eEPSC before and after KA application, consistent with a presynaptic locus the experimental points followed a distribution below the diagonal (Brock et al., 2020). Finally, the analysis of mEPSC showed a change in frequency with no change in amplitude what is clearly consistent with a presynaptic locus of action for KAR. Thus, the different data obtained from different analysis are all indicative of a presynaptic action for KARs. While KARs mediating this decrease in glutamate release are presynaptic, we do not know exactly whether they are located in the axons of the presynaptic neurons. To unequivocally determine the presynaptic location of KARs, more experiments are required. In this direction, high-resolution

immunogold experiments will be of help (Pérez-Rodríguez et al., 2019). In addition, the development of caged antagonists of KARs or the performance of paired recordings to record simultaneously pre- and post-synaptic neurons as done with NMDAR will be of great interest (Reeve et al., 2012; Rodríguez-Moreno et al., 2010, 2011, 2013; Rodríguez-Moreno & Paulsen, 2008).

Our results at SC-CA2 synapses are similar to those found in other regions of the hippocampus and in other brain areas as the amygdala and the cerebellum (Falcón-Moya et al., 2019; Negrete-Díaz et al., 2006, 2012), in that the KAR-mediated depression of glutamate release involves PKA. Thus indicating that this may a general mechanism in the brain by which kainate receptors situated at the presynaptic side of the synapse modulate glutamate release to control the levels of glutamate present at the synaptic cleft (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013; Falcón-Moya et al., 2019; Negrete-Díaz et al., 2007; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2004, 2013). Interestingly, at SC-CA2 synapses we found a dependence of G protein by Pertussis toxin treatment. This mechanism is also similar to what has been found in the hippocampus at SC-CA1 synapses and at MF-CA3 synapses when KARs are activated by relatively high concentrations of the agonist. But different to SC-CA1 synapses, here at SC-CA2 synapses, PKA activity is needed, whereas at SC-CA1 synapses the mechanism is membrane-delimited and no protein kinases activity is necessary (Frerking et al., 2001). It is also interesting to note that a decrease in glutamate release, mediated by presynaptic KARs does not need intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations (as observed here at SC-CA2 synapses and at MF-CA3 synapses and the cerebellum (Negrete-Díaz et al., 2006; Falcón-Moya



**FIGURE 5** GluK1 subunit-containing KARs are involved in the depression of glutamate release observed at SC-CA2 synapses. (a) Time course of KA (3 μM) effect on eEPSCs amplitude in the absence (black) and presence of UBP-302 (red). Inset show traces before (1) and after (2) KA treatment in the absence (black) and in the presence of 20 μM UBP-302 (red). (b) Quantification of results. (c) Miniature EPSC (mEPSCs) monitored during the baseline and after applying KA (3 μM) in the presence of TTX (500 nM) and UBP-302 (20 μM). Histograms and cumulative graphs show that in the presence of UBP-302, after KA application, the frequency and the amplitude of mEPSCs remain constant. The number of slices (from three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means ± SEM (\*\**p* < .01, Student's *t* test)

et al., 2019). By contrast, the increases in glutamate release observed at other synapses when KARs are activated by low agonist concentrations (MF-CA3, cerebellum, cortex), always involve elevations in intracellular calcium levels (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2004, 2013). This is most probably because of the fact that increases in glutamate release mediated by presynaptic KARs do not need G protein activity but need the activation of adenylyl cyclase, which is normally activated by Ca-calmodulin when is not activated by a G protein (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013, Falcón-Moya et al., 2018). The reason why at SC-CA1 and here at SC-CA2 synapses only a depression of glutamate release is observed (and no an increase) independently of the agonist concentration used is not known for the moment and needs further investigation.

Interestingly, at SC-CA1 synapses, KAR activation by domoate or ATPA does not modify mEPSCs frequency or amplitude (Partovi

& Frerking, 2006; Sallert et al., 2007). By contrast, at SC-CA2 synapses, KARs activation by KA produces a decrease in mEPSCs frequency that is completely blocked by antagonizing GluK1 subunit-containing KARs. This result shows an interesting difference between SC-CA1 and SC-CA2 synapses and indicates that the KAR-mediated depression of mEPSCs frequency observed at SC-CA2 is specifically due to KARs containing the GluK1 subunit. By contrast, the depression of the evoked responses (EPSCs) is due to KARs that contain GluK1 subunits and KARs containing other different subunits. Thus, these results indicate an intriguing difference between the modulation of evoked and spontaneous release. It is also interesting to note that the recovery of EPSC amplitudes is different when comparing KAR effect and KA effect on UBP-302-treated slices, been faster in the presence of UBP302. This indicates that GluK1 subunits' presence makes the recovery slower, what can be related to a metabotropic mechanism, and

when blocked, recovery is faster as typical for ionotropic functions. Differences between evoked and spontaneous release mechanisms have been described for presynaptic NMDARs at L5-L5 synapses of visual cortex, where evoked release has been linked to ionotropic mechanisms and spontaneous release to metabotropic ones after presynaptic NMDAR activation, Abrahamsson et al., 2017; Bouvier et al., 2018). It seems that a similar mechanism may be operating here, after presynaptic KARs activation.

While the function of this decrease in glutamate release at SC-CA2 synapses is not known for the moment, it may be involved in different forms of synaptic refinement that occur during brain postnatal development that involve glutamate receptors and plasticity (Andrade-Talavera et al., 2016; Mateos-Aparicio & Rodríguez-Moreno, 2019; Sihra et al., 2014; Torres-García et al., 2012). Additionally, a role for KARs in epilepsy is possible in this region of the hippocampus and this has to be investigated (Falcón-Moya et al., 2018b; Flores et al., 2011). Whether KARs present in the CA2 region of the hippocampus has a role in social behavior or in spatial or temporal memories (the main functions described for the moment for these synapses) requires further experimentation, but it is clear that modulating glutamate release, KARs may have direct control or affect excitation/inhibition ratio that may have important physiological consequences.

In conclusion, we have found that KARs are functionally present at SC-CA2 PC synapses where they presynaptically decrease glutamate release. For this action, KAR requires  $G_{i/o}$  activity to interact with adenylyl cyclase to decrease cAMP levels to produce a depression in glutamate release at hippocampal SC-CA2 PC synapses.

## ACKNOWLEDGMENTS

The work performed in A.R-M laboratory received support from the Agencia Estatal de Investigación and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) (BFU2015-68655-P). Funding for open access publishing: Universidad Pablo de Olavide/CBUA.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

R.F-M and I.M-G performed the electrophysiological experiments, analyzed, and interpreted the data. A.R-M conceived the study and wrote the manuscript. All the authors participated in the drafting of the manuscript, the final version of which they approved for submission.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Antonio Rodríguez-Moreno  <https://orcid.org/0000-0002-8078-6175>

## REFERENCES

- Abrahamsson, T., Chou, C. Y. C., Li, S. Y., Mancino, A., Costa, R. P., Brock, J. A., Nuro, E., Buchanan, K. A., Elgar, D., Blackman, A. V., Tudor-Jones, A., Oyrer, J., Farmer, W. T., Murai, K. K., & Sjöström, P. J. (2017). Differential regulation of evoked and spontaneous release by presynaptic NMDA receptors. *Neuron*, 96, 839–855. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.030>
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2012). Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves  $Ca^{2+}$ -calmodulin at mossy fiber-CA3 synapses. *Journal of Neurochemistry*, 122, 891–899. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07844.x>
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Paulsen, O., & Rodríguez-Moreno, A. (2016). Presynaptic spike timing-dependent long-term depression in the mouse hippocampus. *Cerebral Cortex*, 26, 3637–3654. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw172>
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2013). Presynaptic kainate-receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and  $Ca^{2+}$ -calmodulin at thalamo-cortical synapses. *Journal of Neurochemistry*, 126, 565–578.
- Bahn, S., Volk, B., & Wisden, W. (1994). Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *Journal of Neuroscience*, 14, 5525–5547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-09-05525.1994>
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signalling. *Neuron*, 21, 13–26.
- Bettler, B., Boulter, J., Hermans-Borgmeyer, I., O'Shea-Greenfield, A., Deneris, E. S., Moll, C., Borgmeyer, U., Hollmann, M., & Heinemann, S. (1990). Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: Expression in the nervous system during development. *Neuron*, 5, 583–595. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90213-Y](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90213-Y)
- Boehringer, R., Polygalov, D., Huang, A. J. Y., Middleton, S. J., Robert, V., Wintzer, M. E., Piskorowski, R. A., Chevaleyre, V., & McHugh, T. J. (2017). Chronic loss of CA2 transmission leads to hippocampal hyperexcitability. *Neuron*, 94(3), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.014>
- Bouvier, G., Larsen, R. S., Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O., & Sjöström, P. J. (2018). Towards resolving the presynaptic NMDA receptor debate. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 1–7.
- Breustedt, J., & Schmitz, D. (2004). Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*, 24, 10093–10098.
- Brock, J. A., Thomazeau, A., Watanabe, A., Li, S. S. Y., & Sjöström, P. J. A. (2020). A practical guide to using CV analysis for determining the locus of synaptic plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 11. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00011>
- Campbell, S. L., Mathew, S. S., & Hablitz, J. J. (2007). Pre- and postsynaptic effects of kainate on layer II/III pyramidal cells in rat neocortex. *Neuropharmacology*, 53, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.04.008>
- Chevaleyre, V., & Siegelbaum, S. A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron*, 66(4), 560–572. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.013>
- Chittajallu, R., Vignes, M., Dev, K. K., Barnes, J. M., Collingridge, G. L., & Henley, J. M. (1996). Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature*, 379, 78–81. <https://doi.org/10.1038/379078a0>
- Clarke, V. R. J., & Collingridge, G. L. (2002). Characterisation of the effects of ATPA, a GLUK5 receptor selective agonist, on excitatory synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampal slices. *Neuropharmacology*, 42, 889–902. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00039-4)
- Contractor, A., Sailer, A., Darstein, M., Maron, C., Xu, J., & Swanson, G. (2003). Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation at mossy-fiber synapses in  $KA2^{-/-}$  mice. *Journal of Neuroscience*, 23, 422–429.











- Falcón-Moya, R., Losada-Ruiz, P., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). Kainate receptor-mediated depression of glutamate release involves protein kinase A in the cerebellum. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4124. <https://doi.org/10.3390/ijms20174124>
- Falcón-Moya, R., Losada-Ruiz, P., Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2018a). Cerebellar Kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release requires Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and PKA. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 195. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00195>
- Falcón-Moya, R., Pérez-Rodríguez, M., Prius-Mengual, J., Andrade-Talavera, Y., & Rodríguez-Moreno, A. (2020). Astrocyte-mediated switch in spike timing-dependent plasticity during hippocampal development. *Nature Communications*, 11(1), 1–14.
- Falcón-Moya, R., Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2018b). Kainate Receptors: Role in epilepsy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 22(11), 217. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00217>
- Fernandes, H. B., Catches, J. S., Petralia, R. S., Copits, B. A., Xu, J., Russell, T. A., Swanson, G. T., & Contractor, A. (2009). High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron*, 63, 818–829. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.010>
- Flores, G., Negrete-Díaz, J. V., Carrión, M., Andrade-Talavera, Y., Bello, S. A., Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2011). Excitatory amino acids in neurological and neurodegenerative disorders. In J. P. F. D'Mello (Ed.), *Amino acids in human nutrition and health* (pp. 427–453). Editorial CAB International.
- Frerking, M., Schmitz, D., Zhou, Q., & Nicoll, R. A. (2001). Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3→CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *Journal of Neuroscience*, 21(9), 2958–2966.
- Grabauskas, G., Lancaster, B., O'Connor, V., & Wheal, H. V. (2007). Protein kinase signalling requirements for metabotropic action of kainate receptors in rat CA1 pyramidal neurones. *Journal of Physiology*, 579, 363–373. <https://doi.org/10.1111/jphysiol.2006.122051>
- Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W., & Seeburg, P. H. (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron*, 8, 775–785. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90098-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90098-X)
- Hitti, F. L., & Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, 508(7494), 88–92.
- Jane, D. E., Lodge, D., & Collingridge, G. L. (2009). Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 56, 90–113.
- Ji, Z., & Stäubli, U. (2002). Presynaptic kainate receptors play different physiological roles in mossy fiber and associational-commissural synapses in CA3 of hippocampus from adult rats. *Neuroscience Letters*, 331, 71–74.
- Jouhanneau, J. S., Ball, S. M., Molnár, E., & Isaac, J. T. R. (2011). Mechanisms of bi-directional modulation of thalamocortical transmission in barrel cortex by presynaptic kainite receptors. *Neuropharmacology*, 60, 832–841.
- Kamiya, H., & Ozawa, S. (1998). Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *Journal of Physiology*, 509, 833–845.
- Kamiya, H., & Ozawa, S. (2000). Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre. *Journal of Physiology*, 523, 653–665.
- Kamiya, H., Umeda, K., Ozawa, S., & Manabe, T. (2002). Presynaptic Ca<sup>2+</sup> entry is unchanged during hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 22, 10524–10528.
- Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Bleakman, D., & Isaac, J. T. R. (2001). A critical role of a facilitatory kainate autoreceptor in mossy fiber LTP. *Neuron*, 32, 697–709.
- Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Nistico, R., Bleakman, D., Ornstein, P. L., Lodge, D., Isaac, J. T. R., & Collingridge, G. L. (2003). A role for Ca<sup>2+</sup> stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron*, 39, 327–341. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00369-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00369-6)
- Terma, J., Paternain, A. V., Rodríguez-Moreno, A., & López-García, J. C. (2001). Molecular physiology of kainate receptors. *Physiological Reviews*, 81, 971–998.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal Für Psychologie Und Neurologie*, 46, 113–177.
- Losada-Ruiz, P., Falcón-Moya, R., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). Kainate receptors modulating glutamate release in the cerebellum. *Biogenic Amines in Neurotransmission and Human Disease*, 5, 5–21. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87984>
- Lyon, L., Borel, M., Carrión, M., Kew, J. N. C., Corti, C., Harrison, P. J., Burnet, P. W. J., Paulsen, O., & Rodríguez-Moreno, A. (2011). Hippocampal mossy fiber long-term depression in Grm2/3 double knockout mice. *Synapse (New York, N. Y.)*, 65(9), 945–954. <https://doi.org/10.1002/syn.20923>
- Manabe, T., Willey, D. J., Perkel, D. J., & Nicoll, R. A. (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: Effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *Journal of Physiology*, 70, 1451–1459. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.4.1451>
- Mateos-Aparicio, P., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). The impact of studying brain plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 27(13), 66.
- Negrete-Díaz, J. V., Duque-Feria, P., Andrade-Talavera, Y., Carrión, M., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2012). Kainate receptor-mediated depression of glutamatergic transmission involving protein kinase A in the lateral amygdala. *Journal of Neurochemistry*, 121, 36–43. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07665.x>
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Delgado-García, J. M., & Rodríguez-Moreno, A. (2006). Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 96, 1829–1837. <https://doi.org/10.1152/jn.00280.2006>
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Delgado-García, J. M., & Rodríguez-Moreno, A. (2007). Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition converges with presynaptic inhibition mediated by Group II mGluRs and long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Journal of Neural Transmission*, 114, 1425–1431. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0750-4>
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2018). Non-canonical mechanisms of presynaptic kainate receptors controlling glutamate release. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 20(11), 128.
- Partovi, D., & Frerking, M. (2006). Presynaptic inhibition by kainate receptors converges mechanistically with presynaptic inhibition by adenosine and GABA<sub>B</sub> receptors. *Neuropharmacology*, 51, 1030–1037. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.06.010>
- Paternain, A. V., Herrera, M. T., Nieto, M. A., & Terma, J. (2000). GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. *Journal of Neuroscience*, 20, 196–205. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-01-00196.2000>
- Pérez-Rodríguez, M., Arroyo-García, L. E., Prius-Mengual, J., Andrade-Talavera, Y., Armengol, J. A., Pérez-Villegas, E. M., Duque-Feria, P., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). Adenosine receptor-mediated developmental loss of spike timing-dependent depression in the hippocampus. *Cerebral Cortex*, 29, 3266–3281. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy194>
- Petralia, R. S., Wang, Y. X., & Wenthold, R. J. (1994). Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *The Journal of Comparative Neurology*, 349, 85–110. <https://doi.org/10.1002/cne.903490107>



