

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Distribución del sistema
endocannabinoide durante el
desarrollo postnatal temprano de la
corteza cerebelosa de la rata. Efecto
de la ausencia del receptor de
cannabinoides CB1 en la sinapsis
fibra paralela-célula de Purkinje**

TESIS DOCTORAL

Ianire Buceta Salazar

Leioa, 2016

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



NEUROZIENTZIAK SAILA
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS
MEDIKUNTZA ETA ERIZAINZA FAKULTATEA
FACULTAD DE MEDICINA Y ENFERMERÍA

**Distribución del sistema
endocannabinoide durante el
desarrollo postnatal temprano de la
corteza cerebelosa de la rata. Efecto
de la ausencia del receptor de
cannabinoides CB1 en la sinapsis
fibra paralela-célula de Purkinje**

TESIS DOCTORAL

Ianire Buceta Salazar

Leioa, 2016

Tesis Doctoral presentada por la Lda.

IANIRE BUCETA SALAZAR

Financiada por una beca predoctoral para la
formación de investigadores de la Universidad del
País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
(UPV/EHU).

DIRECTORES

Prof. Dr. PEDRO ROLANDO GRANDES MORENO

Prof. Dra. IZASKUN ELEZGARAI GABANTXO

Departamento de Neurociencias
Facultad de Medicina y Enfermería
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Leioa, 2016

AGRADECIMIENTOS

Han pasado ya 6 años y ha llegado el momento de dar las gracias a toda la gente que me ha ayudado y acompañado desde un inicio.

He de agradecer, en primer lugar, a mis Directores de la Tesis, Pedro e Izaskun. Gracias Pedro por sin apenas conocerme, confiar en mí y brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo en vuestro laboratorio. Todavía me acuerdo de cuando entré en tu despacho y estaba también Izaskun que, por aquel entonces ni siquiera nos conocíamos y resulta que las dos compartíamos más de lo que podríamos imaginar. Me habéis dado la oportunidad de comenzar este trabajo de Tesis Doctoral, y lo más importante, habéis compartido la ilusión y motivación conmigo; gracias a vosotros me he seguido formando académicamente y he podido asistir a congresos que, sin duda ofrecen más de lo que jamás pudiera haber imaginado; entre ellos, la que más he disfrutado es sobre todo la SEIC, ya que, además de conocimientos, hemos compartido muchas vivencias que han hecho que realmente me sintiera como en familia y cada uno de los congresos ha sido para mí, un chute de motivación insaturable. Nunca me han faltado, incluso fuera de la SEIC, palabras de apoyo y refuerzo, sobre todo, de dos grandes investigadores y mejores personas si cabe; gracias Laura Cutando, por compartir no sólo el sistema cerebeloso sino que además, tu buena vibra y pasión que, con mucho, se nos contagiaba a todos y Arnau Busquets, gracias por tu atención y ánimos y por la confianza depositada en mí.

El laboratorio es, sin duda, donde más tiempo pasamos y me siento profundamente afortunada y agradecida por pertenecer a este laboratorio y cuando hablo de familia, es porque sois un equipo increíble, porque detrás del alto nivel de producción y de duro trabajo, es destacable la calidad de las personas que me he encontrado desde un principio hasta el día de hoy y donde he tenido la suerte de crecer como investigadora y sobre todo, como

persona. Y es aquí, donde miro hacia atrás, y no sé si estaré a la altura, pues es difícil poner palabras a sentimientos tan grandes...

En primer lugar, eskerrik asko Izaskun, por convertirte en un modelo a seguir para mí, dentro y fuera del ámbito profesional. Prácticamente, todo lo que sé, lo sé gracias a ti, y no podría haber tenido mejor compañera que tú, apasionada, trabajadora y perseverante, una mujer inteligente y humilde, tanto que es una de tus virtudes que más aprecio. Gracias por confiar en mí, por estar a mi lado siempre; sabes leerme entre líneas y eso me ha facilitado absolutamente todo. Nagore, gracias porque sólo el pensar en ti, ya me hace sonreír. Contigo el laboratorio tiene una alegría y momentos tan agradables que no podría imaginármelos sin ti. Contigo todo es fácil, además de tu labor altamente significativa y excelsa en el grupo, quiero agradecerte que, incluso cuando el tiempo era un factor muy limitante, siempre has tenido tiempo para dedicarme, incondicionalmente. Leire, tuvimos un comienzo que dista muchísimo de lo que tenemos ahora, y nada me pone más feliz. Eres un ejemplo a seguir, así lo has sido para mí. Gracias porque siempre me has echado una mano cuando te he necesitado. Gracias por enseñarme a trabajar de forma organizada y demostrarme, una vez más, lo importante que es la labor en grupo. Naroa, coincidimos en mi primer año y tu último, y estoy profundamente agradecida de haberte conocido; breve pero intenso, nos dio tiempo incluso de alguna locura como el presentarnos al programa Mihiluze...jajaja eres el vivo ejemplo de la cordialidad y alegría, eskerrik asko. Gracias Juan, por tu disposición incondicional, por las conversaciones mantenidas y por mostrarme tu apoyo siempre. Sonia, gracias por compartir un poquito de todo lo que sabes. Almudena, eskerrik asko por tu disposición a ayudarme a todos los niveles. Me has ofrecido comprensión y consejos inteligentes e infinitamente prácticos y sobre todo, me has dedicado el tiempo que tan limitado te es. Josune, gracias por tu generosidad y detalles cálidos

que tanto te agradezco. Ana, gracias de todo corazón. Me has demostrado muchísimo en poco tiempo, has sabido escucharme y comprenderme, a veces, incluso lo que resultaba incomprensible para mí. Gracias por estar a mi lado en los momentos más difíciles, siempre lo recordaré. Andoni, eskerrik asko por ser siempre tan atento y generoso, comprensivo, y por nuestras horas de birra en las que continuábamos casi siempre, hablando de trabajo y cuando no, siempre sigue siendo interesante y provechoso hablar contigo. Porque me he llevado un amigo, que me lo ha hecho saber siempre, incluso cuando las situaciones no eran precisamente las más gratas.

Inma, Amale y Rafa, eskerrik asko, por integrarme en las comidas como si de una más se tratara. Hemos compartido momentos muy agradables y he aprendido muchísimo de vosotros y con vosotros. Elsa, gracias por tu continua atención, por cuidarme tanto y tan bien, y por ser tan generosa en todos los aspectos.

Y cómo no, a los “recién llegados”, ya que, por situación, no hemos podido compartir todo y cuanto me hubiera gustado. Aún así, siempre me habéis ofrecido una calidez inmensa y me habéis transmitido muchísima fuerza y cariño. Me refiero a vosotros, Sara, Itziar, Jon, Naiara, Paula, Svein, Aitor, Itziar e Irantzu. Sara, eres un 10 para mí, a todos los niveles. Estar contigo es sinónimo de buena armonía, eskerrik asko. Me has enseñado mucho y, sin apenas conocerme, me has ofrecido tu tiempo y todos tus conocimientos de electrofisiología, momentos en los que nos hemos pasado horas divagando y discuriendo y sabes que nada me puede gustar más. Irantzu, cuando supe que ibas a ser parte del grupo, ya supe que sería increíble, y no me equivoqué; gracias por tener en cada situación, la mejor reacción; siempre atenta, cariñosa y sonriente...eskerrik asko por contagiarme de tu alegría y tu pasión por el trabajo y hacer que lo difícil, parezca sencillo. Itziar, eres el vivo ejemplo de la constancia y perseverancia; gracias por todas

esas veces que me has animado, por saber escuchar y por tus sinceras palabras de apoyo. Jon, eskerrik asko, porque a menudo, sin llegar a hablar incluso, has hecho que en muchos de mis días tomara una actitud de fortaleza que tanto me ha ayudado.

De entre las personas que han pasado por el laboratorio, he de darte las gracias, a ti, Susana. Nos conocimos en el Máster en Neurociencias y hemos pasado momentos increíbles. Gemma, gracias por confiar y creer en mí y seguir contando conmigo con una sonrisa permanente en la cara y llenando la vida de planes interesantes.

Y ¿Qué serían las comidas navideñas sin vuestra compañía? A muchos os he conocido ahí, y me alegro enormemente de seguir manteniendo esta tradición pues lo pasamos en grande, gracias a Rocío, Diana, Jatsu, Javi, Puri y sobre todo gracias a Txema, que hemos incluso coincidido en congresos y me hubiera encantado haber coincidido contigo en el laboratorio, por cuánto sabes y lo bien que divulgas.

Quiero agradecer a los compañeros de otros laboratorios, que tanto me han aportado. Gracias a Fede, Nuria, Naiara, Raffaella, Andrea, Hazel, Ezti, y en especial, gracias a ti, Álvaro, por tu humildad, compañerismo y por tu elegante actitud. Susana Mato, gracias por tu generosidad, interés y cariño que me has demostrado tener. Gracias Laura, Fátima, Bárbara, por conseguir una armonía entre el buen humor y perseverancia, factores que en nuestras tardes largas han sido un apoyo extraordinario. Y sobre todo, gracias a ti Belén, por ayudarme a no rendirme jamás y hacerme ver que los sueños, con esfuerzo e ilusión son más que posibles y gracias, por tu eterna sonrisa. Gracias a ti, Dr. Luis Martínez por tu disposición incondicional, por tus valiosos consejos, por las enriquecedoras conversaciones, por tu amabilidad, y por interesarte acerca del trabajo que he estado realizando.

Delbiñe, gracias por facilitar toda gestión y por tu buen y contagioso humor y las interesantes conversaciones que se mantienen contigo. Juan Bilbao, gracias de corazón por tu disposición a resolvernos cualquier duda estadística y por todas las conversaciones mantenidas, tan agradables y cercanas.