- Pinheiro, P. S., Perrais, D., Coussen, F., & Mann, J. R. (2007). GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *PNAS*, 1004, 12181–12186.
- Piskorowski, R. A., & Chevaleyre, V. (2018). Memory circuits: CA2. *Current Opinion in Neurology*, 52, 54–59.
- Reeve, J. E., Kohl, M. M., Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O., & Anderson, H. L. (2012). Caged intracellular NMDA receptor blockers for the study of subcellular ion channel function. *Communicative and Integrative Biology*, 5, 240–242.
- Rodríguez-Moreno, A., Banerjee, A., & Paulsen, O. (2010). Presynaptic NMDA receptors and spike timing-dependent depression at cortical synapses. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2, 18.
- Rodríguez-Moreno, A., Gonzalez-Rueda, A., Banerjee, A., Upton, A. L., Craig, M. T., & Paulsen, O. (2013). Presynaptic self-depression at developing neocortical synapses. *Neuron*, 77, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.035>
- Rodríguez-Moreno, A., Kohl, M. M., Reeve, J. E., Eaton, T. R., Collins, H. A., Anderson, H. L., & Paulsen, O. (2011). Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *Journal of Neuroscience*, 31, 8564–8569. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0274-11.2011>
- Rodríguez-Moreno, A., & Lerma, J. (1998). Kainate receptor modulation of GABA release involves a Metabotropic function. *Neuron*, 20(6), 1211–1218. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80501-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80501-2)
- Rodríguez-Moreno, A., & Paulsen, O. (2008). Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nature Neuroscience*, 11, 744–745.
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2004). Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *Journal of Physiology*, 557, 733–745. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065029>
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2007a). Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *Journal of Neurochemistry*, 103, 2121–2135. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04924.x>
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2007b). Kainate receptors with a metabotropic modus operandi. *Trends in Neurosciences*, 30, 630–637. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.10.001>
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2011a). Metabotropic actions of kainate receptors in the control of glutamate release in the hippocampus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 717, 39–48.
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2011b). *Kainate receptors: Novel signaling insights*. Springer.
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2013). Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and PKA in cerebrocortical synaptosomes. *FEBS Letters*, 587, 788–792.
- Sallert, M., Malkki, H., Segerstråle, M., Taira, T., & Lauri, S. E. (2007). Effects of the kainate receptor agonist ATPA on glutamatergic synaptic transmission and plasticity during early postnatal development. *Neuropharmacology*, 52, 1354–1365. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.01.015>
- Schmitz, D., Mellor, J., & Nicoll, R. A. (2001). Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science*, 291, 1972–1976. <https://doi.org/10.1126/science.1057105>
- Scott, R., Lalic, T., Kullmann, D. M., Capogna, M., & Rusakov, D. A. (2008). Target-cell specificity of kainate autoreceptor and Ca<sup>2+</sup>-store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*, 28, 13139–13149. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2932-08.2008>
- Sihra, T. S., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2014). Kainate receptors: Multiple roles in neuronal plasticity. *The Neuroscientist*, 20, 29–43. <https://doi.org/10.1177/1073858413478196>
- Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2011). Metabotropic actions of kainate receptors in the control of GABA release. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 717, 1–10.
- Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2013). Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: Mechanisms. *Neurochemistry International*, 62, 982–987. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.03.012>
- Sohal, V. S., & Rubenstein, J. (2019). Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 24(9), 1248–1257. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0426-0>
- Srinivas, K. V., Buss, E. W., Sun, Q., Santoro, B., Takahashi, H., Nicholson, D. A., & Siegelbaum, S. A. (2017). The dendrites of CA2 and CA1 pyramidal neurons differentially regulate information flow in the Cortico-Hippocampal circuit. *The Journal of Neuroscience*, 37(12), 3276–3293. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2219-16.2017>
- Sun, Q., Srinivas, K. V., Sotayo, A., & Siegelbaum, S. A. (2014). Dendritic Na<sup>+</sup> spikes enable cortical input to drive action potential output from hippocampal CA2 pyramidal neurons. *Elife*, 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.04551>
- Swanson, G. T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., & Cull-Candy, S. G. (1996). Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *Journal of Physiology*, 492, 129–142. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021295>
- Torres-García, M. E., Solís, O., Patricio, A., Rodríguez-Moreno, A., Camacho-Abrego, I., Limón, I. D., & Flores, G. (2012). Dendritic morphology changes in neurons from the prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens in rats after lesion of the thalamic reticular nucleus. *Neuroscience*, 223, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.042>
- Valbuena, S., & Lerma, J. (2016). Non-canonical signaling, the hidden life of ligand-gated ion channels. *Neuron*, 92, 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.016>

**How to cite this article:** Falcón-Moya, R., Martínez-Gallego, I., & Rodríguez-Moreno, A. (2021). Kainate receptor modulation of glutamatergic synaptic transmission in the CA2 region of the hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 158, 1083–1093. <https://doi.org/10.1111/jnc.15481>

# Astrocyte-mediated switch in spike timing-dependent plasticity during hippocampal development

Rafael Falcón-Moya<sup>1,6</sup>, Mikel Pérez-Rodríguez <sup>1,6</sup>, José Prius-Mengual<sup>1,6</sup>, Yuniesky Andrade-Talavera <sup>1</sup>, Luis E. Arroyo-García <sup>1,2</sup>, Rocío Pérez-Artés<sup>1</sup>, Pedro Mateos-Aparicio<sup>1</sup>, Sónia Guerra-Gomes<sup>3,4,5</sup>, João Filipe Oliveira <sup>3,4,5</sup>, Gonzalo Flores <sup>2</sup> & Antonio Rodríguez-Moreno <sup>1</sup>✉

Presynaptic spike timing-dependent long-term depression (t-LTD) at hippocampal CA3-CA1 synapses is evident until the 3<sup>rd</sup> postnatal week in mice, disappearing during the 4<sup>th</sup> week. At more mature stages, we found that the protocol that induced t-LTD induced t-LTP. We characterized this form of t-LTP and the mechanisms involved in its induction, as well as that driving this switch from t-LTD to t-LTP. We found that this t-LTP is expressed presynaptically at CA3-CA1 synapses, as witnessed by coefficient of variation, number of failures, paired-pulse ratio and miniature responses analysis. Additionally, this form of presynaptic t-LTP does not require NMDARs but the activation of mGluRs and the entry of Ca<sup>2+</sup> into the postsynaptic neuron through L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels and the release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. Nitric oxide is also required as a messenger from the postsynaptic neuron. Crucially, the release of adenosine and glutamate by astrocytes is required for t-LTP induction and for the switch from t-LTD to t-LTP. Thus, we have discovered a developmental switch of synaptic transmission from t-LTD to t-LTP at hippocampal CA3-CA1 synapses in which astrocytes play a central role and revealed a form of presynaptic LTP and the rules for its induction.

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular Neuroscience and Plasticity, Department of Physiology, Anatomy and Cell Biology, Universidad Pablo de Olavide, ES-41013 Seville, Spain. <sup>2</sup>Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. <sup>3</sup>Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal. <sup>4</sup>ICVS/3Bs - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal. <sup>5</sup>IPCA-EST-2Ai, Polytechnic Institute of Cávado and Ave, Applied Artificial Intelligence Laboratory, Campus of IPCA, Barcelos, Portugal. <sup>6</sup>These authors contributed equally: Rafael Falcón-Moya, Mikel Pérez-Rodríguez, José Prius-Mengual. ✉email: [arodmor@upo.es](mailto:arodmor@upo.es)

The mammalian brain has the ability to change in response to experience, a property termed plasticity<sup>1</sup>. Plasticity involves the re-organization of cortical maps during development, and is fundamental for learning and memory<sup>2,3</sup>. Throughout development, activity sensory-dependent plastic changes occur during permissive and critical periods of plasticity, with environmental influences subsequently shaping brain circuits further, reordering and refining neural connections into the definitive adult circuits<sup>4</sup>. The closing of such permissive windows is associated with the loss of plasticity at particular synapses, producing specific functional effects<sup>4,5</sup>. Long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) of synaptic transmission are the two best-known forms of plasticity.

Spike timing-dependent plasticity (STDP) is a Hebbian form of long-term synaptic plasticity detected in all species examined to date, from insects to humans. This process is a strong candidate to underlie circuit remodeling during development, as well as that in subsequent learning and memory<sup>6</sup>. In STDP, the order and relative millisecond timing of pre- and postsynaptic action potentials (APs, spikes) determines the direction and magnitude of synaptic changes. Thus, timing-dependent LTP (t-LTP) occurs when a presynaptic spike is followed by a postsynaptic spike, whereas timing-dependent LTD (t-LTD) is induced when this order is inverted, although exceptions exist<sup>6,7</sup>.

A presynaptic form of t-LTD that requires the activation of presynaptic NMDA receptors (preNMDARs) has been described in the hippocampus and in the visual and somatosensory cortices<sup>7–11</sup>. These forms of t-LTD are expressed presynaptically and they disappear during the 3rd–5th weeks of postnatal development<sup>7–12</sup>. In the mouse hippocampus, t-LTD is lost by the fourth week of postnatal development (P22–30)<sup>13</sup> and the mechanism underlying this loss was recently defined<sup>12</sup>. However, what happens later in development, after the loss of this t-LTD has not yet been explored.

To better understand the mechanisms that underlie the changes in plasticity during development, here we explore what occurs after P30 at hippocampal CA3–CA1 synapses. Surprisingly, we find that a post-before-pre protocol that induces t-LTD at P8–21 fails to induce plasticity at P22–30, yet it induces t-LTP at P35–42. Characterizing this form of t-LTP, the result of a switch from presynaptic t-LTD, coefficient of variation, number of failures, paired-pulse ratio (PPR) and miniature responses analyses demonstrate its presynaptic nature. Furthermore, this form of presynaptic t-LTP does not require NMDARs but requires mGluR5 activation. We also find that this presynaptic t-LTP requires the flux of calcium through postsynaptic L-type calcium channels, as well as calcium release from intracellular stores. Moreover, this form of t-LTP does not require eCB signaling or CB<sub>1</sub>Rs, yet it does require nitric oxide (NO) as a retrograde messenger. We also find that astrocytes are involved in the induction of this form of t-LTP and that they fulfill a central role in creating the conditions for this form of preLTP to be induced. The switch from presynaptic t-LTD to presynaptic t-LTP occurs owing to the increased inhibition of presynaptic release associated with maturation and it is mediated through the activation of presynaptic type 1 adenosine receptors (A<sub>1</sub>Rs) by adenosine from astrocytes, which considerably dampens the probability of glutamate release. In addition, astrocytes seem to not only release adenosine but also glutamate, presumably to activate mGluRs, to induce t-LTP. Thus, we discover here a developmental switch from presynaptic depression to presynaptic potentiation of synaptic transmission with hippocampal maturation, and uncover a form of presynaptic t-LTP and the mechanism by which it is induced.

## Results

**A switch from t-LTD to t-LTP occurs at P35–42.** It was recently shown that t-LTD is induced at CA3–CA1 hippocampal synapses

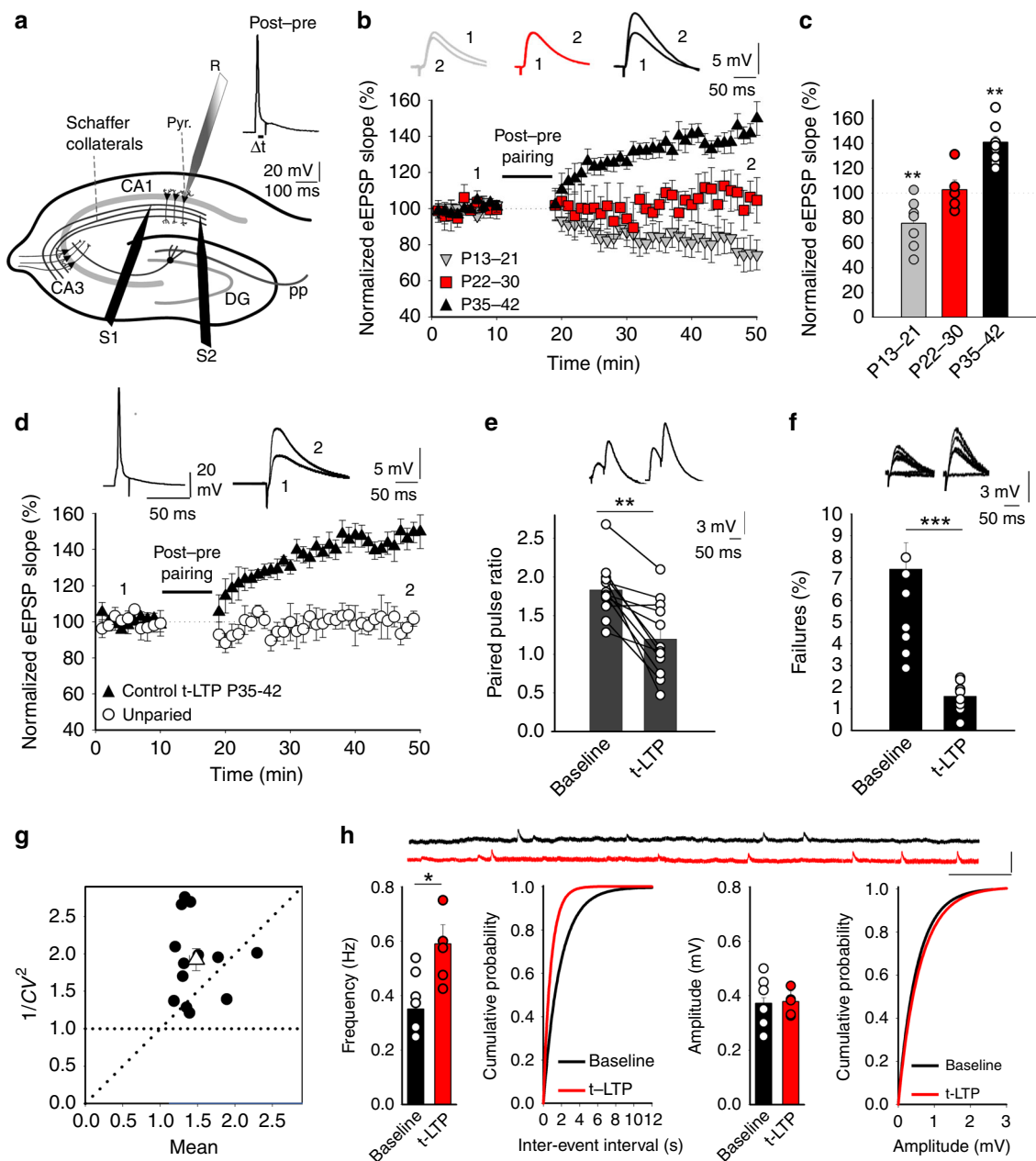
at P13–21, whereas no plasticity is induced at P22–30<sup>12</sup>. We confirmed this in slices prepared from the mouse hippocampus at P13–21, monitoring the excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) evoked by extracellular stimulation of Schaffer collaterals in the stratum radiatum (StR) by whole-cell recording of CA1 pyramidal cells (PCs) (Fig. 1a, b). When 100 pairings of single EPSPs and single postsynaptic spikes at 0.2 Hz were applied, t-LTD was clearly induced in current-clamp mode. Thus, a post-before-pre pairing protocol (post-pre protocol), with a post-synaptic spike arising ~18 ms before the presynaptic stimulation, inducing robust t-LTD ( $75 \pm 7\%$ ,  $n = 7$ ), whereas an unpaired control pathway had no such effect ( $101 \pm 6\%$ ,  $n = 7$ ; Fig. 1b, c). No t-LTD was observed at P22–30 (paired pathway  $102 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , unpaired pathway  $103 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; Fig. 1b, c), yet when the same protocol was applied at P35–42 a robust t-LTP was surprisingly observed ( $141 \pm 5\%$ ,  $n = 13$  vs  $100 \pm 4\%$ ,  $n = 13$  in the unpaired pathway, Fig. 1b–d). From P31–34, no plasticity or t-LTP was observed in ~50% of the cases (48%: no plastic change, 52%: t-LTP), indicating this is a transition interval from no-LTD (no plasticity) to t-LTP. For this reason, we include here only values from P35–42 when t-LTP is observed practically in 100% of the cases. These results indicate that there is a switch from t-LTD to t-LTP at CA3–CA1 synapses during development.

**Presynaptic expression of t-LTP.** To determine the locus of expression of this form of hippocampal t-LTP, we combined several approaches. First, we analyzed the PPRs at baseline and 30 min after the pairing protocol was applied, identifying a significant decrease in the PPR after t-LTP indicative of a presynaptic change (from  $1.83 \pm 0.10$  at baseline to  $1.22 \pm 0.13$ ;  $n = 13$ , Fig. 1e). Second, we observed failures in synaptic transmission in several experiments ( $n = 10$ ) and when we analyzed whether the number of failures change after t-LTP, a consistent decrease in the number of failures was observed (from  $7.5 \pm 1.2\%$  at baseline to  $1.6 \pm 0.2\%$  after t-LTP,  $n = 10$ ), again suggesting a presynaptic locus for this process (Fig. 1f). Third, we estimated the noise-subtracted CV of the synaptic responses before and after t-LTP induction. A plot of  $CV^{-2}$  versus the change in the mean evoked EPSP slope ( $M$ ) before and after t-LTP yielded points mainly above the diagonal line consistent with a presynaptic modification of release parameters<sup>14–16</sup>, Fig. 1g). Finally, we recorded and analyzed miniature responses (mEPSP) in the presence of 500 nM tetrodotoxin (TTX), before and after the induction of t-LTP by adding TTX during baseline, washing out TTX and performing the t-LTP experiment and finally adding TTX again. In this experimental condition we found t-LTP similar to previous experiments ( $146 \pm 12\%$ ,  $n = 6$  vs  $103 \pm 5\%$ ,  $n = 6$  in the unpaired pathway). In this experiment, we found that after t-LTP induction, the frequency of mEPSP increased (baseline  $0.36 \pm 0.05$  Hz,  $n = 6$ ; after t-LTP induction  $0.59 \pm 0.05$  Hz,  $n = 6$ , Fig. 1h) with no effect on mEPSP amplitude (baseline  $0.370 \pm 0.003$  mV,  $n = 6$ ; after t-LTP induction  $0.380 \pm 0.02$  mV,  $n = 6$ , Fig. 1h). These results again suggesting a presynaptic locus for t-LTP expression with no change in the postsynaptic parameter  $Q$ .

Together, these results are consistent with an increase in the probability of neurotransmitter release in the paired pathway and indicative of a presynaptic locus for this form of t-LTP.

**The switch occurs across a range of spike timings.** Next, we wanted to determine whether the observed switch occurred just at the time interval between spikes studied (–18 ms) or whether it happens across a range of spike timings. Thus, to better characterize the time windows for this switch, we performed experiments using different timings between presynaptic and postsynaptic activity as a protocol to induce a t-LTD switch to

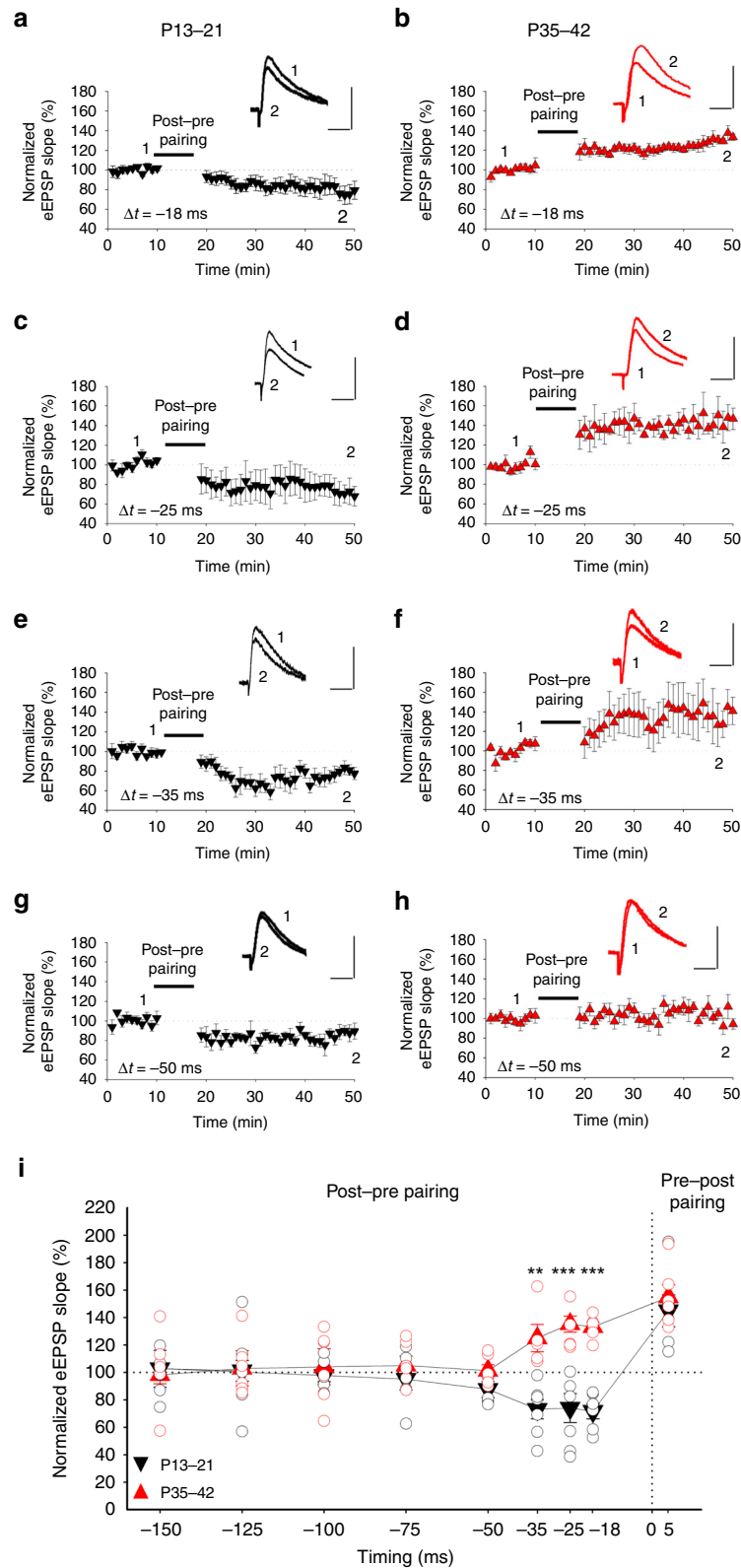




**Fig. 1 Presynaptic t-LTD at P13-21 in the hippocampus switches to t-LTP at P35-42.** **a** Left, scheme showing the general experimental set-up: R, recording electrode; S1 and S2, stimulating electrodes; right, pairing protocol utilized ( $\Delta t$ , time between the peak of the spike and EPSP onset). **b** A post-pre single-spike pairing protocol induces t-LTD at P13-21 (gray triangles,  $n = 7$ ). This t-LTD is evident during the third week of development but it disappears during the fourth week (red squares,  $n = 6$ ) and switches to t-LTP during the fifth week (black triangles,  $n = 13$ ). The EPSP slopes monitored are shown. Traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **c** Summary of the results.  $**p < 0.01$ , two-sided Student's  $t$  test. **d** A post-pre protocol induces t-LTP at P35-42. The EPSP slopes monitored in paired (black triangles,  $n = 13$ ) and unpaired pathways (white circles,  $n = 13$ ) are shown. The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) applying the induction protocol in the paired pathway, only the paired pathway showed t-LTP. **e-h** t-LTP induced by a post-pre protocol at P35-42 is expressed presynaptically. PPR decreases after t-LTP: sample traces at baseline and 30 min after induction of t-LTP,  $n = 13$ ,  $**p < 0.01$ , two-sided Student's  $t$  test. For detailed PPR values see Supplementary Data 1 **e**. The number of failures decreases after t-LTP induction **f**. Sample traces at baseline and 30 min after induction of t-LTP ( $n = 10$ ,  $***p < 0.001$ , two-sided Student's  $t$  test). **g** Normalized plot of  $CV^{-2}$  versus mean EPSP slope yields data points mainly above the diagonal after induction of t-LTP ( $n = 13$ ). **h** Miniature EPSP (mEPSPs) monitored during the baseline and after t-LTP induction in the presence of TTX (500 nM). Histograms and cumulative graphs show that after t-LTP induction, the frequency of mEPSPs increases, whereas the amplitude of mEPSP remains constant ( $n = 6$ ). Scale bars: 1 mV, 1 s.  $*p < 0.05$ , two-sided Student's  $t$  test. The error bars represent the S.E.M. Source data are provided as a Source Data file.

t-LTP, ranging from  $-150$  to  $+5$  ms (Fig. 2a-i). At  $+5$  ms (pre-post protocol), a clear t-LTP was observed at both P13-21 and P35-42 ( $145 \pm 12\%$ ,  $n = 6$  at P13-21 and  $155 \pm 9\%$ ,  $n = 6$  at P35-42, Fig. 2i). At  $-150$ ,  $-125$ ,  $-100$ , or  $-75$  ms, when a post-pre protocol was applied, no t-LTD was observed at P13-21

( $103 \pm 13\%$ ,  $n = 6$ ,  $101 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ,  $98 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ,  $95 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ , respectively, Fig. 2i) or P35-42 ( $98 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ,  $103 \pm 13\%$ ,  $n = 6$ ,  $104 \pm 11\%$ ,  $n = 6$ ,  $105 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , respectively, Fig. 2i). At  $-50$  ms, a small magnitude t-LTD was observed ( $88 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 2g) at P13-21, that did not switch to t-LTP when the same

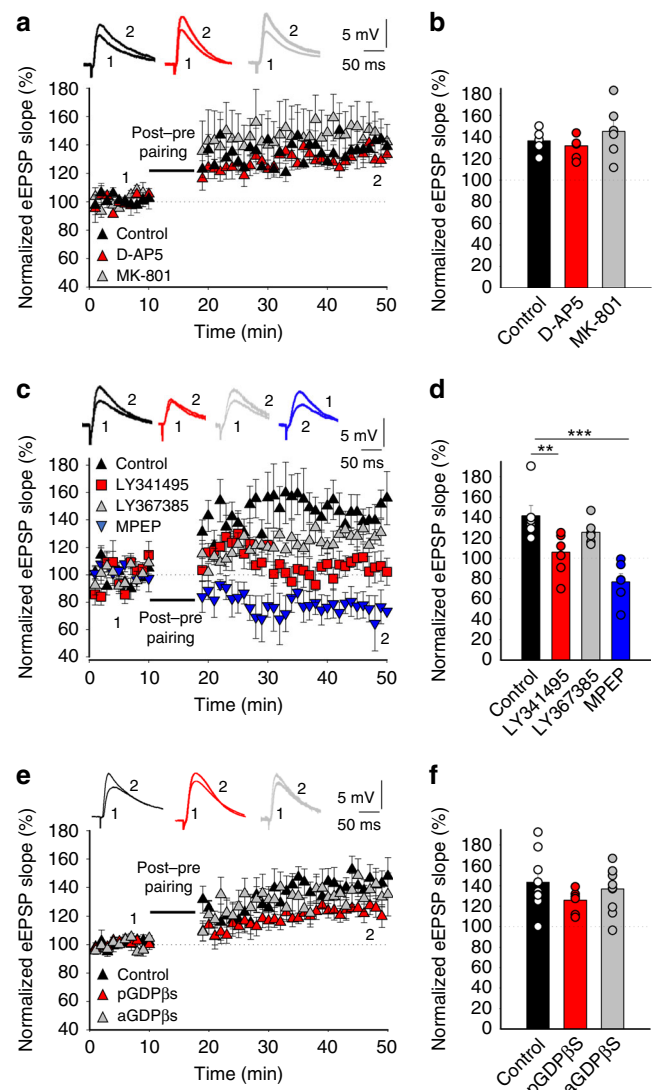


**Fig. 2** Time window for STDP at P13-21 and P35-42. A post-before-pre pairing protocol at P13-21 (black) induces t-LTD for  $\Delta t = -18$  ms ( $n = 6$ ) **a**,  $-25$  ms ( $n = 6$ ) **c** and  $-35$  ms ( $n = 7$ ) **e** but not for  $-50$  ms ( $n = 6$ ) or a more negative  $\Delta t$ . **g** At P35-42 (red), the same protocol induces t-LTP for  $\Delta t = -18$  ms ( $n = 6$ ) **b**,  $-25$  ms ( $n = 6$ ) **d** and  $-35$  ms ( $n = 5$ ) **f** but not for  $-50$  ms ( $n = 6$ ) or a more negative  $\Delta t$ . **h**  $\Delta t$ : time interval between EPSP onset and peak of postsynaptic spike. The EPSP slopes monitored before and after the pairing protocol are shown. Traces show eEPSPs before (1) and 30 min after (2) the pairing protocol. Scale bars: 5 mV, 50 ms. **i** Summary plot showing the time window for STDP at P13-21 (black triangles) and P35-42 (red triangles). \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , two-sided Student's  $t$  test. The error bars represent the S.E.M. Source data are provided as a Source Data file.

experiment was performed at P35–42 ( $101 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 2h). At  $-35$  and  $-25$  ms, a strong t-LTD was observed at P13–21 ( $73 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ ;  $72 \pm 9\%$ ,  $n = 6$ ; respectively, Fig. 2c, e). When the experiments were repeated using these timings but at P35–42, a switch to t-LTP was observed in both cases ( $125 \pm 9\%$ ,  $n = 6$ ;  $131 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 2d, f) as occurred at  $-18$  ms (P13–21:  $72 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; P35–42:  $133 \pm 3\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 2a, b). These results indicate that t-LTD is observed only at P13–21 and that the observed switch from t-LTD to t-LTP is common to different time intervals ( $-18$  to  $-35$  ms), and that the t-LTP is not the result of a timing shift occurring with development (Fig. 2). In Fig. 2i, a STDP plasticity window for this presynaptic form of LTP is shown.