Gracias, al servicio SGIKER, no solo por resolver las dudas, sino por conocer a gente tan fantástica como tú, Irene, que desprendes ilusión y ganas de aprender y estás siempre dispuesta a ayudarme, eskerrik asko. Gracias también a vosotros, Ricardo, Alex y Jon por vuestra disposición incondicional.

He de agradecer, al personal del animalario, que siempre tan amables y comprensivos, me habéis informado y ayudado en todo lo que he necesitado. Y gracias a los animales, ya que sin ellos no hubiera sido posible la investigación.

Dr. José Luis Lanciego, gracias por tus valiosos consejos, por ayudarme desinteresadamente, por ofrecerme oportunidades increíbles y sobre todo, gracias por creer en mí. Gracias, Dr. Eduardo, por hacerme ver y comprender.

Onintze, eskerrik asko porque en esta última etapa has sacado lo mejor de mí; me has motivado a todos los niveles, me has enseñado a luchar por aquello que quiero y a no rendirme bajo ninguna circunstancia. Gracias a vosotras, Iratxe, María, Bego, y sobre todo gracias a ti, Urdiñe, porque aún compartiendo momentos duros en su mayoría, nos hemos levantado una y otra vez, siendo una el sustento de la otra. Manu, eskerrik asko por motivarme constantemente. Jesús, gracias por tu apoyo incondicional.

Eskerrik asko, Garro, Zior, Gotzone, Enara, Sergi, Ekaitz, Rome, Saioa y el resto de amigas que me habéis dado ánimos y levantado en los momentos más críticos.

Eskerrik beruena zeuri, Ana Duque eta zeure familijeri, zeuen parte egin nozuielako. Ana, eskerrik beruena beti nitan fedie okitziarreitzik, beti neugaz egotiarren eta eztakozulabe, zeure denbora eta guraizan dana emotiarreitzik; bereziki, eskerrik asko beti azpimarratuztazulako zenbat balijo doten eta horrek mantenidu izandozt beti bizi. Zugaz bizije beti ikusi dot prisma hobienagaz. Zugandik hain ikasi dot asko, batezbe, inoiz ez amorerik emoten noperak gudauenagaitzik.

Quiero agradecer a mi pequeña “familia”, construida desde el respeto, admiración y sobre todo, cariño: Catalina, gracias por conservar los valores que se van perdiendo y tanto admiro, por tu educación, cortesía, amabilidad y tu disposición incondicionales. Ianire, Mónica, gracias por demostrarme cada día que estáis ahí, bajo cualquier circunstancia, para reír, llorar, y sobre todo, compartir. Sois un apoyo incondicional y un ejemplo de superación y me siento afortunada de compartir mi vida con vosotras; Ianire, has compartido el día más importante de tu vida con nosotras, eskerrik asko. Peitx, hemos hasta convivido juntos...eskerrik asko por creer en mí y por estar conmigo siempre.

Ane, eskerrik asko, por tu incondicionalidad, porque esa sonrisa ha cambiado muchos de mis días, porque es mirarme y emocionarme, por ser tan coherente con lo que dices y haces y sobre todo por apoyarme y, desde la honestidad, apreciarme y eskerrik asko, sobre todo, por hacerme respetar. *Bizitza kantuz biziz, koloreak beti argi.*

Anita, laztana, tú has cambiado mi vida completamente; me lo has dado todo, a cambio de nada. Tengo tantas vivencias contigo, en casa, en el laboratorio, congresos, y si bien son ámbitos muy distintos, reina un factor común en todos esos recuerdos, como el humor, arte, y tantas risas... llenas mi vida de color laztana...eskerrik asko por confiar en mí, a nivel profesional y sobre todo, personal. Beti okingoztazu onduen bizijen, on eta ez hain

onenetan, beti saiatu naien moduen. Kerman, de ti he aprendido mucho, como el mantener vivo el entusiasmo, eskerrik asko.

Aitor, eskerrik asko por aguantar lo insufrible, por no dejar de creer y luchar por mí. Eskerrik asko por quererme tanto y tan bien, por hacerme reír incluso cuando creí que perdí la sonrisa, por ser como eres, tan paciente y bueno, gracias por mejorar mi vida, asko gutzut.

Ama, aita, todo lo que soy os lo debo a vosotros, porque me habeis regalado lo más valioso, que es mi formación, me habeis inculcado valores como la perseverancia, constancia, humildad y gratitud, entre otras muchas. Gracias por estar siempre a mi lado, por levantarme en tantísimas ocasiones, por vuestra entrega incondicional y a cambio, aunque sólo sea este último tramo de mi formación, os dedico esta Tesis Doctoral, que es tanto vuestra como mía.

Aitita, amami, zeuon omenez burututako lana da hau. Asko sufritu izan duzue ni hain lanpetuta ikusteagatik, besteak beste. Zerutik bidaltzen didazuen indarrak bultzatu izan nau sarritan, eta bertatik begira zaudetela jakinik, neure hoberena emango dut beti. Nitaz harro sentitu izan zarete beti, eta beti gogoan izango zaituztet. Inoiz ez dut pentsa ez nauzutela lan hau burutzen ikusiko; bizitzako gertakizunik eta gogorrena, zuek ondoan ez izatea da, dudarik gabe.

*Familiari eskainia, batez ere,
amami eta aititaren omenez.*

0. ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL CEREBELO	5
1.1.1. Neuroanatomía de la corteza cerebelosa madura	6
1.1.1.1. Capas de la corteza cerebelosa madura y los principales tipos neuronales que las constituyen	7
1.1.2. Circuitos cerebelosos.....	10
1.2. DESARROLLO DEL SNC	11
1.2.1. Desarrollo cerebeloso postnatal.....	12
1.2.1.1. Eliminación de sinapsis redundantes durante el desarrollo postnatal...16	
1.3. CANNABINOIDES	17
1.4. FUNCIONES DEL SEC EN EL DESARROLLO	22
1.4.1. Desarrollo embrionario y desarrollo postnatal.....	22
1.4.1.1. Efecto de los eCBs sobre los progenitores neurales	24
1.4.1.2. Implicación del SEC en la neuritogénesis y crecimiento axónico	25
1.4.1.3. Establecimiento de las conexiones neuronales y sinaptogénesis.....	29
1.5. CANNABINOIDES Y DESARROLLO CEREBELOSO	32
1.6. eCBs EN EL CEREBELO ADULTO	35
1.6.1. Localización subcelular de los componentes del SEC en el cerebelo adulto.....	36
1.6.2. SEC y plasticidad sináptica en el cerebelo adulto.....	37
1.6.3. Estudios realizados en <i>CB₁</i> -KO.....	39
1.6.4. Estudios realizados en KO de otros componentes del SEC	41
HIPÓTESIS	45
OBJETIVOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	57
4.1. PLAN DE TRABAJO	59

4.2. ANIMALES EMPLEADOS	59
4.3. GENERACIÓN DE LOS RATONES CB_1-KO.....	60
4.4. ANESTESIA Y PERFUSIÓN.....	61
4.5. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS	61
4. 6. ANTICUERPOS EMPLEADOS.....	61
4.7. MÉTODO DE LA AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDADA (ABC): Fundamento teórico.....	65
4.8. MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA: Fundamento teórico.....	68
4.9. MÉTODO DE INMUNO-ORO INTENSIFICADO CON PLATA PREINCLUSIÓN: Fundamento teórico.....	69
4.10. RESUMEN DE LOS PROTOCOLOS DE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DESARROLLADAS	72
4.10.1. Pasos de la técnica de la avidina-biotina peroxidada (ABC) para microscopía óptica.....	72
4.10.2. Pasos del método de la inmunofluorescencia.....	73
4.10.3. Pasos del método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión.....	73
4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75
4.11.1. Implicación del SEC en el desarrollo neuronal postnatal.....	75
4.11.2. Cambios morfológicos ultraestructurales en ausencia del receptor CB_1	77
RESULTADOS	83
5.1. MICROSCOPIA CONVENCIONAL.....	85
5.1.1. Patrón de expresión de CB_1 en la corteza cerebelosa de la rata.....	85
5.1.2. Patrón de expresión de DAGL- α en la corteza cerebelosa de la rata.....	87
5.1.3. Patrón de expresión de MAGL en la corteza cerebelosa de la rata.....	88
5.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	90
5.2.1. Localización del SEC en el desarrollo neuronal postnatal.....	90

5.2.1.1. Análisis del patrón de distribución subcelular del receptor cannabinoide CB ₁	90
5.2.2.2. Análisis del patrón de distribución subcelular del enzima de síntesis del 2-AG, el diacilglicerol lipasa-alfa (DAGL- α)	96
5.2.2.3. Análisis del patrón de distribución subcelular del enzima de degradación del 2-AG, el monoacilglicerol lipasa (MAGL).....	102
5.3. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	112
5.4. EFECTO DE LA AUSENCIA DEL RECEPTOR CB₁ EN LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LAS FIBRAS PARALELAS	116
DISCUSIÓN	137
6.1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL RECEPTOR CB₁ Y DE LOS ENZIMAS DAGL-α y MAGL	139
6.1.1. Localización del receptor cannabinoide CB ₁ en los compartimentos axónicos de las células granulares de la corteza cerebelosa postnatal.....	139
6.1.2. Localización de diacilglicerol lipasa-alfa (DAGL- α)	142
6.1.3. Localización de monoacilglicerol lipasa (MAGL).....	144
6.1.4. Descripción conjunta de los componentes del SEC en el desarrollo de la corteza cerebelosa postnatal	146
6.1.4.1. Esquema final de la localización de los componentes del SEC en el desarrollo postnatal de la corteza cerebelosa.....	150
6.1.5. Interacción del SEC con otros sistemas durante el desarrollo cerebeloso postnatal.....	151
6.2. CAMBIOS MORFOLÓGICOS ULTRAESTRUCTURALES EN AUSENCIA DEL RECEPTOR CB₁	156
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	173