**Presynaptic t-LTP requires mGluRs but not NMDARs.** The t-LTD detected in juveniles (P13–21) requires non-postsynaptic, probably presynaptic NMDARs<sup>12,13,17</sup>. By contrast, the presynaptic form of t-LTP that appears at P35–42 was not affected when D-AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ) or MK-801 ( $0.5$ – $1 \text{ mM}$ ) were present in the bath ( $132 \pm 4\%$ ,  $n = 6$  and,  $145 \pm 10\%$ ;  $n = 6$ , respectively, vs interleaved controls,  $136 \pm 4\%$ ;  $n = 6$ , Fig. 3a, b). Hence, the t-LTP induced by a post-pre protocol at P35–42 does not require pre- or postsynaptic NMDARs. As the t-LTP identified did not require NMDARs, we explored its dependency on other glutamate receptors. As mGluRs have been implicated in plasticity and LTP in different regions and at distinct synapses<sup>18</sup>, we tested whether this form of presynaptic t-LTP at CA3–CA1 synapses also required mGluRs. Significantly, t-LTP was completely blocked in the presence of the broad-spectrum mGluR antagonist LY341495 ( $100 \mu\text{M}$ ,  $104 \pm 8\%$ ;  $n = 6$ ; Fig. 3c, d). Moreover, t-LTP was not prevented by treating the slices with the mGluR1 antagonist LY367385 ( $100 \mu\text{M}$ ,  $125 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ), yet it was prevented by the specific mGluR5 antagonist MPEP ( $20$ – $40 \mu\text{M}$ ,  $77 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ , relative to interleaved slices for the three experimental conditions, pooled together,  $142 \pm 9\%$ ,  $n = 9$ , Fig. 3c, d), indicating that t-LTP requires mGluR5. To determine whether the mGluRs involved in t-LTP induction are postsynaptic, we repeated the experiments with the postsynaptic neuron loaded with GDP $\beta$ S to prevent G-protein-mediated signaling. However, t-LTP induction was surprisingly not affected by this treatment ( $125 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ , versus interleaved control slices with no GDP $\beta$ S loaded into the postsynaptic cells,  $143 \pm 9\%$ ,  $n = 9$ ; Fig. 3e, f). When these experiments were repeated with GDP $\beta$ S loaded into astrocytes, again t-LTP was not affected ( $137 \pm 7\%$ ,  $n = 10$ ; Fig. 3e, f), yet the t-LTD at P13–21 was prevented when postsynaptically loaded with GDP $\beta$ S ( $73 \pm 5\%$ ,  $n = 5$  in control experiments vs  $98 \pm 6\%$ ,  $n = 6$  in postsynaptically GDP $\beta$ S-treated slices), as reported previously, indicating the compound is working in these experiments<sup>13</sup>. The fact that blocking postsynaptic and astrocytic G-protein-dependent signaling did not affect t-LTP induction, whereas mGluR antagonists in the bath altered this phenomenon, suggests that the mGluR5 necessary for t-LTP induction with a post-pre protocol are most probably located at presynaptic neurons.

It is interesting to note that this form of t-LTP is not the same, nor is it related to the t-LTP described previously and obtained through a pre-post protocol at the same synapses in slices from young animals<sup>13,19</sup>. Indeed, this t-LTP was found to still be present at P35–42 ( $183 \pm 13\%$ ,  $n = 12$ ) and to still be dependent on postsynaptic NMDA receptor activation as it was blocked by D-AP5 ( $100 \pm 3\%$ ,  $n = 6$ ) and by MK-801 ( $0.5$ – $1 \text{ mM}$ ) either in the bath ( $101 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ) or loaded into the postsynaptic cell ( $95 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ). In addition, by measuring changes in the PPR, we found that this form of t-LTP was expressed postsynaptically (PPR  $1.7 \pm 0.09$  at baseline and  $1.4 \pm 0.13\%$ , 30 min after t-LTP,



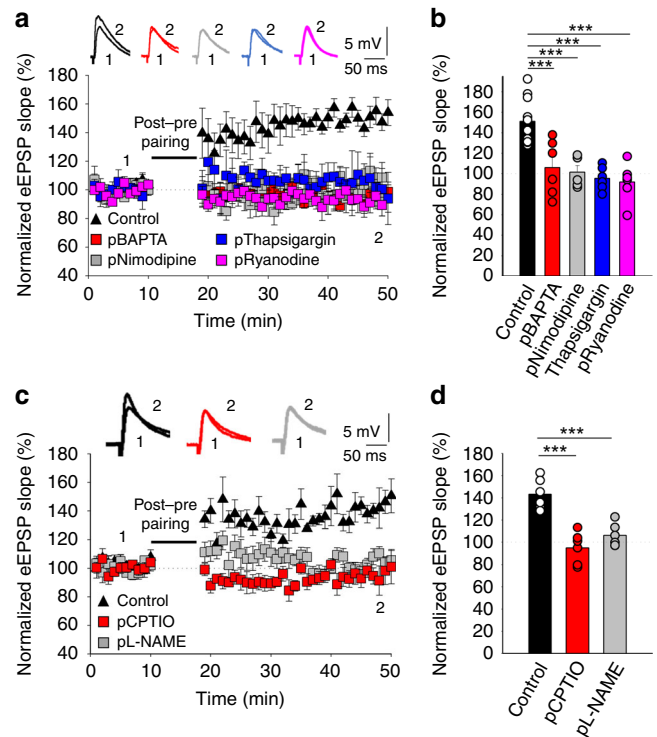
**Fig. 3 Presynaptic t-LTP requires metabotropic glutamate receptors but not NMDARs.** **a** Addition of D-AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ) to the superfusion fluid did not prevent t-LTP induction. The EPSP slope is shown in D-AP5-treated (red triangles,  $n = 6$ ) and untreated cells (black triangles,  $n = 6$ ). Bath-applied MK-801 ( $500 \mu\text{M}$ – $1 \text{ mM}$ ) did not block the induction of t-LTP (gray triangles,  $n = 6$ ). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **b** Summary of the results. **c** The t-LTP requires mGluR5. The EPSP slopes monitored in control slices (black triangles,  $n = 9$ ) and in slices treated with the mGluR antagonist LY341495 ( $100 \mu\text{M}$ , red squares,  $n = 6$ ), the group I mGluR antagonist LY367385 ( $100 \mu\text{M}$ , gray triangles,  $n = 6$ ) or the mGluR5 antagonist MPEP ( $500 \mu\text{M}$ , blue triangles,  $n = 6$ ) are shown following post-before-pre pairing. The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **d** Summary of the results. **e** The t-LTP requires activation of presynaptic mGluR5s. Time course of t-LTP induction in control conditions (black triangles,  $n = 9$ ) and with the postsynaptic neuron (red triangles,  $n = 6$ ) or astrocytes (gray triangles,  $n = 10$ ) loaded with GDP $\beta$ S ( $1 \text{ mM}$ ). Inset: Traces show the EPSP before (1) and 30 min after pairing (2) in control slices or when the postsynaptic neuron or astrocytes are loaded with GDP $\beta$ S. **f** Summary of the results. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA + Holm-Sidak. Error bars represent the S.E.M. Source data are provided as a Source Data file.

$n = 12$ , Supplementary Fig. 1). Thus, the presynaptic form of t-LTP we found here coincides temporally with the “more classic” form of postsynaptic t-LTP dependent on NMDAR activation from young animals. Hence, the two forms of spike t-LTP (pre- and

postsynaptic) are both operative at the same time at hippocampal CA3–CA1 synapses.

**t-LTP requires postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$ .** Although t-LTP seems not to depend on NMDARs, both t-LTP and t-LTD appear to require postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  at neocortical<sup>20,21</sup> and hippocampal synapses<sup>13</sup>. Therefore, we assessed whether this form of presynaptic t-LTP that emerges at hippocampal CA3–CA1 synapses requires postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  by loading the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA into the postsynaptic cell via the patch pipette. The inclusion of BAPTA (20 mM) in the recording pipette prevented t-LTP ( $106 \pm 11\%$ ,  $n = 6$ , versus interleaved controls,  $151 \pm 6\%$ ,  $n = 11$ ; Fig. 4a, b), indicating that it required postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$ . Since t-LTP requires postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  but NMDARs are not the source of this  $\text{Ca}^{2+}$ , we examined how this postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  is generated and what is its role in the induction of t-LTP. As L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels have been implicated previously in plasticity<sup>13</sup>, we evaluated whether they were involved in t-LTP by performing the pairing protocol after bath application of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, nimodipine (10  $\mu\text{M}$ ). The induction of t-LTP was fully blocked in the presence of bath-applied nimodipine ( $98 \pm 11\%$ ,  $n = 6$ ), as it was when nimodipine was loaded into the postsynaptic neuron ( $101 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 4a, b), indicating that like the presynaptic t-LTD, presynaptic t-LTP requires calcium flux through L-type calcium channels into the postsynaptic neuron. In addition, the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores has been described to be required for some forms of t-LTD<sup>13</sup> and t-LTP at cortical and hippocampal synapses<sup>13,20,21</sup>. Indeed, when we assessed this possibility in the t-LTP induced by a post-pre protocol at P35–42, t-LTP was prevented when the post-pre protocol was applied after loading the postsynaptic neuron with thapsigargin (10  $\mu\text{M}$ ) that depletes intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores ( $95 \pm 4\%$ ,  $n = 6$  versus interleaved controls,  $151 \pm 6\%$ ,  $n = 11$ ; Fig. 4a, b). Furthermore, the inclusion in the pipette of ryanodine (100  $\mu\text{M}$ ), a blocker of ryanodine receptors and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal stores, prevented the induction of t-LTP ( $92 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 4a, b). Hence,  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores is required for t-LTP.

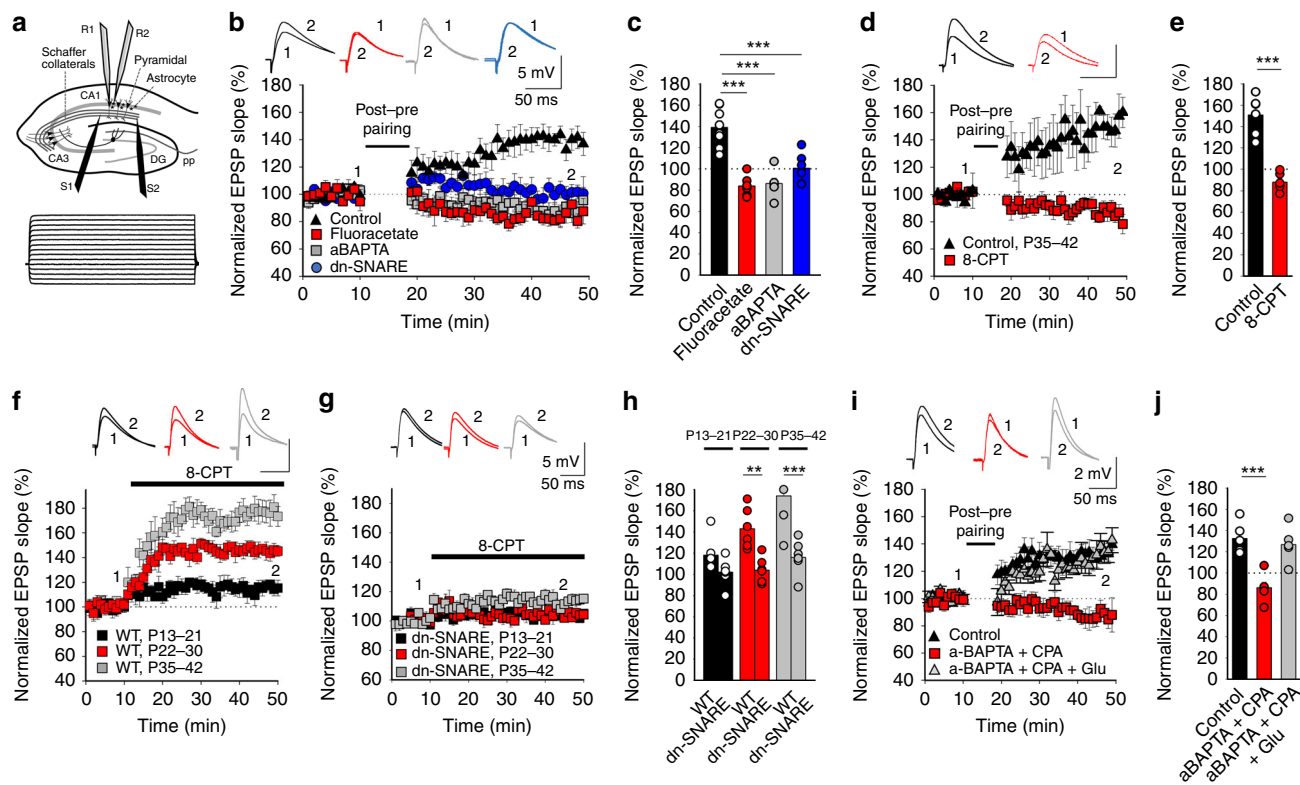
**t-LTP involves NO from the postsynaptic neuron.** Endocannabinoids are synthesized and released by postsynaptic cells in response to depolarization, elevated  $\text{Ca}^{2+}$  and/or mGluR signaling, and some synapses require eCB signaling and  $\text{CB}_1\text{R}$  activation for plasticity<sup>22,23</sup>. In fact, it was recently demonstrated that  $\text{CB}_1\text{R}$  activity is necessary to induce t-LTD at CA3–CA1 synapses at P13–21<sup>13</sup>. To investigate the involvement of cannabinoid signaling in t-LTP, we loaded the postsynaptic neurons with tetrahydrolipstatin (THL, 5  $\mu\text{M}$ ), an inhibitor of the eCB synthesizing enzyme diacylglycerol lipase, yet the induction of t-LTP was not affected in these conditions ( $138 \pm 14\%$ ,  $n = 6$ , Supplementary Fig. 2, THL is working in these experiments as in its presence, t-LTD at P13–21 was prevented, control t-LTD:  $71 \pm 8\%$ ,  $n = 5$ , in THL:  $102 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ , as previously reported in ref. 13). When we checked for any direct effect of the eCB 2-AG on t-LTP induction, application of 2-AG did not recover the t-LTP lost after loading the postsynaptic neuron with BAPTA ( $95 \pm 7\%$ ,  $n = 7$  vs interleaved control slices,  $145 \pm 8\%$ ,  $n = 12$ , Supplementary Fig. 2). In addition, t-LTP was not affected when induced in the presence of the  $\text{CB}_1\text{R}$  antagonist AM251 (3  $\mu\text{M}$ ), evidence that  $\text{CB}_1\text{R}$ s did not participate directly in hippocampal presynaptic t-LTP ( $154 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , versus interleaved slices,  $145 \pm 8\%$ ,  $n = 12$ , controls pooled together for the THL, p-BAPTA + 2-AG, and AM251 experiments, Supplementary Fig. 2). Thus, unlike presynaptic t-LTD at P13–21, the induction of presynaptic t-LTP at P35–42 does not require  $\text{CB}_1\text{R}$  activation.



**Fig. 4 t-LTP requires postsynaptic calcium and NO.** **a** t-LTP is prevented by loading BAPTA (20 mM) into the postsynaptic recording pipette. Nimodipine (10  $\mu\text{M}$ ), thapsigargin (10  $\mu\text{M}$ ) and ryanodine (100  $\mu\text{M}$ ) loading into the postsynaptic neuron via the patch pipette prevented t-LTP induction. The EPSP slopes shown were monitored in control slices (black triangles,  $n = 11$ ) and in slices treated with BAPTA (red squares,  $n = 6$ ), nimodipine (gray squares,  $n = 6$ ), thapsigargin (blue squares,  $n = 6$ ) and ryanodine (pink squares,  $n = 6$ ). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **b** Summary of the results. **c** Time course of the effect of post-before-pre pairing in control conditions (black triangles,  $n = 6$ ) and with pCPTIO (100  $\mu\text{M}$ , red squares,  $n = 6$ ) and L-NAME (100  $\mu\text{M}$ , gray squares,  $n = 6$ ) loaded into the postsynaptic neuron. Insets: the traces show the EPSPs before (1) and 30 min after pairing (2). **d** Summary of the results. \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA + Holm-Sidak. The error bars represent the S.E.M. Source data are provided as a Source Data file.

In our experiments, a messenger seemed to be released by the postsynaptic neuron to mediate presynaptic expression of t-LTP and since eCBs appear not to be involved, we set out to identify this substance. One retrograde signal that has been implicated in presynaptic LTP is NO<sup>24–26</sup> and there is evidence that calcium influx through L-type calcium channels could participate in NO synthesis and/or its release from postsynaptic neurons<sup>24,27</sup>. Significantly, the induction of t-LTP was prevented when the NO scavenger cPTIO (100  $\mu\text{M}$ ) had been included in the bath solution or loaded into the postsynaptic neuron via the patch pipette (bath:  $102 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , postsynaptic neuron:  $95 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 4c, d). Furthermore, presynaptic t-LTP was also prevented when a NO synthase inhibitor, L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), was present in the bath ( $105 \pm 9\%$ ,  $n = 6$ ) or when was loaded into the postsynaptic neuron, ( $106 \pm 4\%$ ,  $n = 6$  vs  $143 \pm 5\%$ ,  $n = 8$ , in interleaved controls, pooled together for all experimental conditions: Fig. 4c, d), further indicating that t-LTP induction requires NO from the postsynaptic neuron. L-NAME had no effect on t-LTD when it was added to the bath at P13–21 ( $54 \pm 11\%$ ,  $n = 6$  vs  $75 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ , in interleaved controls, Supplementary Fig. 3). Together, these results indicate that NO produced and released by the postsynaptic neuron is required for t-LTP.





**Fig. 5 Astrocytes and astroglial adenosine and glutamate involvement in t-LTP.** Astrocytes are required for t-LTP. **a** Scheme showing the general experimental set-up: R1 and R2, recording electrodes; S1 and S2, stimulating electrodes; and voltage responses of an astrocyte shown in current clamp. **b** Time course of t-LTP induction in control conditions (black triangles,  $n = 8$ ), and of the loss of t-LTP in the presence of fluoroacetate (10 mM, red squares,  $n = 6$ ), in BAPTA-treated astrocytes (20 mM, gray squares,  $n = 6$ ) and in dnSNARE mutant mice (blue circles,  $n = 6$ ). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after pairing (2). **c** Summary of the results.  $***p < 0.001$ , One-way ANOVA + Holm-Sidak. **d** Presynaptic  $A_1R$ -mediated inhibition driven by adenosine released by astrocytes increases with maturation. Time course of t-LTP induction in control conditions (black triangles,  $n = 6$ ), and of the loss of t-LTP in 8-CPT-treated slices (2  $\mu$ M, red squares,  $n = 6$ ). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after pairing (2). Scale bars: 5 mV, 50 ms. **e** Summary of the results.  $***p < 0.001$ , two-sided Student's  $t$  test. 8-CPT gradually increases the evoked EPSP slope at P13–21 (black squares,  $n = 7$ ), P22–30 (red squares,  $n = 6$ ) and P35–42 (gray squares,  $n = 6$ ) in WT **f** but not in dn-SNARE mice (P13–21: black squares,  $n = 6$ ; P22–30: red squares,  $n = 6$ ; P35–42: gray squares,  $n = 7$ ) **g, h** Summary of the results.  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ , two-sided Student's  $t$  test. **i** The release of glutamate and adenosine by astrocytes is necessary for presynaptic t-LTP induction. Time course of the effect of post-before-pre pairing in control conditions (black triangles,  $n = 6$ ), and in slices with BAPTA loaded into astrocytes and exposed to CPA (50 nM, red squares,  $n = 6$ ), or slices with BAPTA loaded astrocytes exposed to CPA and glutamate puffs (100  $\mu$ M, gray triangles). Insets: The traces show the EPSPs before (1) and 30 min after pairing (2). **j** Summary of the results.  $***p < 0.001$ . One-way ANOVA + Holm-Sidak. The error bars represent the S.E.M. Source data are provided as a Source Data file.

**Presynaptic t-LTP involves astrocyte signalling.** Astrocytes are implicated in t-LTD at the synapses studied here<sup>13</sup>, participating in the closing of the windows of plasticity with maturation<sup>12</sup>. Thus, we assessed whether astrocyte activation is also necessary to induce the presynaptic form of t-LTP that appears after P35. Three different approaches were used on slices from P35–42 mice (Fig. 5a–c), first preincubating the slices for 1 h with the gliotoxin fluoroacetate (10 mM), which completely abolished t-LTP ( $84 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 5b, c). Next, individual astrocytes were loaded with 20 mM of the  $Ca^{2+}$  chelator BAPTA through a patch pipette to inhibit vesicle and  $Ca^{2+}$ -dependent gliotransmitter release from these astrocytes<sup>28</sup>. The recording of CA1 pyramidal neurons demonstrated how BAPTA loading impaired the induction of t-LTP in proximal CA1 PCs at a distance of 50–100  $\mu$ m ( $86 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 5a–c). Finally, we assessed this phenomenon in P35–42 dnSNARE mutant mice in which there is no functional vesicular gliotransmitter release<sup>29–31</sup>. In contrast to the typical t-LTP observed at P35–42 CA3–CA1 synapses in WT mice ( $139 \pm 6\%$ ,  $n = 8$ , pooled), t-LTP could not be induced at this age in these dnSNARE mice ( $101 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 5b, c). Together, these results clearly indicate that astrocytes are required for t-LTP induction and the switch from t-LTD to t-LTP.

**t-LTP involves enhanced inhibition of presynaptic release.** Inhibition appears to be crucial for the windows of plasticity at different synapses<sup>4,5</sup>. Both GABAergic and adenosine receptor-mediated inhibition have been linked to the closure of plasticity windows<sup>5,12,19,32–35</sup>, and both GABAergic and adenosine receptor-mediated inhibition seem to become enhanced with maturation<sup>12,34,36,37</sup>. Here, we studied how GABAergic-dependent inhibition affected the switch from t-LTD to t-LTP by evaluating the effect of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline (20  $\mu$ M) and the GABA<sub>B</sub> receptor antagonist SHC-50911 (50  $\mu$ M) on t-LTP induction at P35–42. In the presence of these antagonists t-LTP was still evident (bicuculline  $185 \pm 12\%$ ,  $n = 7$ ; SHC-50911  $150 \pm 12\%$ ,  $n = 7$ ; interleaved slices  $173 \pm 18\%$ ,  $n = 6$ , Supplementary Fig. 4), indicating that enhanced GABAergic inhibition was not responsible for the switch from t-LTD to t-LTP at CA3–CA1 synapses during the fifth week of development.

As we recently demonstrated that the activation of presynaptic  $A_1R$ s is responsible for the loss of t-LTD at P22–30<sup>12</sup>, we assessed whether 8-CPT, an antagonist of  $A_1R$ , affected t-LTP. This t-LTP was fully impaired in the presence of this compound ( $88 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ , vs  $151 \pm 7\%$ ,  $n = 6$  in interleaved control slices, Fig. 5d, e).

At P13–21, 8-CPT did not affect t-LTD ( $77 \pm 3\%$ ,  $n = 6$  vs  $73 \pm 2\%$ ,  $n = 6$  in interleaved control slices), and still recovered lost t-LTD at P22–30 ( $76 \pm 5\%$ ,  $n = 7$  vs  $112 \pm 4\%$ ,  $n = 6$  in interleaved control slices, Supplementary Fig. 5). When the EPSP slope was measured in the presence of this A<sub>1</sub>R antagonist, the effect of 8-CPT was stronger at P22–30 than at P13–21. If extracellular adenosine levels continue to increase as development proceeds, a stronger effect on presynaptic A<sub>1</sub>R would be expected at P35–42. Indeed, the EPSP slope increased more in the presence of 8-CPT at this later age than at P13–21 or P22–30 (P13–21:  $118 \pm 6\%$ ,  $n = 7$ ; P22–30:  $143 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ); and P35–42 ( $174 \pm 11\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 5f–h). These results indicate that there is an increase in presynaptic A<sub>1</sub>R-mediated inhibition with maturation. In the presence of 8-CPT, a decrease in the number of failures in transmission was observed at P13–21 ( $15 \pm 5\%$  baseline,  $10 \pm 3\%$ , in the presence of 8-CPT,  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ) and P22–30 ( $18 \pm 4\%$  baseline,  $5 \pm 3\%$ , in the presence of 8-CPT,  $n = 6$ ,  $p < 0.01$ ) and at P35–42 ( $20 \pm 4\%$  baseline,  $1 \pm 1\%$  in the presence of 8-CPT,  $n = 6$ ,  $p < 0.001$ ), suggesting a presynaptic action of adenosine on A<sub>1</sub>Rs. We also studied the effect of 8-CPT in dnSNARE mice to determine whether the ATP/adenosine that activates A<sub>1</sub>R originates from astrocytes and we found that 8-CPT had practically no effect on the EPSP slope in dnSNARE mice at any of the ages studied ( $102 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ;  $104 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ;  $116 \pm 6\%$ ,  $n = 7$  at P13–21; P22–30 and P35–42, respectively, Fig. 5f–h). Indeed, 8-CPT did not affect eEPSP amplitude at P35–42 when astrocytes were loaded with BAPTA ( $103 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ).

**A<sub>1</sub>R activation at P13–21 converts t-LTD into t-LTP.** If higher extracellular adenosine concentration during development more strongly activates presynaptic A<sub>1</sub>R at CA3–CA1 hippocampal synapses dampening glutamate release and mediating a switch from t-LTD to t-LTP at P35–42, it could be possible to convert t-LTD in t-LTP earlier in the development by enhancing A<sub>1</sub>R activation (e.g., at P13–21 when t-LTD is robust or at P22–30 when t-LTD is lost). We have previously demonstrated that CPA 20–30 nM is not able to convert t-LTD into t-LTP but that it is able to prevent t-LTD induction at P13–21<sup>12</sup>. To determine whether increasing the concentration of CPA converts t-LTD into t-LTP, we increased CPA concentration to 50 nM; in this experimental condition, CPA is able to produce a switch from t-LTD (at P13–21) or from no-LTD (at P22–30) to t-LTP (from  $76 \pm 3\%$ ,  $n = 7$ , to  $151 \pm 12\%$ ,  $n = 7$  at P13–21, and from  $102 \pm 2\%$ ,  $n = 6$ , to  $131 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , at P22–30, Supplementary Fig. 6). To further confirm a presynaptic locus for adenosine on A<sub>1</sub>R we performed experiments studying the effect of CPA 50 nM on mEPSP frequency. In this experimental condition, a clear decrease in the frequency of mEPSP ( $0.55 \pm 0.03$  Hz during baseline;  $0.22 \pm 0.02$  Hz in the presence of CPA,  $n = 6$ ) was observed with no effect of mEPSP amplitude ( $0.33 \pm 0.03$  mV during baseline;  $0.38 \pm 0.03$  mV in the presence of CPA, Supplementary Fig. 6), indicating that the effects of CPA are indeed presynaptic and thus the activation of presynaptic A<sub>1</sub>R dampens glutamate release that increases with development. These results are in agreement with a primary involvement of A<sub>1</sub>R in the observed switch from t-LTD to t-LTP with maturation.

These results indicate that the adenosine-activating A<sub>1</sub>R is released by astrocytes. As such, adenosine originating from astrocytes activates presynaptic A<sub>1</sub>Rs and depresses glutamate release, an effect that increases with maturation.

**t-LTP requires adenosine and glutamate from astrocytes.** It might be expected that if ATP/adenosine was the only gliotransmitter astrocytes release to mediate the switch from t-LTD to t-LTP, when astrocytes were loaded with BAPTA, the A<sub>1</sub>R

agonist CPA should be able to recover t-LTP at P35–42 (when no t-LTP would otherwise be observed). However, t-LTP was not recovered by CPA in these conditions ( $86 \pm 5\%$ ,  $n = 6$  vs  $132 \pm 5\%$ ,  $n = 6$  in control slices, Fig. 5i, j), suggesting that another gliotransmitter might also be involved. As presynaptic mGluRs might also participate in the induction of this form of LTP, we tested whether glutamate from astrocytes may be also required to induce presynaptic t-LTP at P35–42 by applying glutamate puffs. When we tested this in slices with BAPTA loaded astrocytes maintained in the presence of CPA, the puffs of glutamate applied recovered t-LTP ( $127 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 5i, j). Hence, the gliotransmitters ATP/adenosine and glutamate are necessary for the induction of presynaptic t-LTP.