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
Abh4	Alfa/beta-hidrolasa 4
ABHD12	α,β -hidrolasa-12
ABHD6	α,β -hidrolasa-6
AC	Adenilato ciclasa
AD	Adulto
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AEA	Anandamida o araquidonoiletanolamida
AI	Agonista Inverso
AMPAR	Receptor ionotrópico de glutamato α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro, del inglés <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	Albúmina de suero bovino, del inglés <i>bovine serum albumine</i>
CAM	Moléculas de adhesión celular, del inglés <i>cell adhesion molecule</i>
CB₂	Receptor cannabinoide tipo 2
CCP	Capa de las células de Purkinje
CG	Célula granular
CGE	Capa granular externa
CGI	Capa granular interna
CM	Capa molecular
CP	Célula de Purkinje
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DCP	Dendrita de la célula de Purkinje
delta⁹-THC	Delta ⁹ -tetrahidrocannabinol

Den	Dendrita
DSE	Supresión de la excitación inducida por despolarización, del inglés <i>depolarization-induced suppression of excitation</i>
DSI	Supresión de la inhibición mediada por despolarización, del inglés <i>depolarization-induced suppression of inhibition</i>
eCB	Endocannabinoide o cannabinoide endógeno
EEM	Error estándar de la media
Esp	Espina
FAAH	Amido hidrolasa de ácidos grasos, del inglés <i>Fatty acid amide hydrolase</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés <i>fibroblast growth factor</i>
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2, del inglés <i>fibroblast growth factor 2</i>
FP	Fibra paralela
FT	Fibra trepadora
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GB	Glía de Bergmann
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G, del inglés, <i>G protein-coupled receptor</i>
GTPasas RhoA	Guanosina trifosfatasa RhoA
In	Terminal inhibidora
KO	Knock-out
LTD	Depresión a largo plazo, del inglés <i>long-term depression</i>
LTP	Potenciación a largo plazo, del inglés <i>long-term potentiation</i>
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos, del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
mGluR	Receptor metabotrópico del glutamato, del inglés <i>metabotropic glutamate receptor</i>
mGluR1	Receptor metabotrópico del glutamato tipo I

NAPE-PLD	Fosfolipasa D de la N-araquidonil-fosfatidiletanolamina
N-ArPE	N-araquidonoilfosfatidiletanolamina
NAT	N-aciltransferasa
NCS	Suero de ternera, del inglés, <i>Newborn Calf Serum</i>
NMDA	Receptor ionotrópico de glutamato N-metil-D-aspartato
NT	Neurotrofina
OI	Oliva Inferior
PCG	Células precursoras de las células granulares
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKA	Proteína quinasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLCγ	Fosfolipasa C gamma
PLCβ4	Fosfolipasa C beta 4
PTPN22	Proteína tirosina fosfatasa
RCB₁/CB₁	Receptor cannabinoide tipo 1
RFGF	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
SB	Sustancia Blanca
SEC	Sistema endocannabinoide
SHIP1	Inositol polifosfato-5-fosfatasa
SNAP25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
Som	Soma
SRE	Supresión retrógrada mediada por endocannabinoide
SSE	Supresión de la excitación evocada sinápticamente, del inglés <i>synaptically evoked suppression of excitation</i>
TA	Temperatura ambiente
TF	Tampón fosfato
TFP	Terminal de la fibra paralela

TFS	Tampón fosfato salino
TrkB	Receptor tirosina quinasa B, del inglés <i>tyrosine protein kinase B</i>
TrKC	Receptor tirosina quinasa C, del inglés <i>tyrosine protein kinase C</i>
TTS	Tampón salino Tris-HCl
vr_ax	Varicosidad_axón
VS	Vesículas sinápticas
WT	Ratones C57 silvestres, del inglés <i>wild-type</i>

RESUMEN

La corteza cerebelosa se desarrolla durante las tres primeras semanas postnatales, periodo durante el cual experimenta cambios morfológicos. La capa más externa de dicha corteza, la capa granular externa (CGE) desaparece a medida que los somas de las células granulares (CG) van enriqueciendo la capa definitiva, la capa granular interna (CGI). A su vez, la capa molecular (CM) se extiende hasta la superficie pial. Estos cambios morfológicos que experimenta la corteza cerebelosa, son atribuidos a los distintos procesos de maduración que acontecen durante este periodo postnatal. La morfogénesis de las CG en concreto, tiene lugar postnatalmente e implica todos aquellos procesos del desarrollo, como son la proliferación, diferenciación (neuritogénesis y polarización), crecimiento neurítico, la migración y la sinaptogénesis de las terminales de las fibras paralelas (TFP) con las espinas dendríticas de las células de Purkinje (CP) en la CM.

En los últimos años se ha descubierto que el sistema endocannabinoide (SEC), además de ejercer su acción como sistema modulador de la neurotransmisión, juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso. Se conoce que el receptor cannabinoide tipo 1 (CB₁) está presente en la corteza cerebelosa a P14 y los enzimas DAGL- α y MAGL de síntesis y degradación del 2-AG, respectivamente, están por lo menos a P10 y a P12, respectivamente; sin embargo, se desconoce qué ocurre en estadios más tempranos del cerebelo intacto donde pensamos que CB₁, DAGL- α y MAGL podrían sufrir modificaciones en su localización relacionadas con los diferentes mecanismos que subyacen a la maduración de la corteza cerebelosa.

Con objeto de determinar la distribución y la localización precisa de CB₁, DAGL- α y MAGL a las edades postnatales 0 (P0), P5, P12, P21 y en la rata adulta (AD), llevamos a cabo técnicas inmunohistoquímicas para microscopía de luz y el método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Nuestros resultados demuestran que el receptor de cannabinoides CB₁ y los enzimas de síntesis (DAGL- α) y degradación (MAGL) del 2-AG, están presentes en el compartimento axónico de las CG en la CGE como en la CM en los días postnatales 0 (P0), P5 y P12. En la CGE, están presentes tanto en las regiones subpiales como en las inmediaciones de la CM, lo que

indica que dichas moléculas están presentes en las diferentes fases en las que se encuentran los procesos axónicos de las CG. El receptor, presenta una localización preferentemente de membrana y mantiene sus niveles constantes en el desarrollo. Los enzimas, por su parte, se localizan en las inmediaciones de la membrana, y el MAGL está, además, localizado también a nivel citoplasmático. Ambos enzimas aumentan con el desarrollo en la CGE. En cuanto a la CM, CB₁ resulta incrementado en las varicosidades y axones de las FP con la edad para localizarse en su posición presináptica final sobre la membrana de las TFP cuando éstas establecen sinapsis con las espinas dendríticas de las CP. Por el contrario, el DAGL- α tiene una mayor presencia en el nacimiento (P0) en estos perfiles, empezando a expresarse postsinápticamente en las dendritas y espinas dendríticas de las CP una vez concluida la sinaptogénesis. La presencia del MAGL en las varicosidades y axones de las FP, por su parte, crece durante el desarrollo postnatal temprano y a partir de dicho periodo, desaparece prácticamente de estos perfiles para localizarse casi con exclusividad en el interior de las TFP, en el AD. Estos datos, en su conjunto, muestran que el receptor CB₁ y los enzimas de síntesis (DAGL- α) y degradación (MAGL) del 2-AG, si bien comparten compartimento neuronal, su distribución y localización difiere en cada una de las fases por las que pasan los procesos axónicos en desarrollo de las CG. Además, hemos evidenciado que estos tres integrantes del SEC muestran un cambio topográfico desde el nacimiento hasta la edad adulta, en paralelo al requerimiento funcional del sistema, al desarrollo neuronal inicial y, finalmente, a la neurotransmisión.

Por otro lado, teniendo en cuenta la participación del SEC, y en concreto del receptor CB₁ en los procesos del desarrollo, quisimos determinar si la ausencia del mismo podría tener algún impacto en las características fenotípicas típicas de las TFP en los animales adultos que carecen del gen para el receptor CB₁. Debido a la falta de estudios anatómicos exhaustivos al respecto, desarrollamos el análisis detallado de diversos parámetros ultraestructurales mediante microscopía electrónica atendiendo a las sinapsis que establecen las TFP sobre las espinas dendríticas de las CP. Centramos el estudio en los lóbulos 5 y 10 de las secciones vermales de los ratones adultos CB₁-WT y CB₁-KO ya que

ambos lóbulos muestran una distinta sensibilidad al daño en situaciones patológicas y, por lo tanto, la ausencia de CB₁ podría tener consecuencias diferentes.

Nuestros resultados demuestran que existen diferencias evidentes, centradas principalmente en la sinapsis y el elemento presináptico, ya que medimos el área del elemento postsináptico directo de las TFP, es decir, las espinas de las CP y éstas permanecen sin cambios en todos los casos estudiados. En el ratón silvestre para CB₁ (CB₁-WT) existen diferencias significativas en la arquitectura anatómica presináptica de las TFP correspondientes a los lóbulos 5 y 10. Las TFP del lóbulo 10 establecen un menor número de contactos sinápticos con las espinas dendríticas de las CP y tienen sinapsis más largas. Asimismo, en el lóbulo 10 el tamaño de las TFP es mayor y aunque el número de vesículas no varía, las vesículas sinápticas están más dispersas que en las TFP del lóbulo 5. En los CB₁-KO, el lóbulo 5 presenta un número de sinapsis significativamente menor y más largas que el correspondiente al animal WT. Esta diferencia, sin embargo, no existe en el lóbulo 10. Las TFP de los animales KO presentan un mayor tamaño en comparación a las del WT, siendo más notable la diferencia en el lóbulo 10. También hemos demostrado que las terminales del lóbulo 5 de CB₁-KO contienen un menor número de vesículas que las del WT. La densidad de vesículas en las inmediaciones de la sinapsis pone de manifiesto las diferencias existentes entre los animales WT y KO, habiendo densidades significativamente menores en ambos lóbulos. Asimismo, la dispersión de vesículas es diferente en el animal WT y KO. Mientras que en el lóbulo 10 el menor número de vesículas se hace evidente desde las inmediaciones de la sinapsis, éste mantiene el mismo patrón lineal que en el WT. En el lóbulo 5, no obstante, el número de vesículas, aunque presentes también en las inmediaciones de la zona activa, disminuye drásticamente a partir de los 30nm de distancia desde la sinapsis. Pensamos que el sistema intenta compensar la carencia de CB₁ sobre todo en el lóbulo 5, ampliando el área de la terminal y disminuyendo la densidad vesicular en las inmediaciones de la sinapsis. Creemos que estos cambios morfológicos que se observan en el circuito cerebeloso, ponen de relieve mecanismos

adaptativos que adquiere el circuito cerebeloso a fin de mantener un sistema funcionalmente eficiente.