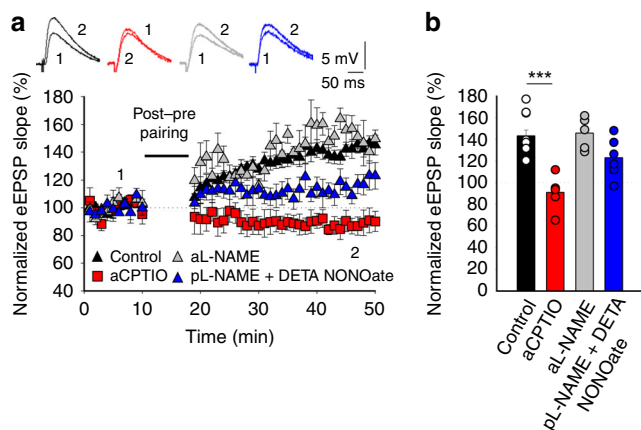
This glutamate presumably activates presynaptic mGluRs and our data suggest that as development proceeds, the probability of glutamate release decreases to the extent that glutamate from astrocytes is needed to activate presynaptic mGluRs so that they may participate in presynaptic t-LTP. We tested whether the probability of glutamate release decreases at CA3–CA1 synapses with maturation by measuring mEPSP frequencies at P13–21 and P35–42 (in the presence of TTX, 500 nM). A clear decrease in the frequency of mEPSPs was evident at P35–42 (frequency:  $0.36 \pm 0.04$  Hz, amplitude:  $0.40 \pm 0.05$  mV,  $n = 6$ ) compared with P13–21 (frequency:  $0.55 \pm 0.03$  Hz, amplitude:  $0.33 \pm 0.02$  mV,  $n = 6$ , Supplementary Fig. 7), yet with no effect on the amplitude. This phenomenon was prevented by treating the P35–42 slices with 8-CPT (frequency  $0.50 \pm 0.03$  Hz, amplitude  $0.34 \pm 0.02$  mV,  $n = 6$ ; Supplementary Fig. 7).

A similar result was found when evoked responses were studied during development. We studied PPR of evoked responses from P13–21 to P35–42 mice and observed an increase in PPR at P35–42 when compared with P13–21 (PPR:  $1.8 \pm 0.07$  at P35–42,  $n = 19$  and  $1.4 \pm 0.06$ ,  $n = 11$  at P13–21), an increase that was prevented in the presence of 8-CPT ( $1.27 \pm 0.2$ ,  $n = 5$ , Supplementary Fig. 7). Hence, with maturation there appears to be a decrease in glutamate release probability at CA3–CA1 synapses owing to the adenosine (released by astrocytes)-mediated activation of presynaptic A<sub>1</sub>Rs.

Finally, to define the signal that might stimulate astrocytes to release gliotransmitters and mediate this form of LTP, we evaluated the role of NO, the release of which from the postsynaptic neuron is necessary for t-LTP. NO has previously been shown to increase the calcium that enters and stimulates astrocytes<sup>38</sup>, raising the possibility that NO could activate or interact with astrocytes to release ATP/adenosine and/or glutamate in our conditions. Interestingly, t-LTP induction was prevented by loading the NO scavenger c-PTIO into astrocytes (a-cPTIO  $91 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ) but not when they were loaded with L-NAME (a-L-NAME  $146 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ , vs non-treated control slices  $143 \pm 5\%$ ,  $n = 11$ , Fig. 6a, b). In addition, when t-LTP induction was prevented by loading the postsynaptic neuron with L-NAME, puffs of the NO donor DETA NONOate (5 mM) on astrocytes recovered t-LTP ( $123 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ , Fig. 6a, b). Hence, NO from the postsynaptic neuron might enter the astrocyte to stimulate or modulate the release of gliotransmitters (Fig. 7).

## Discussion

In this study, we show that presynaptic t-LTD switches to presynaptic t-LTP at hippocampal CA3–CA1 synapses across a wide range of spike timings as young mice mature and demonstrate this form of t-LTP is expressed presynaptically and requires the activation of presynaptic mGluR5 but not NMDARs. In addition, this presynaptic t-LTP requires the flux of calcium through postsynaptic L-type calcium channels, as well as calcium release from postsynaptic intracellular stores. Furthermore, this form of



**Fig. 6 NO is necessary for astrocytic release of gliotransmitter(s) and t-LTP induction.** **a** t-LTP is prevented by loading cPTIO (100  $\mu$ M) into the astrocyte via the recording pipette but not by loading L-NAME (100  $\mu$ M). When L-NAME is loaded into the postsynaptic neuron and a NO donor (DETA NONOate, 5 mM) added in forms of puffs over astrocytes, t-LTP is recovered. The EPSP slopes monitored in paired control slices (black triangles,  $n = 11$ ) are shown and in slices treated with aCPTIO (red squares,  $n = 6$ ), aL-NAME (gray triangles,  $n = 6$ ) and pL-NAME + DETA NONOate (blue triangles,  $n = 6$ ) are shown. The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **b** Summary of the results.  $***p < 0.001$ , one-way ANOVA + Holm-Sidak. The error bars represent the S.E.M. Source data are provided as a Source Data file.

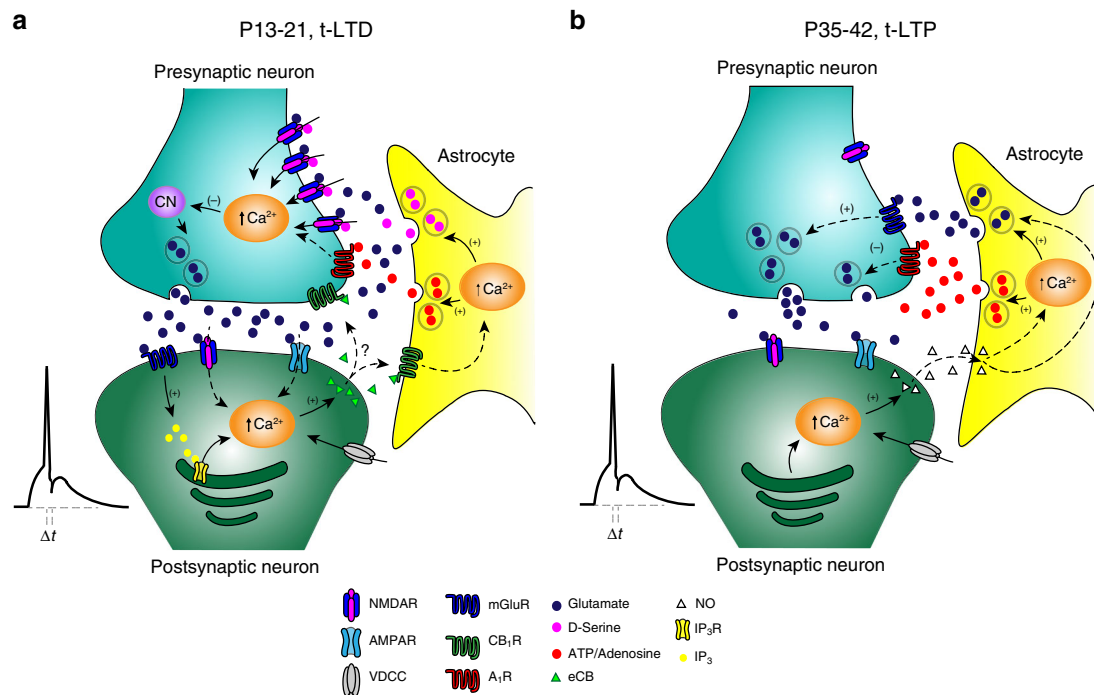
presynaptic t-LTP requires postsynaptic NO release as a retrograde signal to astrocytes and astroglial signaling to release ATP/adenosine to activate presynaptic  $A_1R$  and glutamate to activate mGluR (Fig. 7). The number and frequency of spikes necessary to induce STDP in the hippocampus has been controversial and the differences found have been explained by the size of the initial EPSP, the age of animals, the level of inhibition, etc.<sup>39,40</sup>. In our results, it is clear that pairing EPSP of 3–5 mV size 100 times with single postsynaptic spikes at 0.2 Hz induces robust plasticity. Although there are number of uncertainties associated with quantal analysis in the CNS<sup>14–16</sup>, in the present work, however, we presented evidence from four different approaches to determine the locus of this form of t-LTP, all consistent with presynaptic changes: failure rate, PPRs, CV and mEPSP frequency, and amplitude analysis. Hence, this form of presynaptically expressed LTP appears during development through a switch from t-LTD, unlike any other form of presynaptic t-LTP (preLTP) described to date, such that our findings expand the repertoire of presynaptic LTPs<sup>24,41,42</sup>. Studying the timing-dependency of this form of t-LTP across a range of spike timings we observed that the switch from t-LTD to t-LTP occurred at different time intervals, from  $-18$  to  $-35$  ms, where there was robust t-LTD at P13–21, indicating this switch happens with maturation and is not owing to a timing interval broadening or shifting along the time axis. Interestingly, in adult human brain slices the STDP curve shows t-LTP at positive and wide negative timing intervals (0,  $-80$  ms), what is in agreement with our results, and suggest that the synaptic learning rules may be conserved (at least in part) across species<sup>43</sup>. Interestingly, we found that the switch from t-LTD to t-LTP is present by using different STDP protocols as a short burst of two spikes at 100 Hz anti-causally paired with a single postsynaptic action potential or when single presynaptic stimulation was anti-causally paired with two postsynaptic actions potentials at 100 Hz (Supplementary Fig. 8). An important question that remains to be approached is

whether this switch to t-LTP is related only to STDP or is observed using other protocols that induce LTD at young stages.

Unlike t-LTD, t-LTP appears not to require NMDARs. Rather, it requires the activation of mGluR5 that appear to reside presynaptically. At these synapses, presynaptic mGluRs have been described to bi-directionally modulate glutamate release<sup>44</sup> and to participate in plasticity<sup>45</sup>. Moreover, glial cells are also thought to have mGluRs that possibly influence plasticity<sup>46,47</sup>, although the data obtained here indicate that astrocyte mGluRs are not involved in this particular form of t-LTP. Nevertheless, our findings make it clear that there is a maturation-associated shift from the involvement of NMDARs to mGluRs in hippocampal plasticity. Forms of preLTP that are dependent on preNMDARs have been described in the hippocampus<sup>41</sup> and at entorhinal cortex to DG synapses<sup>48–51</sup> and preLTP forms independent of NMDARs have also been described at hippocampal MF-CA3 synapses<sup>52</sup>, in the cerebellum<sup>53</sup>, thalamus<sup>54</sup>, subiculum<sup>55</sup>, amygdala<sup>56</sup>, and neocortex<sup>57</sup>. The requirement of mGluRs for some forms of preLTP has previously been defined in the hippocampus<sup>45,47</sup>, although these preLTPs were not induced using STDP protocols. At hippocampal CA3–CA1 synapses, a preLTP that is independent of NMDAR has been described<sup>24</sup>, this form of LTP share features with the presynaptic t-LTP we describe here, yet it does not arise through a switch from LTD and it is observed in younger animals when the preLTP we describe is not observed. Importantly, the previously described preLTP does not apparently require glutamate<sup>24</sup>, whereas the pre t-LTP described here clearly depends on glutamate-activating mGluRs. Interestingly, we found that the postsynaptic t-LTP identified previously at the same synapses in young animals using a standard protocol for postsynaptic t-LTP, i.e. a pre-post protocol with 5–10 ms timing<sup>13,19</sup>; is still present at P35–42 and it continues to be dependent on postsynaptic ionotropic NMDAR activation, as well as retaining postsynaptic expression. Importantly, these results indicate that two different forms of t-LTP (one presynaptic and another one postsynaptic) coincide temporally. Similar to other forms of LTP, t-LTP requires a rise in  $Ca^{2+}$  in the postsynaptic cell<sup>25</sup> and resembling the postsynaptic NMDAR-independent forms of LTP described previously<sup>24–26</sup>, t-LTP requires the release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores. These features of hippocampal t-LTP are also common to other forms of preLTP<sup>23,38</sup>. Although in our results postsynaptic internal stores are not recruited by mGluRs, mGluR independent forms to recruit calcium from intracellular stores have been demonstrated, as by the activation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels that couple to intracellular  $Ca^{2+}$  release by  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release<sup>58,59</sup>. Despite using three different approaches, we failed to obtain evidence for the participation of the cannabinoid signaling system in this form of LTP and found NO as the retrograde signal produced by the postsynaptic neuron via  $Ca^{2+}$  increase, as in other types of preLTP<sup>24–26</sup>.

Through three different approaches, we demonstrated the involvement of astrocytes in presynaptic t-LTP and while astrocytes have been shown to participate in synaptic potentiation<sup>47,49,50</sup>, here they have been proposed to participate in a switch from preLTD to preLTP. Here, we found that enhanced inhibition of presynaptic release mediated by adenosine-activating presynaptic  $A_1R$  and not by GABA receptors is responsible for the switch from t-LTD to t-LTP during the fifth week of development. Interestingly, we found that  $A_1R$  activation at P13–21 converts t-LTD into t-LTP, confirming the important role of adenosine and presynaptic  $A_1R$  in the switch of plasticity observed. As in our results, an increase in the concentration of extracellular adenosine and/or in the activation of  $A_1R$ s with maturation has been described previously<sup>34,36,37</sup>. While identifying the source of adenosine is complex as it may be





**Fig. 7** Model showing the switch from t-LTD to t-LTP occurring with maturation at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. **a** At P13-21, a known presynaptic form of t-LTD is induced by a post-pre single-spike pairing protocol. In this presynaptically expressed form of t-LTD, postsynaptic action potentials activate voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VDCCs) and the presynaptically released glutamate activates postsynaptic mGluR, activating PLC and provoking  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal stores and DAG production, which serves a precursor for endocannabinoids (eCBs) synthesis. For t-LTD, eCB signal is necessary to activate CB<sub>1</sub> receptors to facilitate D-serine release from astrocytes. Together with the glutamate released from presynaptic neurons, this D-serine is known to activate preNMDAR on Schaffer collateral boutons, leading to an increase in presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$ , calcineurin activation and synaptic depression. Modified from ref. 12,13. **b** In the present study, it has been found that at P35-32, t-LTD is not observed and instead the same protocol (a post-pre protocol) induces presynaptic t-LTP. At this developmental stage, the probability of release has considerably decreased owing to an increase in adenosine release from astrocytes compared with P13-21. Also different to t-LTD induced by the same protocol at P13-21, eCB signaling and NMDAR are not required for presynaptic t-LTP. For the induction of t-LTP, postsynaptic action potentials activates voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VDCCs) causing calcium release from internal stores, inducing NO synthesis. The NO signal leads to the activation of astrocytes to release glutamate and/or adenosine to activate presynaptic mGluR5 and A<sub>1</sub>R respectively on Schaffer collateral boutons. A<sub>1</sub>R activation considerably reduces neurotransmitter probability release whereas mGluR5 activation leads to a long-lasting increase in glutamate release and synaptic potentiation.

released directly from neurons<sup>60–62</sup> or glial cells<sup>29</sup> or through glial gap junction hemi-channels<sup>63</sup> or other mechanisms, our data suggest that adenosine is of astrocytic origin and hence, we propose that presynaptic A<sub>1</sub>R activation augments during development, at least in part owing to the increase in the amount of extracellular adenosine released by astrocytes. This A<sub>1</sub>R activation in turn inhibits glutamate release, reducing the ambient glutamate in association, producing the switch to t-LTP in association with a rise in mGluR activity. Thus, it seems that at P13–21, when neurotransmitter release probability is high, NMDARs are present and activated to mediate a depression of glutamate release, whereas when the probability of release is low and the number of NMDARs has decreased (at P35–42), mGluR receptors are better positioned to respond to the low available extracellular glutamate concentration. This may be possible as metabotropic receptors are well known to amplify weak signals, in this case low extracellular levels of glutamate to mediate a potentiation of glutamate release. In fact, mGluR5 are well coupled to PLC and may affect the exocytotic machinery via PKC<sup>64</sup> or Munc13 activation, which has been shown to potentiate glutamate release and is directly involved in docking and priming of neurotransmitter vesicles as has been shown for mGluR7<sup>65</sup>. Whether NMDARs are better coupled to mechanisms that decrease than those that increase glutamate release needs to be determined. For the moment the exact molecular mechanisms underlying t-LTP remain unknown. Thus, the increase in adenosine from astrocytes appears to alter

glutamate release, synaptic efficacy, and t-LTP. However, although there is a clear requirement for astrocytes to provide adenosine, other sources cannot be ruled out<sup>66</sup>. Whether the increase in extracellular adenosine as the hippocampus matures is due to an increase in the number of astrocytes or to enhanced release, or whether other components that participate in the induction of this form of t-LTP change with maturation merits further study. Hence, it may be possible to control plasticity by manipulating the availability of adenosine<sup>67</sup>, which would make this an interesting target to improve health and learning and memory.