El conjunto de nuestros resultados aporta una evidencia morfológica tangible de la participación del SEC en los procesos del desarrollo neuronal postnatal temprano de la corteza cerebelosa así como la ausencia del receptor de cannabinoides CB₁ en las fibras paralelas (FP) tiene consecuencias en la arquitectura presináptica de las sinapsis TFP-CP. Se demuestra además, que la distinta sensibilidad descrita para las divisiones cerebelosas estudiadas tiene una base anatómica ultraestructural.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema endocannabinoide (SEC) es uno de los sistemas reguladores más ubícuos del sistema nervioso central (SNC) (*Fride, 2005; Chevalleyre y cols., 2006*). Está formado por los receptores de cannabinoides, sus ligandos endógenos o endocannabinoides (eCBs) y las proteínas involucradas en su síntesis y degradación, así como las vías de señalización intracelulares reguladas por los eCBs (*De Petrocellis y cols., 2004*).

Se ha descrito su participación en una amplia variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la nocicepción, control motor, memoria y aprendizaje, miedo y ansiedad, apetito, ingesta y balance energético (*Di Marzo y cols., 1998; Ameri, 1999; Pagotto y cols., 2006*). Otras funciones fisiológicas del SEC están relacionadas con la regulación endocrina, respuestas vasculares, modulación del sistema inmune, neuroprotección y remodelación ósea (*Correa y cols., 2005; Idris y cols., 2005; van der Stelt y Di Marzo, 2005b; Arenos y cols., 2006; de Oliveira y cols., 2006; Guindon y cols., 2006; Mikics y cols., 2006; Wang y cols., 2006b*). El espectro de las acciones fisiológicas de los cannabinoides ha aumentado de forma espectacular en los últimos años y podría decirse que el SEC es un sistema modulador que influye en los tres sistemas esenciales de regulación fisiológica: el sistema neurotransmisor, el sistema endocrino y el sistema inmune (*Díaz-Laviada, 2009*).

En cuanto a la regulación de la plasticidad neuronal, una de las acciones mejor establecidas de los cannabinoides es la atenuación de la neurotransmisión. Así, la activación de los receptores de cannabinoides en la neurona presináptica produce una inhibición, a corto y a largo plazo (*Carey y cols., 2011*), en diferentes regiones del cerebro, de la liberación de neurotransmisores excitadores e inhibidores como glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), serotonina, noradrenalina, dopamina o acetilcolina. Aunque aún quedan algunas cuestiones por esclarecer, éste sería el mecanismo por el cual el SEC regularía la plasticidad neuronal produciendo los efectos fisiológicos conocidos sobre la memoria, el aprendizaje, procesos de recompensa (*Solinas y cols., 2008*), funciones motoras, respuesta al dolor y control del apetito (*Matias y cols., 2006*).

En los últimos años se ha descubierto que el SEC juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso. En ese sentido, se ha visto que interviene en la regulación de la proliferación de neuronas progenitoras (*Aguado y cols., 2006*), la neurogénesis (*Berghuis y cols., 2007; de Salas-Quiroga y cols., 2015*), la neuritogénesis (*Gaffuri y cols., 2012*), crecimiento y guía axónicos (*Williams y cols., 2003*) así como en la migración neuronal (*Zhou y cols., 2015*) y la sinaptogénesis (*Fernandez-Ruiz y cols., 2000; Berghuis y cols., 2005; Keimpema y cols., 2011*). Todos estos procesos son cruciales para la adquisición de la complejidad citoarquitectónica y de conexiones que posee el SNC (*Zhou y cols., 2015*).

El SEC está presente en el cerebelo en etapas tempranas del desarrollo embrionario y postnatal y también en el animal adulto. Los cambios morfológicos que sufre durante el desarrollo postnatal, hacen que sea un modelo ideal para el estudio del desarrollo neuronal, como explicaremos más adelante. Así, en los últimos años, diversos estudios han empleado neuronas del cerebelo en cultivo para investigar los procesos que median el desarrollo neuronal y la posible implicación que el SEC podría jugar en dichos procesos. Sin embargo, no existen estudios morfológicos exhaustivos que analicen la localización de los diferentes componentes del SEC en las neuronas del cerebelo postnatal que están sufriendo cambios morfológicos sustanciales.

La corteza cerebelosa ofrece múltiples ventajas para nuestro estudio. Es una región cuya citoarquitectura y conexiones se conocen con gran detalle. Esto es debido en primer lugar, al gran número de investigaciones realizadas al respecto y en segundo lugar, al carácter repetitivo de su organización citoarquitectónica constituida en módulos funcionales. Este hecho, ha atraído el interés desde hace mucho como modelo en estudios electrofisiológicos. Otra ventaja que ofrece la corteza cerebelosa, es el desarrollo que experimenta postnatalmente, con lo que se evita el empleo de animales en fase embrionaria, hecho que facilita la obtención de tejido de calidad a nivel ultraestructural. De hecho, el cerebelo no adquiere su morfología adulta hasta el día postnatal 30 (P30) en la rata (*Biran y cols., 2012*) o hasta los 7 meses postnatales en el caso del humano

(*Sidman y Rakic, 1973*). Es, además, una región donde el SEC está presente tanto en etapas tempranas como en el adulto, ofreciendo la oportunidad de comparar la localización que muestra el sistema cuando ejerce funciones diferentes: el desarrollo neuronal y la neurotransmisión.

Todo ello en conjunto, nos ha llevado a centrar este proyecto de Tesis Doctoral en el análisis exhaustivo del SEC en el cerebelo postnatal y adulto, así como en la investigación de la forma en la que afecta la ausencia del receptor cannabinoide principal del SEC en las conexiones del cerebelo.

1.1. EL CEREBELO

El cerebelo (del latín *cerebellum*, *cerebro pequeño*) es un centro nervioso impar que surge de los labios rómbicos del metencéfalo y ocupa la mayor parte de la fosa craneal posterior formando el techo del IV ventrículo. Dicha estructura cerebral, integra múltiples formas de información sensorial y juega un papel crítico en la coordinación motora y el aprendizaje motor (*Thach y cols., 1992; Ito, 2000; Boyden y cols., 2004; Bastian, 2006; Krakauer y Shadmehr, 2006*). Interviene en los sistemas motores descendentes mediante la evaluación de las discrepancias entre la intención y la acción de los movimientos. Además, diversos estudios reportan su contribución en ciertas funciones no-motoras como cognición, emoción y comportamiento (*Schmahmann, 2004; Timmann y Daum, 2007; Ito, 2008; Sacchetti y cols., 2009; Timmann y cols., 2010; Strata y cols., 2011*).

El cerebelo está conectado con el tronco del encéfalo por medio de tres robustos pares de haces de fibras, denominados pedúnculos cerebelosos inferior, medio y superior, que unen el cerebelo al bulbo raquídeo, puente y mesencéfalo, respectivamente. En su morfología externa presenta una porción central e impar, el vermis, y otras dos porciones mayores en tamaño que se extienden a ambos lados, los hemisferios. Su morfología

interna, por su parte, presenta una corteza compuesta de sustancia gris externa y una zona interna de sustancia blanca donde están inmersos los núcleos profundos cerebelosos.

Me voy a ceñir a la descripción de la corteza cerebelosa, ya que el trabajo de la presente Tesis Doctoral está centrado en dicha región.

1.1.1. Neuroanatomía de la corteza cerebelosa madura

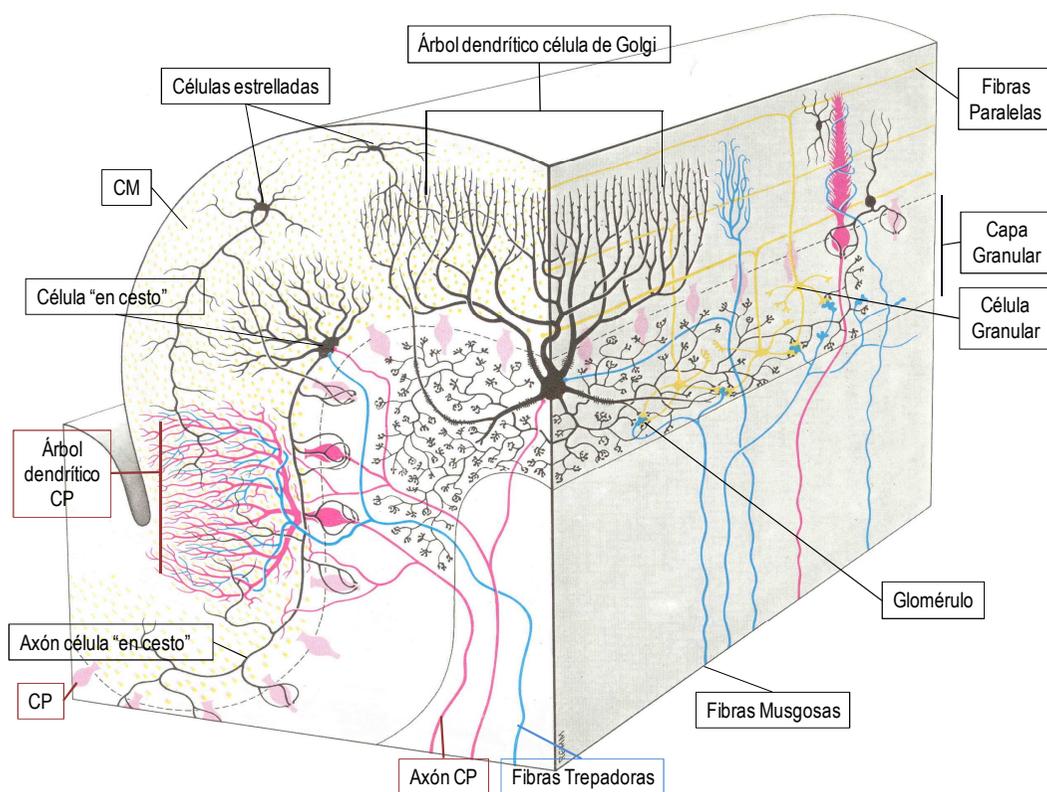


Figura 1. Esquema neuroanatómico de la corteza cerebelosa madura en un corte parasagital y transversal. CP, célula de Purkinje; CM, capa molecular. *Grays Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice (40 th edition).*

La corteza cerebelosa tiene una superficie muy extensa gracias a los numerosos pliegues y circunvoluciones, predominantemente transversales, que aumentan su área. Está formada por multitud de unidades histofuncionales conocidas como laminillas cerebelosas que están constituidas por una fina lámina de sustancia blanca recubierta de sustancia gris. La sustancia gris posee una estructura histológica homogénea en todas sus regiones, constituida por tres capas en las que se distinguen diversos tipos de neuronas.

1.1.1.1. Capas de la corteza cerebelosa madura y los principales tipos neuronales que las constituyen

En la corteza cerebelosa se distinguen tres capas que de superficial a profunda son: la capa molecular, la capa intermedia o de las células de Purkinje y la capa granular.

Capa molecular

La CM consta principalmente de prolongaciones celulares y pocos somas neuronales. En ella, se arborizan las dendritas de las CP (en una disposición ortogonal al eje longitudinal de la laminilla), así como las dendritas de las células de Golgi (aunque sus somas se localizan en la capa de los granos). Las células estrelladas y las células en cesto presentes en dicha capa, son interneuronas inhibitorias, que utilizan el GABA como neurotransmisor. En esta capa se encuentran también los axones bifurcados de las CG glutamatérgicas, las FP, que siguen el eje longitudinal de la laminilla. Las fibras trepadoras (FT) procedentes de la oliva bulbar terminan, del mismo modo, en esta CM siguiendo las ramificaciones de las dendritas de cada CP.

Capa intermedia o de las células de Purkinje

La capa intermedia se sitúa entre la CM y la de los granos. Está formada por los somas de gran tamaño de las CP. Son células GABAérgicas inhibitorias dispuestas en monocapa que comprenden la única eferencia de la corteza cerebelosa. Su axón se dirige,

a través de la capa de los granos, hacia la sustancia blanca hasta alcanzar los núcleos profundos cerebelosos, o en su caso, los núcleos vestibulares.

Capa granular

La capa granular o de los granos es la más profunda de las capas de la corteza cerebelosa y limita en su zona interna con la sustancia blanca. Se localiza inmediatamente por debajo de los somas de las CP. La constituyen principalmente las CG, que son interneuronas glutamatérgicas de carácter excitador. Cabe destacar, que la presencia de interneuronas excitadoras es muy infrecuente en el sistema nervioso y es característica de la corteza cerebelosa. Poseen un soma redondeado y dendritas cortas, cuyas terminaciones denominadas “en garra” forman parte de unas especializaciones sinápticas características de esta capa llamadas glomérulos. El axón de dichas células, las FP, transmiten la información de una de las dos principales aferencias de la corteza cerebelosa, las fibras musgosas, a la CM.

Asimismo, se localizan otras células como las células de Golgi que son GABAérgicas y, por lo tanto, de carácter inhibitor. Constan de un soma de gran tamaño y sus dendritas se extienden en la CM y, en menor medida, por la capa granular y su axón, que se ramifica profusamente, entra a formar parte de los glomérulos de la capa granular donde establece contactos sinápticos sobre las dendritas de los granos.

Por otro lado, de entre las distintas células gliales presentes en la corteza cerebelosa, son destacables los astrocitos protoplásmicos unipolares, de las cuales la más característica es la glía de Bergmann (GB). Los cuerpos celulares de dichas células se localizan entre las CP desde donde parten de dos a tres prolongaciones con gruesas excrescencias protoplásmicas que se extienden por toda la CM y alcanzan la piamadre. Una vez alcanzada la piamadre, se adosan a ella mediante unos ensanchamientos que forman la capa limitante de Cajal.

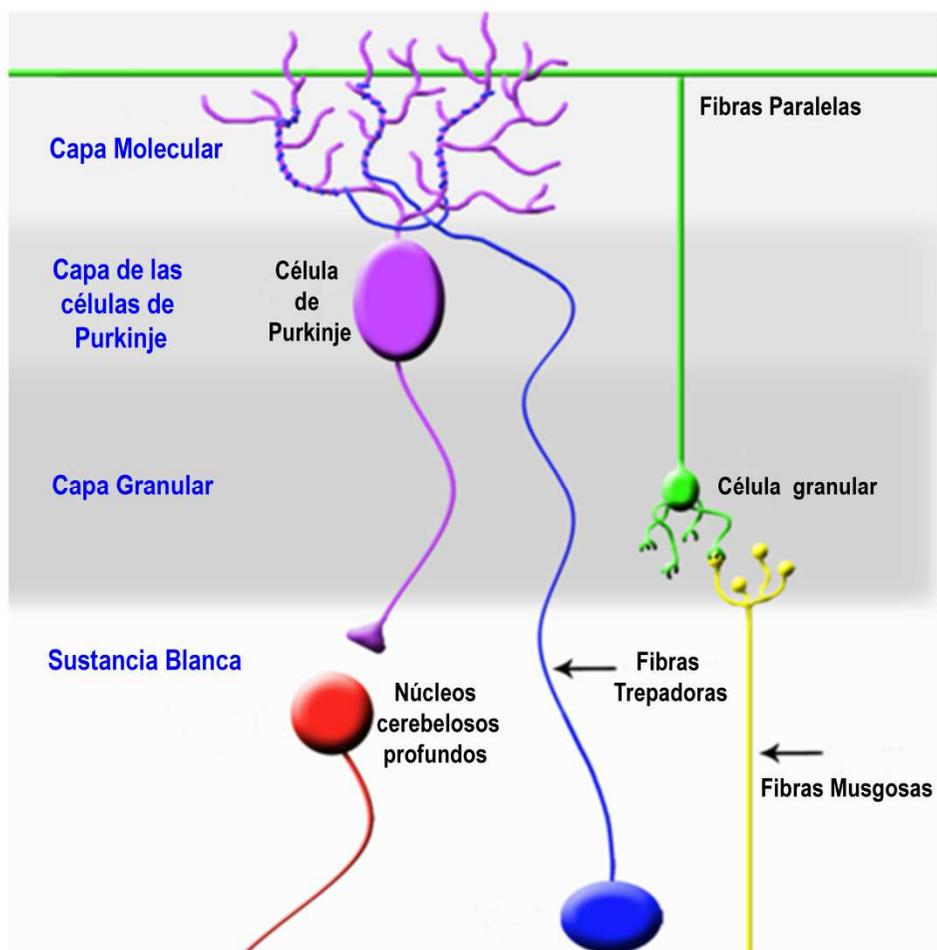


Figura 2: Esquema ilustrativo de las dos principales aferencias de la corteza cerebelosa y sus principales conexiones neuronales. Modificado de Stacey L. Reeber y colaboradores; *Frontiers in systems neuroscience*, 2013.

Para un correcto funcionamiento del cerebelo es necesaria una integración de los circuitos cerebelosos a nivel de la corteza cerebelosa, así como una correcta proyección hacia los núcleos profundos del cerebelo.

1.1.2. Circuitos cerebelosos

En conjunto, las conexiones neuronales del cerebelo se pueden dividir en: axones aferentes, que transmiten al cerebelo información de diferentes regiones extracerebelosas; circuitos cerebelosos intrínsecos corticales y nucleares que integran y procesan la información y axones eferentes que transmiten la información procesada a distintas regiones del SNC.

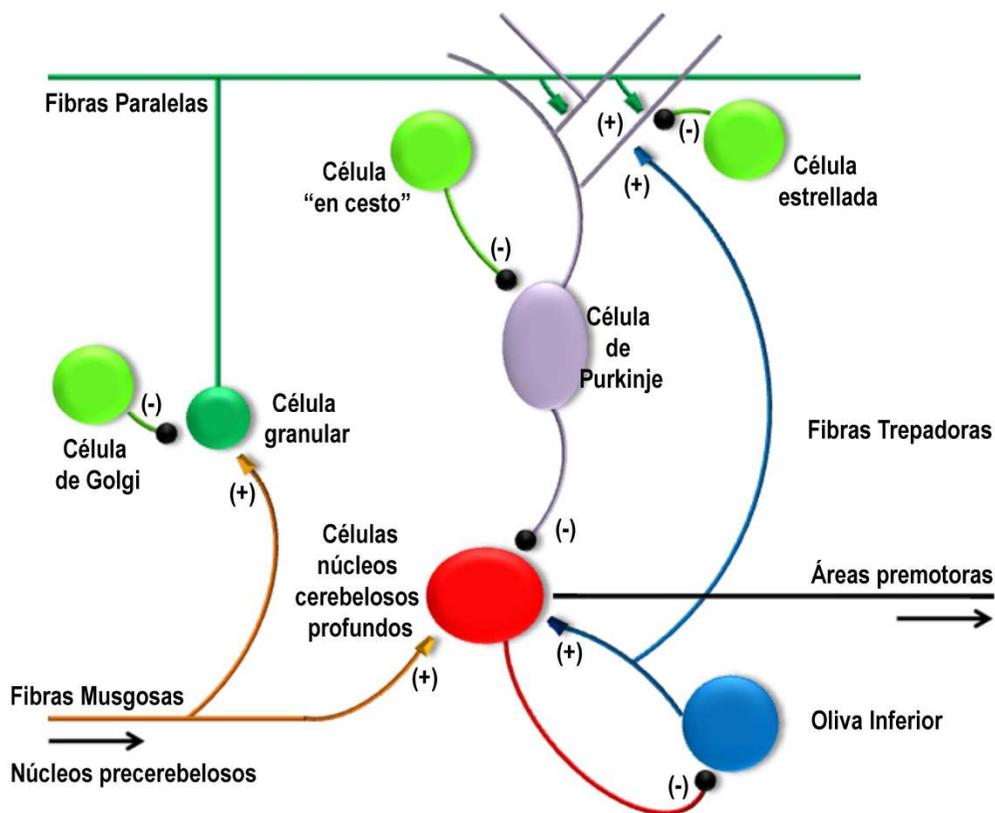


Figura 3: Esquema ilustrativo de los circuitos cerebelosos excitadores e inhibidores.