The specific release probability seems to influence the manifestation of LTP, with a higher probability of glutamate release favoring LTD and a lower probability favoring LTP<sup>24</sup>. Thus, a change in the release probability may be the direct presynaptic mechanism responsible for the effects observed. Indeed, we observe a decrease in the frequency of mEPSP and in evoked responses slopes with maturation that depends on A<sub>1</sub>R activation. Accordingly, our data are consistent with reports that when there is a high glutamate release probability, synapses are likely to show preLTD, whereas synapses with a low probability of release are more prone to show preLTP<sup>24,68–72</sup>. The decrease in release probability may contribute to the stabilization of hippocampal circuits. Indeed, a decrease in the probability of release at glutamatergic synapses with development has been demonstrated in the developing neocortex<sup>73,74</sup>, calyx of Held<sup>75</sup>, striatum<sup>76</sup>, and at

MF-CA3<sup>77</sup> and CA3-CA1<sup>78</sup> synapses in the hippocampus. As such, this phenomenon would appear to represent an essential step in the maturation of glutamatergic synapses. The decrease in the probability of glutamate release found may not occur at all synapses and it may occur in a heterogeneous manner, possibly only at synapses with a high probability of release as indicated previously<sup>78</sup>. Although more work is necessary to understand how this developmental change in release probability occurs, it could be explained by changes in calcium influx and in the expression of presynaptic calcium channels reducing the vesicle release probability<sup>78</sup>.

Adenosine appears not to be the only gliotransmitter necessary for the induction of t-LTP, but rather, ATP/adenosine and glutamate appear to be released together to mediate t-LTP induction. Indeed, individual astrocytes may release both adenosine and glutamate<sup>79</sup> and by releasing these two gliotransmitters, astrocytes may control hippocampal basal synaptic activity<sup>80</sup> and tonically depress neurotransmission<sup>29</sup>, probably depressing some synapses and potentiating others<sup>79</sup>. In addition, the possibility exist that glutamate from the presynaptic neuron activates presynaptic mGluR5 too but that this amount of glutamate or mGluR5 activation is not enough to mediate t-LTP and, together with glutamate released from astrocytes are sufficient for t-LTP. Thus, we believe our data have revealed important components of the mechanism underlying the switch to t-LTP in the window of plasticity, opening the way to the pharmacological manipulation of plasticity and of t-LTP, which is likely to be relevant to understand brain function during development. An interesting issue that remains to be properly explained is whether astrocytes release ATP/adenosine and glutamate tonically as maturation proceeds or whether the release of these factors is controlled by direct stimulation, and what is the true role of the postsynaptic neuron in the induction of t-LTP. Although more research will be needed to properly address this question, surprisingly, NO synthesized by the postsynaptic neuron seems to be released and enter the astrocyte, potentially stimulating gliotransmitter release via an increase in calcium flux into the astrocyte<sup>38</sup>. Whether NO potentiates the release of one or both gliotransmitters remains to be determined.

What might be the physiological relevance of this switch in plasticity from presynaptic depression to presynaptic potentiation? The true influence of STDP in the hippocampus remains unclear and further studies will be necessary to determine the specific developmental role of t-LTD and t-LTP in these circuits. t-LTD may be involved in refining synapses and indeed, is thought to play an important role in developmental plasticity, potentially weakening excitatory synapses that are underused or behaviorally irrelevant<sup>81,82</sup>. The form of t-LTP described here is only evident from the fifth week of development, indicating its relevance from early adulthood onwards when it probably influences learning and memory. Presynaptic plasticity may also involve structural changes and may alter the short-term dynamics of neurotransmitter release, contributing to circuit computations, the modification of the excitatory/inhibitory balance and sensory adaptation<sup>42</sup>. Why some synapses, as we observe at CA3-CA1 synapses, show pre- or postsynaptic plasticity has yet to be determined, although this may reflect different computational requirements. As indicated above, presynaptic t-LTP may contribute to circuit computation by changing short-term dynamics and it may shift synapses between low-pass and high-pass filtering modes, thereby changing the computational properties of the synapse<sup>48,83,84</sup>. At somatosensory cortex, L4-L2/3 and L2/3-L2/3 synapses, STDP shows different requirements, indicating that the pre- or post-synaptic expression of plasticity is fundamental for the proper brain circuits functioning and that it is possible they are differently regulated<sup>85,86</sup>. In addition, as

predicted by some models<sup>83</sup>, presynaptically expressed t-LTP may increase the trial to trial reliability, and with the t-LTP postsynaptically expressed may induce a larger change in signal-to-noise ratio than postsynaptic changes alone as described in auditory cortex<sup>87</sup>. Furthermore, multiple expression sites may be favorable to the system as it may have more possibilities for plasticity when one is disrupted. Finally, modulators may affect differently the two different forms of LTP, making possible to associate particular behaviors, with a particular locus of expression. Thus, both pre- and postsynaptic mechanisms might contribute to the weight dependence of plasticity<sup>83</sup>. The co-existence of multiple forms of plasticity (pre- and postsynaptic) may also reflect the hierarchical processing of information, potentially allowing memory to be ordered according to its salience, as suggested in the amygdala<sup>88</sup>.

There is almost no information regarding the possible behavioral influence of presynaptic LTP, an emerging field in which data have only been provided for MF-CA3 synapses (where preLTP is implicated in learning and memory<sup>89</sup>) and amygdala synapses (where preLTP is implicated in fear memory formation<sup>90</sup>). At CA3-CA1 synapses, the behavioral role of presynaptic t-LTP remains basically to be determined, however, a recent report has suggested that at CA3-CA1 synapses presynaptic changes within the synaptic engram may be associated with context-dependent fear conditioning, suggesting that preLTP might be associated with learning and memory *in vivo*<sup>91</sup>. Morphological changes are known to occur during critical periods of plasticity and in adulthood<sup>92,93</sup>, yet whether this form of presynaptic plasticity induces structural plasticity is not clear at present and will require further study.

## Methods

**Mice.** All animal procedures were carried out in accordance with the European Union Directive 2010/63/EU regarding the protection of animals used for scientific purposes and were approved by the Ethics Committee of the Universidad Pablo de Olavide and the Ethics Committee of the Andalusian Government. C57BL/6 mice were obtained from Harlan Laboratories (Spain) and postnatal day (P) 13–42 mice of either sex were used. Animals were kept on a continuous 12 h light/dark cycle, at temperatures between 18 and 24 °C at 40–60% humidity, and with full availability of food and water. In some experiments, dominant-negative (dn) SNARE mice<sup>29,30</sup> of same age intervals were used. These mice were not fed with doxycycline to allow for transgene expression. In these mice, human glial fibrillary acidic protein (hGFAP) promoter mediates the expression of tetracycline trans-activator (tTA) specifically in astrocytes, which will in turn activate the tetO operator driving the expression of the cytosolic fraction of VAMP2/synaptobrevin II and the enhanced green fluorescence protein. Expression of dnSNARE transgenes interferes with the formation of the SNARE complex, resulting on the blockade of exocytosis and impairment of vesicular release in astrocytes<sup>31</sup>.

**Slice preparation.** Hippocampal slices were prepared as described previously<sup>12,13</sup>. In brief, mice were anesthetized with isoflurane (2%) and decapitated, and the whole brain containing the two hippocampi was removed and placed in an ice-cold solution containing (in mM): NaCl, 126; KCl, 3; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.25; MgSO<sub>4</sub>, 2; CaCl<sub>2</sub>, 2; NaHCO<sub>3</sub>, 26; and glucose, 10 (pH 7.2, 300 mOsm L<sup>-1</sup>). Transverse hippocampal microtome slices were obtained (350- $\mu$ m thick, Leica VT1000S) and maintained oxygenated (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) in the same solution for at least 1 h before use. Experiments were carried out at 30–34 °C. During the experiments; the slices were superfused continuously with the solution indicated above.

**Electrophysiological recordings.** Whole-cell patch clamp recordings of pyramidal cells located in the CA1 field of the hippocampus were obtained under visual guidance by infrared differential interference contrast microscopy. The neurons were verified as PCs through their characteristic voltage response to a current step protocol in current-clamp configuration with a patch clamp amplifier (Multiclamp 700B), acquiring the data with pCLAMP 10.2 software (Molecular Devices). Patch electrodes were pulled from borosilicate glass tubes and had a resistance of 4–7 M $\Omega$  when filled with (in mM): potassium gluconate, 110; HEPES, 40; NaCl, 4; ATP-Mg, 4; and GTP, 0.3 (pH 7.2–7.3, 290 mOsm L<sup>-1</sup>). Only cells with a stable resting membrane potential below –55 mV were assessed and the cell recordings were excluded from the analysis if the series resistance changed by >15%. During the experiments, the changes in V<sub>m</sub> (1–3 mV) were corrected by imposing continuous current (10–30 pA) to maintain the membrane potential constant. All recordings

were low-pass filtered at 3 kHz and acquired at 10 kHz. For plasticity experiments, EPSPs were evoked alternately in two input pathways, test and control, each at 0.2 Hz. Stimulating electrodes were situated at 200–400  $\mu\text{m}$  from cell soma. The EPSPs were induced by two monopolar stimulation electrodes placed in the StR using brief current pulses (200  $\mu\text{s}$ , 0.1–0.2 mA). Stimulation was adjusted to obtain an EPSP peak amplitude of ~3–5 mV in control conditions and pathway independence was assured by the lack of cross-facilitation when the pathways were stimulated alternately at 50 ms intervals. Plasticity was assessed through the changes in the EPSP slope, measured in its rising phase as a linear fit between time points corresponding to 25–30% and 70–75% of the peak amplitude under control conditions. Miniature responses were recorded in the presence of 500 nM TTX.

**Plasticity protocols.** After establishing a stable basal EPSP over 10 min, the test input was paired 100 times with a single postsynaptic spike. The single postsynaptic spike was evoked by a brief somatic current pulse (5 ms, 0.1–0.5 pA) and the control pathway was unstimulated during the pairing period. To induce t-LTP, the postsynaptic AP was evoked 18 ms before the onset of the EPSP. EPSP slopes were monitored for at least 30 min after the pairing protocol and the presynaptic stimulation frequency remained constant throughout the experiment. In some experiments we used a pre-post protocol (5–10 ms timing) to induce a postsynaptic form of t-LTP. Where appropriate, “Glutamate Puffs” were applied using a Picospritzer (Parker Hannifin). Glutamate was dissolved in the external solution and puffed through a micropipette over a BAPTA loaded astrocyte at a pressure of 10 psi and for 50–200 ms, which did not affect patch-clamping. For each experiment, 50–100 glutamate puffs were applied at 0.2 Hz after the recording neuron at baseline, 18 ms before the onset of the EPSP. EPSP slopes were monitored for 30 min after the protocol. In some experiments, different timings were used to construct a STDP window. Experiments were repeated a minimum of six times.

**Pharmacology.** Pharmacological agents were purchased from: Sigma Aldrich - BAPTA, D-serine, TTX, sodium fluoracetate, CPA, and all the salts used to prepare the internal and external solutions; Tocris Bioscience - (+)-MK-801 maleate, D-AP5, 8-CPT, cPTIO, L-glutamic acid, LY367385, LY341495, MPEP, 2-AG, AM251, L-NAME, DETA NONOate, Nimodipine, Thapsigargin, THL, GDP $\beta$ S, Calphostin C, Bicuculline, and SCH50911. These compounds were dissolved in water except 8-CPT, 2-AG, AM251, THL, nimodipine, and thapsigargin that were dissolved in dimethyl sulphoxide.

**Data analysis.** The data were analyzed with the Clampfit 10.2 software (Molecular Devices) and the last 5 min of recording were used to estimate the changes in synaptic efficacy relative to the baseline. For the PPR experiments, two EPSPs were evoked for 30 s at the baseline frequency at the beginning of the baseline recording, 40 ms apart, and again 30 min after the end of the pairing protocol. The PPR was expressed as the slope of the second EPSP divided by the slope of the first EPSP. Coefficient of variation (CV) analysis was done on EPSP slopes<sup>10</sup>. Graphs were made using Sigmaplot 11.0.

**Statistical analysis.** Shapiro–Wilk normality and equal variance tests, with a confidence interval of 95% were performed before the statistical comparisons. For comparisons between two groups paired or unpaired Student’s test were used as appropriate. For Multiple comparisons with the same control, one-way analysis of variance followed by Holm–Sidak post hoc test was used. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. and  $p$  values <0.05 were considered significant. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001.  $P$  values are included in Supplementary Data 2.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Source data are provided with this paper.