Circuitos excitadores: Las CP son estimuladas directamente por las FT e indirectamente por las fibras musgosas. Las fibras musgosas, que proceden de diferentes regiones extracerebelosas, actúan sobre las CP a través de las sinapsis que establecen con las dendritas de las CG, a nivel del glomérulo cerebeloso; así, los impulsos se transmiten por

las FP hasta alcanzar las espinas dendríticas de las CP. Las FT, por su parte, provienen de la oliva inferior contralateral. Ambos aferentes emiten colaterales excitadoras a las células de los núcleos profundos.

Circuitos inhibidores: los constituyen los 3 tipos de interneuronas GABAérgicas: las células de Golgi, las células en cesto y las células estrelladas. Las células en cesto y las estrelladas actúan directamente sobre las CP y las células de Golgi, a través de las CG. Las FP ya estimuladas por las fibras musgosas, estimulan las células en cesto y las estrelladas y modulan así la activación de las CP por las FP, dando lugar a una inhibición lateral. Las células de Golgi estimuladas por las FP, actúan a nivel del glomérulo cerebeloso donde sinaptan sobre las dendritas de las CG, inhibiéndolas; así, modulan la activación de las CG por las fibras musgosas y por consiguiente, la actividad de las CP. Finalmente, las CP proyectan sus axones de carácter inhibitorio hacia las células de los núcleos cerebelosos profundos, los cuales, a su vez, proyectan hacia regiones con influencia motora ascendente y descendente.

1.2. DESARROLLO DEL SNC

Las neuronas recién generadas sufren diversos eventos estereotípicos del desarrollo a fin de integrarse en los circuitos neuronales. Así, tras su salida del ciclo celular las neuronas postmitóticas, en primer lugar, se polarizan axo-dendríticamente; este proceso conlleva la neuritogénesis y un crecimiento coordinado que conduce a una única forma neuronal.

Muchas neuronas experimentan una migración extensa antes de alcanzar su destino final en el cerebro. Los axones crecen hacia sus dianas apropiadas, las dendritas se arborizan y se eliminan con objeto de cubrir las demandas de sus campos receptivos. Se forman y se refinan las sinapsis para asegurar una conectividad correcta. Dichos procesos son regulados por señales extrínsecas como la secreción de factores de crecimiento, moléculas de adhesión, componentes de la matriz extracelular y la actividad neuronal (*Katz y Shatz, 1996; Tessier Lavigne y Goodman, 1996; Markus y cols., 2002a;*

McAllister, 2002; Huber y cols., 2003; Dijkhuizen y Ghosh, 2005b). Por otro lado, mecanismos celulares intrínsecos juegan también un papel en la morfogénesis y conectividad neuronal. Estos últimos, constan de vías inherentes al desarrollo que operan principalmente de manera independiente del entorno celular. Las neuronas heredan programas de desarrollo distintos que dictan sus respuestas a las señales extrínsecas. Todos estos mecanismos operan en conjunto con el objeto final de que se establezcan las conexiones precisas.

En el caso del cerebelo los procesos del desarrollo neuronal no finalizan en el periodo embrionario sino que continúan en el periodo postnatal.

1.2.1. Desarrollo cerebeloso postnatal

El desarrollo postnatal que acontece en el cerebelo ofrece un modelo excepcional para el estudio de procesos tales como el crecimiento y la migración neuronal (*Ramón y Cajal, 1911; Uzman, 1960; Miale y Sidman, 1961; Mugnaini y Forstronen, 1967; Rakic, 1971; Quesada y Genis-Galvez, 1983; O'Donoghue y cols., 1987; Ono y cols., 1997; Sotelo 2004*).

Las células en el cerebelo surgen desde 2 matrices germinales distintas, el epitelio ventricular desde donde surgen los núcleos cerebelosos profundos, las CP, las células de Golgi, las células estrelladas y las células en cesto y el labio rómbico. En la rata, aproximadamente entre los días 10 y 12 del desarrollo embrionario (a ~E10-E12), los núcleos cerebelosos profundos y los núcleos vestibulares abandonan la zona ventricular. Alrededor de E13, nacen las células precursoras de las CP. Poco después de la mitosis final, los somas migran durante E14-E17 a lo largo de las fibras radiales gliales desde los ya formados núcleos profundos dentro del primordio cerebeloso y, también a esta edad, comienzan a expresar la calbindina (*Swinny y cols., 2005*). La formación de la segunda matriz germinativa desde el labio rómbico, la CGE, ocurre cuando las células nucleares y las CP han dejado de dividirse.

Las neuronas cerebelosas, se generan en 2 neuroepitelios germinativos, en dos oleadas de procesos de proliferación y migración (*Biran y cols., 2012*). Durante el periodo embrionario son generados los primeros precursores de las CG. Éstos, migran tangencialmente como precursores de las CG para cubrir la zona superficial del cerebelo formando la CGE (*Sotelo 2004; Swinny y cols., 2005*). La región más externa de la CGE es proliferativa, mientras que la más interna es premigratoria (*Miyasaki y cols., 2003*). Postnatalmente, la CGE va a enriquecer la CGI con abundantes CG. También en este momento, se generan las células estrelladas y las células en cesto que colonizan la CM (*Swinny y cols., 2005*). Al contrario de las células de la CGE que migran sobre la superficie cerebelosa en posición subpial, las células de Golgi nacen desde la zona subventricular en desaparición.

La mayoría de los programas del desarrollo postnatal del cerebelo culminan más tarde en la rata que en el ratón. Un ejemplo representativo de este hecho es que el patrón de foliación que ocurre postnatalmente se elabora más tardíamente en la rata que en el ratón; 3 semanas y 2 semanas, respectivamente (*Corrales y cols., 2006*). Asimismo, existen estudios que reportan que la translocación somatodendrítica de las FT comienza a P10 en rata y se completa casi totalmente a P16 (*Chedotal y Sotelo, 1992*), mientras que en ratón su duración se extiende hasta P21 (*Sotelo, 2008*). A pesar de las diferencias entre ratón y rata, las *formaciones pinceaux* se desarrollan simultáneamente en ambas especies (*Yan y Ribak, 1998; Rosina y cols., 1999; Ango y cols., 2004; Luján y cols., 2005; Takayama e Inoue, 2005; Sotelo, 2008*).

Las CG del cerebelo han sido utilizadas en numerosos trabajos para el estudio de la neurogénesis debido, en primer lugar, al gran número de CG que hay en el cerebelo y a la existencia de métodos para la obtención de una población homogénea para cultivo celular (*Bilimoria y Bonni, 2008*). Parece ser que las instrucciones básicas para la formación de las neuronas granulares están codificadas intrínsecamente. Esto difiere de las CP que se polarizan y extienden sus axones pero requieren señales de las CG para la formación correcta de sus dendritas y espinas dendríticas (*Baptista y cols., 1994*).

Las células granulares generadas `de novo` tras la división de los progenitores localizados en la CGE, extienden primero un proceso horizontal único a lo largo de la CGE. En segundo lugar, se genera un polo opuesto en la neurona adquiriendo una morfología bipolar. Estos procesos continúan creciendo hasta que las neuronas generan un tercer proceso perpendicular a los procesos anteriores que dirige la migración radial del soma hacia la CGI. El soma migra hacia la profundidad de la corteza cerebelosa y los dos procesos de la CM se fusionan mientras las neuronas continúan extendiendo su proceso perpendicular. La intersección de estos procesos ortogonalmente orientados proporciona los característicos axones de las FP de las neuronas granulares en forma de "T" (*De la Torre-Ubieta y Azad Bonni, 2011*). La expansión descendente de estas neuronas mantiene un contacto íntimo e interacciones de membrana con las fibras verticalmente orientadas de la GB: sus ejes migratorios (*Rakic, 1971; 1981; 1985a,b*). Estos procesos de polarización, crecimiento axónico y migración radial, acontecen desde P1 hasta P12, aproximadamente (*De la Torre-Ubieta y Azad Bonni, 2011*). En la CM, el establecimiento de las sinapsis de los axones de las CG, las FP, es simultáneo a la dendritogénesis final de las CP. Además, la contribución de las FP y las FT, son esenciales para la formación de los árboles dendríticos de las CP (*Baptista y cols., 1994; De la Torre-Ubieta y Azad Bonni, 2011*). Cabe destacar que, una vez las CG alcanzan la CGI, comienzan a extender sus dendritas, las cuales se refinan y forman el sitio postsináptico en el glomérulo cerebeloso y generan sus características garras dendríticas (P8-P12), a lo cual sigue la eliminación y maduración de las conexiones sinápticas a partir de P12 (*Terrazas 1897 (Cajal); Ramón y Cajal, 1995; Altman y Bayer, 1997; Sotelo 2004; De la Torre-Ubieta y Azad Bonni, 2011*).

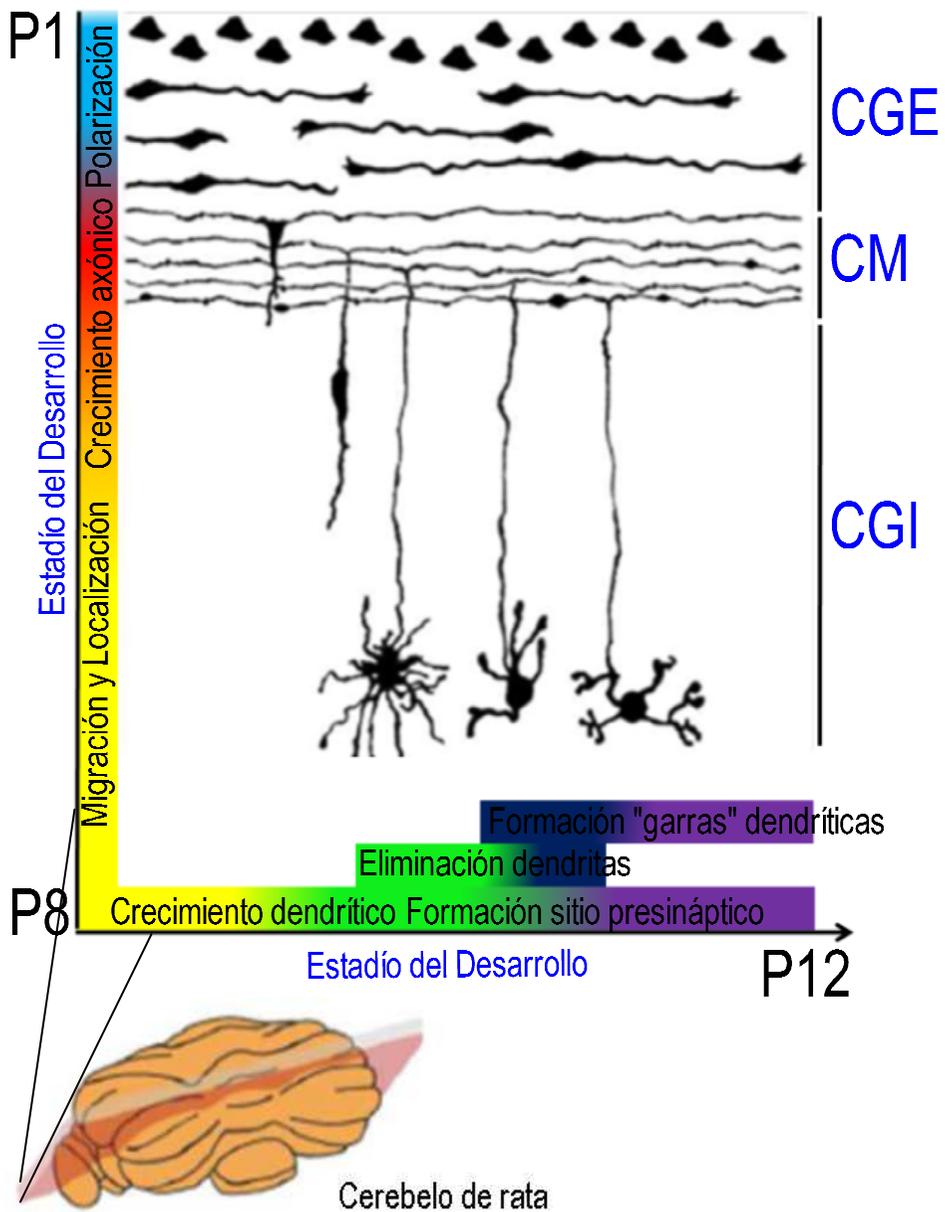


Figura 4: Esquema que ilustra los distintos estadios de la morfogénesis de las células granulares en la corteza cerebelosa de la rata postnatalmente. P1, P8, P12, días postnatales 1, 8 y 12, respectivamente; CGE, capa granular externa; CM, capa molecular; CGI, capa granular interna. Modificado de De la Torre-Ubieta y Azad Bonni; *Neuron*, 2011.

1.2.1.1. Eliminación de sinapsis redundantes durante el desarrollo postnatal

La formación precisa de los circuitos neuronales durante el desarrollo es un prerrequisito para el funcionamiento adecuado del SNC. Las conexiones neuronales son redundantes inicialmente; sin embargo, durante el desarrollo postnatal se refinan para ajustar estos circuitos iniciales a versiones maduras (*Purves y Lichtman, 1980; Katz y Shatz, 1996; Lichtman y Colman, 2000*). Así, las sinapsis funcionalmente importantes se refuerzan mientras que las superfluas tienden a desaparecer. La sinapsis de FT-CP es un ejemplo típico de este caso (*Kano y cols., 2013*).

En el cerebelo maduro, una única FT forma sinapsis sobre las dendritas proximales de las CP. De hecho, se ha demostrado la relación entre la inervación múltiple aberrante y la ataxia severa (*Goda y Davis, 2003*). Asimismo, ratones mutantes que presentan la inervación múltiple persistente en el estadio adulto muestran una LTD (depresión a largo plazo, del inglés *long-term depression*) deficiente de las FP y un aprendizaje motor dañado (*Aiba y cols., 1994; Ichise y cols., 2000; Hansel y cols., 2006; Bosman y cols., 2008*).

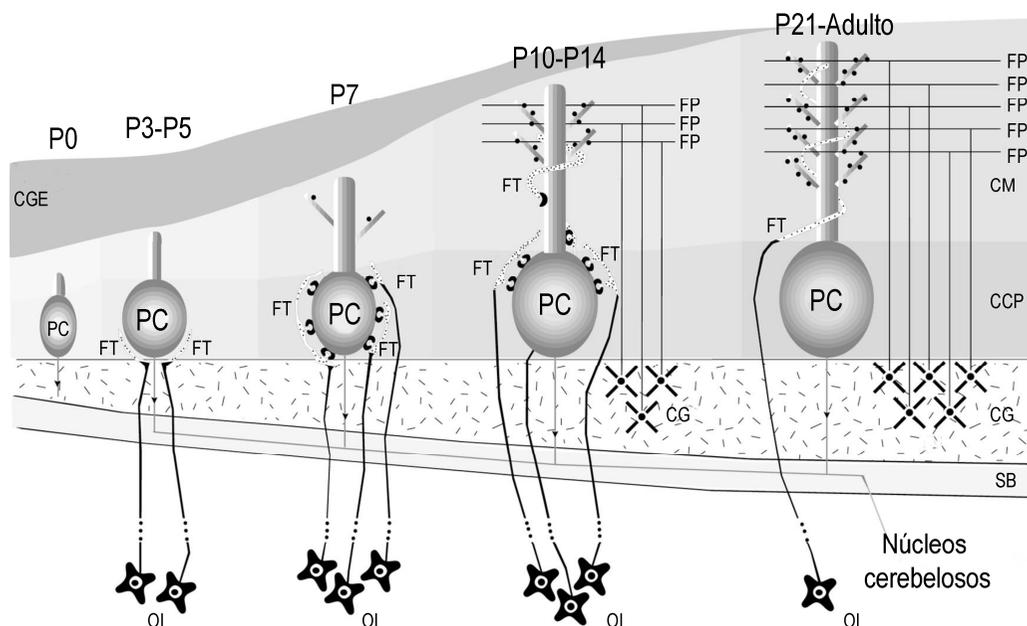


Figura 5: Esquema que ilustra el desarrollo postnatal de la corteza cerebelosa. Se representan el desarrollo del árbol dendrítico de las células de Purkinje (CP), los territorios de inervación de las fibras paralelas (FP) y las fibras trepadoras (FT) así como la eliminación de sinapsis redundantes de estas últimas. CGE, capa granular externa; CM, capa molecular; CCP, capa de las células de Purkinje; CG, células granulares en la capa granular; SB, sustancia blanca; OI, oliva inferior; P0, P3, P5, P7, P14 y P21, días postnatales 0, 3, 5, 7, 14 y 21, respectivamente. *Modificado de López-Bendito y colaboradores; Neuroscience, 2001.*

1.3. CANNABINOIDES

Aunque la aplicación terapéutica del *Cannabis Sativa* viene siendo conocida desde hace por lo menos 5000 años, la identificación de su principal componente psicoactivo, el delta⁹-tetrahidrocannabinol (delta⁹-THC), se realizó en el siglo XX. El descubrimiento del delta⁹-THC (*Gaoni y Mechoulam, 1964*) abrió la puerta a una cascada de descubrimientos que permitieron la caracterización del SEC.

Este sistema, como hemos mencionado anteriormente, lo constituyen los receptores cannabinoides transmembrana acoplados a proteínas G (receptores cannabinoides CB) y

sus correspondientes ligandos endógenos (eCBs) que son capaces de unir y activar estos receptores y las proteínas involucradas en la síntesis y degradación de los eCBs y las vías de señalización intracelulares reguladas por los mismos (*De Petrocellis y cols., 2004*).

En 1990, se aisló el transcrito para el CB₁ de la librería de ADNc del cerebro de rata y se describió como receptor acoplado a proteína G de 7 dominios transmembrana [GPCR, receptores acoplados a proteínas G, del inglés, *G protein-coupled receptor* (*Matsuda y cols., 1990*)]. Hoy en día, se sabe que el CB₁ es el receptor de tipo GPCR más abundante del cerebro (*Pagotto y cols., 2006*). Mediante la aplicación de diferentes técnicas autorradiográficas y de estudios inmunohistoquímicos, se ha descrito de forma detallada la distribución de este receptor en el cerebro de rata (*Herkenham y cols., 1990; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y cols., 1998*). Así, la mayor densidad del receptor CB₁ se encuentra en los ganglios basales, CM del cerebelo y ciertas partes del hipocampo (región CA3 del asta de Ammón y capa molecular del giro dentado). Además de su localización en el cerebro, el receptor CB₁ también está presente a nivel periférico. De esta forma, se han encontrado receptores CB₁ en el bazo, amígdalas, corazón, músculo, próstata, útero, ovario y a nivel presináptico en terminales nerviosas simpáticas (*Galieue y cols., 1995; Ishac y cols., 1996*), tejido adiposo, hígado, tracto gastrointestinal y páncreas (*Howlett y cols., 2002; Cota y Woods, 2005; Juan-Picó y cols., 2006; Pagotto y cols., 2006; Maccarrone y cols., 2014*).