Received: 16 October 2019; Accepted: 31 July 2020;

Published online: 01 September 2020

## References

- Cajal, S. R. The Croonian lecture: La fine structure des centres nerveux. *Proc. R. Soc. Lond.* **55**, 331–335 (1894).
- Malenka, R. C. & Bear, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**, 5–21 (2004).
- Bliss, T. V., Collingridge, G. L. & Morris, R. G. Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philos. Trans. R. Soc. Biol.* **369**, 20130129 (2013).
- Hensch, T. K. Critical period regulation. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 549–579 (2004).
- Hensch, T. K. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 877–888 (2005).
- Feldman, D. E. Spike timing-dependence of plasticity. *Neuron* **75**, 556–571 (2012).
- Brzosko, Z., Mierau, S. B. & Paulsen, O. Neuromodulation of spike-timing-dependent plasticity: past, present and future. *Neuron* **103**, 563–581 (2019).
- Duguid, I. & Sjöström, P. J. Novel presynaptic mechanisms for coincidence detection in synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 312–322 (2006).
- Corlew, R., Brasier, D. J., Feldman, D. E. & Philpot, B. D. Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist* **14**, 609–625 (2008).
- Rodríguez-Moreno, A. & Paulsen, O. Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* **11**, 744–745 (2008).
- Bouvier, G., Larsen, R. S., Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O. & Sjöström, P. J. Towards resolving the preNMDARs debate. *Curr. Opin. Neurobiol.* **51**, 1–7 (2018).
- Pérez-Rodríguez, M. et al. Adenosine receptor-mediated developmental loss of spike timing-dependent depression in the hippocampus. *Cereb. Cortex* **29**, 3266–3281 (2019).
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Paulsen, O. & Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic spike timing-dependent long-term depression in the mouse hippocampus. *Cereb. Cortex* **26**, 3637–3654 (2016).
- Malinow, R. & Tsien, R. W. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **346**, 177–180 (1990).
- Korn, H. & Faber, D. S. Quantal analysis and synaptic efficacy in the CNS. *Trends Neurosci.* **14**, 439–445 (1991).
- Brock, J. A., Thomazeau, A., Watanabe, A., Li, S. S. Y. & Sjöström, P. J. A practical guide to using CV analysis for determining the locus of synaptic plasticity. *Front. Synaptic Neurosci.* **12**, 11 (2020).
- Prius-Mengual, J., Pérez-Rodríguez, M., Andrade-Talavera, Y. & Rodríguez-Moreno, A. NMDA receptors containing GluN2B/2C/2D subunits mediate an increase in glutamate release at hippocampal CA3–CA1 synapses. *Mol. Neurobiol.* **56**, 1694–1706 (2018).
- Anwyll, R. Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology* **56**, 735–740 (2009).
- Meredith, R. M., Floyer-Lea, A. M. & Paulsen, O. Maturation of long-term potentiation induction rules in rodent hippocampus: role of GABAergic inhibition. *J. Neurosci.* **23**, 11142–11146 (2003).
- Bender, V. A., Bender, K. J., Brasier, D. J. & Feldman, D. E. Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J. Neurosci.* **16**, 4166–4177 (2006).
- Nevejan, T. & Sakmann, B. Spine Ca<sup>2+</sup> signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J. Neurosci.* **43**, 11001–11013 (2006).
- Heifets, B. D. & Castillo, P. E. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 283–306 (2009).
- Navarrete, M., Diez, A. & Araque, A. Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. B* **369**, 20130599 (2014).
- Padamsey, Z., Tong, R. & Emptage, N. Glutamate is required for depression but not potentiation of long-term presynaptic function. *eLife* **6**, e29688 (2017).
- Castillo, P. E. Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a005728 (2012).
- Padamsey, Z. & Emptage, N. Two sides to long-term potentiation: a view towards reconciliation. *Philos. Trans. R. Soc. B* **369**, 20130154 (2014).
- Pigott, B. M. & Garthwaite, J. Nitric oxide is required for I-type Ca(2+) channel-dependent long-term potentiation in the hippocampus. *Front. Synaptic Neurosci.* **8**, 17 (2016).
- Parpura, V. & Zorec, R. Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes. *Brain Res. Rev.* **63**, 83–92 (2010).
- Pascual, O. et al. Astrocytic purinergic signalling coordinates synaptic networks. *Science* **310**, 113–116 (2005).
- Sardinha, V. M. et al. Astrocytic signaling supports hippocampal-prefrontal theta synchronization and cognitive function. *Glia* **65**, 1944–1960 (2017).
- Sultany, S. et al. Synaptic integration of adult-born hippocampal neurons is locally controlled by astrocytes. *Neuron* **88**, 957–972 (2015).
- Arai, A., Kessler, M. & Lynch, G. The effects of adenosine on the development of long-term potentiation. *Neurosci. Lett.* **119**, 41–44 (1990).
- de Mendonça, A. & Ribeiro, J. A. Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience* **62**, 385–390 (1994).
- Rex, C. S. & Kramar, E. A. et al. Long-term potentiation is impaired in middle-aged rats: regional specificity and reversal by adenosine receptor antagonists. *J. Neurosci.* **25**, 5956–5966 (2005).



35. zur Nedden, S. et al. Intracellular ATP influences synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampus via metabolism to adenosine and activity-dependent activation of A1 receptors. *J. Neurosci.* **31**, 6221–6234 (2011).
36. Sebastiao, A. M., Cunha, R. A., de Mendonça, A. & Ribeiro, J. A. Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *Br. J. Pharm.* **131**, 1629–1634 (2000).
37. Kerr, M., Wall, M. J. & Richardson, M. J. E. Adenosine A1 receptor activation mediates the developmental shift at layer 5 pyramidal cell synapses and is determinant of mature synaptic strength. *J. Physiol.* **591**, 3371–3380 (2013).
38. Matyash, V., Filippov, V., Mohrhagen, K. & Kettenmann, H. Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice. *Mol. Cell. Neurosci.* **18**, 664–670 (2001).
39. Buchanan, K. A. & Mellor, J. R. The activity requirements for spike timing-dependent plasticity in the hippocampus. *Front. Synaptic Neurosci.* **2**, 11 (2010).
40. Wittenberg, G. M. & Wang, S. S.-H. Malleability of spike timing-dependent plasticity at the CA3-CA1 synapse. *J. Neurosci.* **26**, 6610–6617 (2006).
41. McGuinness, L. et al. Presynaptic NMDARs in the hippocampus facilitate transmitter release at theta frequency. *Neuron* **68**, 1109–1127 (2010).
42. Monday, H. R., Younts, T. J. & Castillo, P. E. Long-term plasticity of neurotransmitter release: emerging mechanisms and contributions to brain function and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **41**, 299–322 (2018).
43. Testa-Silva, G. et al. Human synapses show a wide temporal window for spike timing-dependent plasticity. *Front. Synaptic Neurosci.* **2**, 12 (2010).
44. Rodríguez-Moreno, A., Sistiaga, A., Lerma, J. & Sánchez-Prieto, J. Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. *Neuron* **21**, 1477–1486 (1998).
45. Gómez-Gonzalo, M. et al. Endocannabinoids induce lateral long-term potentiation of glutamate release by stimulation of gliotransmission. *Cereb. Cortex* **25**, 3699–3712 (2015).
46. Porter, J. T. & McCarthy, K. D. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* **16**, 5073–5081 (1996).
47. Perea, G. & Araque, A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* **317**, 1083–1086 (2007).
48. Min, M. Y., Asztely, F., Kokaia, M. & Kullmann, D. M. Long-term potentiation and dual component quantal signaling in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4702–4707 (1998).
49. Jourdain, P. et al. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* **10**, 331–339 (2007).
50. Savtchouk, I. et al. Circuit-specific control of the medial entorhinal inputs to the dentate gyrus by atypical presynaptic NMDARs activated by astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 13602–13610 (2019).
51. Pérez-Otaño, I. & Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic NMDARs and astrocytes ally to control circuit-specific information flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 13166–13168 (2019).
52. Nicoll, R. A. & Schmitz, D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 863–876 (2005).
53. Salin, P. A., Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* **16**, 797–803 (1996).
54. Castro-Alamancos, M. A. & Calcagnotto, M. E. Presynaptic long-term potentiation in corticothalamic synapses. *J. Neuroscience* **19**, 9090–9097 (1999).
55. Behr, J., Wozny, C., Fidzinski, P. & Schmitz, D. Synaptic plasticity in the subiculum. *Prog. Neurobiol.* **89**, 334–342 (2009).
56. Lopez de Armentia, M. & Sah, P. Bidirectional synaptic plasticity at nociceptive afferents in the rat central amygdala. *J. Physiol.* **581**, 961–970 (2007).
57. Chen, H. X., Jiang, M., Akakin, D. & Roper, S. N. Long-term potentiation of excitatory synapses on neocortical somatostatin-expressing interneurons. *J. Neurophysiol.* **102**, 3251–3259 (2009).
58. Dittmer, P. J., Wild, A. R., Dell’Acqua, M. L., Sather, W. A. STIM1 Ca<sup>2+</sup> sensor control of L-type Ca<sup>2+</sup> channel-dependent dendritic spine structural plasticity and nuclear signaling. *Cell Rep.* **19**, 321–334 (2017).
59. Johnsen, F. W. et al. Ryanodine receptor activation induces long-term plasticity of spine calcium dynamics. *PLoS Biol.* **13**, e1002181 (2015).
60. Klyuch, B. P., Dale, N. & Wall, M. J. Deletion of ecto-5′-nucleotidase (CD73) reveals direct action potential-dependent adenosine release. *J. Neurosci.* **32**, 3842–3847 (2012).
61. Lovatt, D. et al. Neuronal adenosine release and not astrocytic ATP release mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 6265–6270 (2012).
62. Jo, Y. H. & Schlichter, R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat. Neurosci.* **2**, 241–245 (1999).
63. Huckstep, R. T. et al. Connexin hemichannel-mediated CO<sub>2</sub>-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J. Physiol.* **588**, 3901–3920 (2010).
64. Niswender, C. M. & Conn, P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* **50**, 295–322 (2010).
65. Martín, R. et al. The metabotropic glutamate receptor mGlu7 activates phospholipase C, translocates Munc-13-1 protein, and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **285**, 17907–17917 (2010).
66. Manzoni, O. J., Manabe, T. & Nicoll, R. A. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* **265**, 2098–2101 (1994).
67. Blundon, J. A. et al. Restoring auditory cortex plasticity in adult mice by restricting thalamic adenosine signaling. *Science* **356**, 1352–1356 (2017).
68. Larkman, A., Hannay, T., Stratford, K. & Jack, J. Presynaptic release probability influences the locus of long-term potentiation. *Nature* **360**, 70–73 (1992).
69. Ryan, T. A., Ziv, N. E. & Smith, S. J. Potentiation of evoked vesicle turnover at individually resolved synaptic boutons. *Neuron* **17**, 125–134 (1996).
70. Slutsky, I., Sadeghpour, S., Li, B. & Liu, G. Enhancement of synaptic plasticity through chronically reduced Ca<sup>+</sup> flux during uncorrelated activity. *Neuron* **44**, 835–849 (2004).
71. Hardingham, N. R., Hardingham, G. E., Fox, K. D. & Jack, J. B. J. Presynaptic efficacy directs normalization of synaptic strength in layer 2/3 rat neocortex after paired activity. *J. Neurophysiol.* **97**, 2965–2975 (2007).
72. Sáez, I. & Friedlander, M. J. Plasticity between neuronal pairs in layer 4 of visual cortex varies with synapse state. *J. Neurosci.* **29**, 15286–15298 (2009).
73. Kumar, S. S. & Huguenard, J. R. Properties of excitatory synaptic connections mediated by the corpus callosum in the developing rat neocortex. *J. Neurophysiol.* **86**, 2973–2985 (2001).
74. Reyes, A. & Sakmann, B. Developmental switch in the short-term modification of unitary EPSPs evoked in layer 2/3 and layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex. *J. Neurosci.* **19**, 3827–3835 (1999).
75. Iwasaki, S. & Takahashi, T. Developmental regulation of transmitter release at the calyx of Held in rat auditory brainstem. *J. Physiol.* **534**, 861–871 (2001).
76. Choi, S. & Lovinger, D. M. Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2665–2670 (1997).
77. Bolshakov, V. Y. & Siegelbaum, S. A. Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science* **269**, 1730–1734 (1995).
78. Wasling, P., Hanse, E. & Gustafsson, B. Developmental changes in release properties of the CA3-CA1 synapse in rat hippocampus. *J. Physiol.* **92**, 2714–2724 (2004).
79. Covelo, A. & Araque, A. Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *eLife* **7**, e32237 (2018).
80. Panatier, A. et al. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* **146**, 785–798 (2011).
81. Buonomano, D. V. & Merzenich, M. M. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 149–186 (1998).
82. Feldman, D. E. & Brecht, M. Map plasticity in somatosensory cortex. *Science* **310**, 810–815 (2005).
83. Costa, R. P., Mizusaki, B. E., Sjöström, P. J. & van Rossum, M. C. Functional consequences of pre- and postsynaptic expression of synaptic plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. B* **372**, 20160153 (2017).
84. Tong, R., Emptage, N. J. & Padamsey, Z. A two-compartment model of synaptic computation and plasticity. *Mol. Brain* **13**, 79 (2020).
85. Banerjee, A. et al. Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptor antagonists in mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex* **19**, 2959–2969 (2009).
86. Banerjee, A., González-Rueda, A., Sampaio-Baptista, C., Paulsen, O. & Rodríguez-Moreno, A. Distinct mechanisms of spike timing-dependent LTD at vertical and horizontal inputs onto L2/3 pyramidal neurons in mouse barrel cortex. *Physiol. Rep.* **2**, e00271 (2014).
87. Froemke, R. C. Long-term modification of cortical synapses improves sensory perception. *Nat. Neurosci.* **16**, 79–88 (2013).
88. Shin, R. M. et al. Hierarchical order of coexisting pre- and postsynaptic forms of long-term potentiation at synapses in amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 19073–19078 (2010).
89. Hagen, H. & Manahan-Vaughan, D. Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cereb. Cortex* **21**, 2442–2449 (2011).
90. Tovote, P., Fadok, J. P. & Lüthi, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 317–331 (2015).
91. Choi, J. H. et al. Interregional synaptic maps among engraving cells underlie memory formation. *Science* **360**, 430–435 (2018).
92. Gogolla, N., Galimberti, I. & Caroni, P. Structural plasticity of axon terminals in the adult. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 516–524 (2007).
93. Holtmaat, A. & Caroni, P. Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nat. Neurosci.* **19**, 1553–1562 (2016).

## Acknowledgements

We thank Dr. Cristina Calvino for her technical assistance, profesor Philip Haydon for sharing the dnSNARE mice lines, and Dr Mark Sefton for his editorial assistance. This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MINECO)/FEDER (BFU2012-38208), Ministerio de Economía, Industria y Competitividad/FEDER (BFU2015-68655-P) and the Junta de Andalucía (P11-CVI-7290) to A.R.M. L.A.-G. was supported by a CONACYT (Mexico) Fellowship for short-term visits. M.P.-R. was supported by a PhD Fellowship from the Plan Propio UPO and by a PhD Fellowship from the Basque Country Government. Y.A.-T. was supported by a Postdoctoral Fellowship from the Junta de Andalucía (Spain). P.M.-A. was supported by a Postdoctoral Fellowship from MINECO. S. G.-G. and J.F.O. work was supported by Foundation for Science and Technology fellowship, and grants, PTDC/MED-NEU/31417/2017, IF/00328/2015, as well as Bial Foundation Grants 207/14 and 037/18.

## Author contributions

R.F.-M., M.P.-R., J.P.-M., Y.A.-T., L.E.A.-G., R.P.-A., P.M.-A. and G.F. performed the electrophysiological experiments and analyzed the data. S.G.-G. and J.F.O. provided the dnSNARE mice. A.R.-M. conceived the study and wrote the manuscript. All the authors participated in the drafting of the manuscript, the final version of which they approved for submission.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18024-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.R.-M.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Zahid Padamsey, Jesper Sjöström, and other, anonymous, reviewers for their contributions to the peer review of this work. Peer review reports are available.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020