Poco después, se identificó el CB₂, también éste de tipo GPCR, fue clonado desde la librería de ADNc de las células HL-60 leucemia promielocítica (*Munro y cols., 1993*). El receptor CB₂ se localiza fundamentalmente en el bazo, amígdalas y en distintas células del sistema inmune (linfocitos B, aunque también en monocitos y linfocitos T) (*Galieue y cols., 1995; Schatz y cols., 1997*). El receptor CB₂ presente en estos tejidos y células parece ser el responsable de las propiedades inmunosupresoras de la marihuana (*Klein y cols., 1998*). También podría expresarse en tejido nervioso, sobre todo tras una lesión (*Demuth y Molleman, 2006*).

La identificación, caracterización y localización de receptores de membrana específicos que median los efectos del delta⁹-THC y agonistas sintéticos del receptor CB₁ sugirió la presencia de ligandos endógenos a los que estos receptores debían de responder (*Ameri y cols., 1999*). Así pues, a partir de un extracto lipídico obtenido de cerebro de cerdo se aisló la anandamida (AEA, araquidonoiletanolamida) (*Devane y cols., 1992*) el primer eCB conocido que resultó ser una amida de ácido graso poliinsaturado, concretamente del ácido araquidónico. Posteriormente, a partir del intestino de perro y cerebro de rata se aisló el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (*Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995*), el eCB más abundante en el cerebro. En años ulteriores, han sido propuestos como eCBs adicionales (*Bisogno y cols., 2005*) el noladin éter (*Hanus y cols., 2001*), la N-araquidonoil-dopamina (*Bisogno y cols., 2000*), la virodamina (*Porter y cols., 2002*), el dihomo- γ -linolenoil etanolamida y el docosatetraenoil etanolamida (*Huang y cols., 2002*), entre otros.

Cabe destacar que, de acuerdo con el conjunto de los datos existentes hasta el momento, hay un consenso claro en que el 2-AG es el responsable de la mayoría de las funciones ejercidas por los eCBs (*Pan y cols., 2009; Straiker y cols., 2009; Alger y Kim, 2011*). Las acciones evocadas por los agonistas cannabinoides sobre el SNC, por su parte, parecen depender principalmente de la acción de receptores CB₁. El 2-AG y la AEA, los eCBs mayoritarios encontrados en el cerebro, son los eCBs mejor caracterizados. Éstos modulan la transmisión sináptica en diferentes regiones del cerebro a través de sus receptores. En los últimos años, se ha observado que a través de los receptores que activan, principalmente el CB₁, modulan cascadas de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas que regulan eventos importantes para el desarrollo tanto prenatal como postnatal.

Tras la identificación del 2-AG fueron clonadas el monoacilglicerol lipasa (MAGL), el enzima que degrada el 2-AG dando lugar a glicerol y ácido araquidónico (*Saario y Laitinen, 2007*) y dos sn-1-diacilglicerol lipasas selectivas (DAGL- α y DAGL- β), enzimas responsables de la síntesis de 2-AG (*Bisogno y cols., 2003*). Respecto a los enzimas de

síntesis, los DAGL (DAGL- α y DAGL- β) fueron caracterizados en el año 2003 (*Bisogno y cols., 2003*), se localizan en las inmediaciones de la membrana plasmática, son estimuladas por Ca^{2+} y glutatión y contienen una secuencia típica de serina lipasas (*Bisogno, 2008*). Aunque la razón de la existencia de ambas isoformas no está clara, se ha demostrado su expresión diferencial en distintas células, ya que se encuentran bajo el control de sus propios promotores (*Oudin y cols., 2011*). El DAGL- β presenta una distribución más amplia y uniforme entre tejidos, mientras que el DAGL- α se expresa mucho más en el sistema nervioso que en órganos periféricos (*Bisogno y cols., 2003*). Aunque ambas enzimas están presentes en el cerebro adulto, el DAGL- α es el único responsable de la señalización sináptica retrógrada (*Oudin y cols., 2011*). Finalmente, la expresión de estas enzimas es muy dinámica y ocurre en el lugar concreto y en el momento preciso, orquestando así las funciones eCBs tanto en el cerebro en desarrollo como en el adulto (*Oudin y cols., 2011*).

En la actualidad, se considera que el MAGL es el principal enzima que cataliza la hidrólisis de 2-AG *in vivo* (*Dinh y cols., 2002, 2004; Vandevoorde y Lambert, 2007*), aunque varios estudios sugieren la existencia de enzimas adicionales que hidrolizan 2-AG en el cerebro (*Saario y cols., 2004; Blankman y cols., 2007; Muccioli y cols., 2007*). De hecho, MAGL es responsable del 85% de la hidrólisis de 2-AG, mientras que el 15% restante es catalizado mayoritariamente por otros dos enzimas, concretamente, el α,β -hidrolasa-6 (ABHD6) y el α,β -hidrolasa-12 (ABHD12) (*Blankman y cols., 2007; Zhong y cols., 2011; Ayakannu y cols., 2013*).

En el caso de la AEA, la síntesis está mediada por una fosfolipasa D (NAPE-PLD) dependiente de calcio (*Okamoto y cols., 2004, 2007; Wang y cols., 2006; Jin y cols., 2007*), mientras que la degradación ocurre a través de un amido hidrolasa de ácidos grasos (del inglés *fatty acid amido hidrolase* o FAAH) que hidroliza, entre otros, la AEA dando lugar a etanolamina y ácido araquidónico (para revisión: *Ueda y cols., 1995; Basavarajappa, 2007; Kano, 2009*).

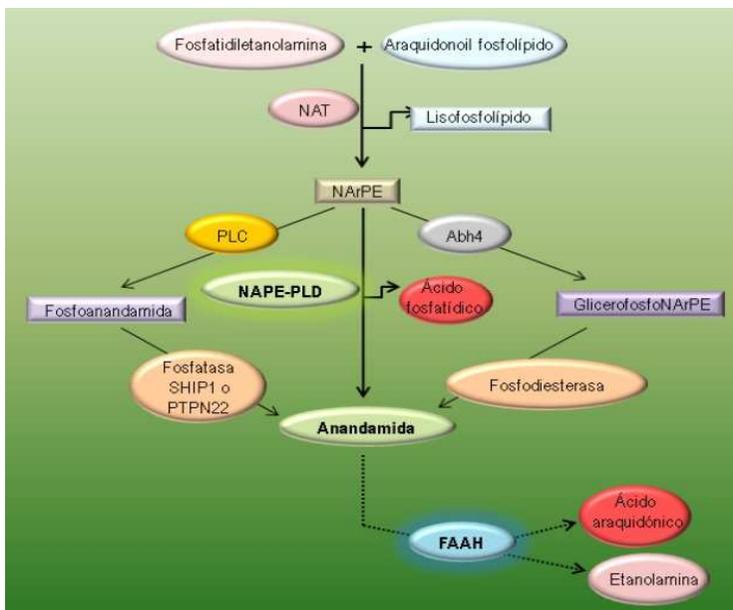


Figura 6: Principales vías de síntesis y degradación de la AEA. NAT, N-aciltransferasa; NArPE, N-araquidonoilfosfatidiletanolamina; PLC, fosfolipasa C; Abh4, alfa/beta-hidrolasa 4; SHIP1, inositol polifosfato-5-fosfatasa; PTPN22, proteína tirosina fosfatasa.

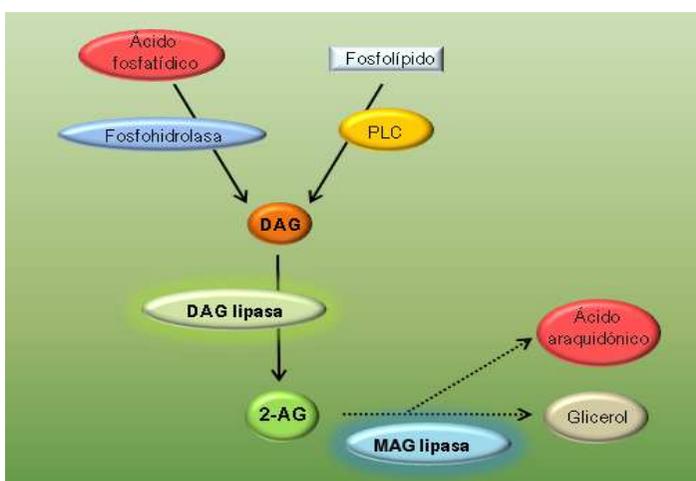


Figura 7: Principal vía de síntesis y degradación del 2-AG. PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol.

1.4. FUNCIONES DEL SEC EN EL DESARROLLO

En los últimos años, diferentes investigaciones han indicado el papel fundamental que juegan los eCBs en la neurogénesis, aportando así nuevos paradigmas funcionales para el SEC (*Galve-Roperh y cols., 2009; Oudin y cols., 2011*). Por una parte, se ha descrito la expresión del ARNm del CB₁ en numerosas regiones del cerebro en desarrollo (*Buckley y cols., 1998*). Por otra parte, se ha demostrado que el SEC está involucrado en diferentes fases del desarrollo neuronal: como son la proliferación de neuronas progenitoras (*Aguado y cols., 2006*), la neurogénesis (*Berghuis y cols., 2007; de Salas-Quiroga y cols. 2015*), la neuritogénesis (*Gaffuri y cols., 2012*), el crecimiento axónico (*Williams y cols., 2003*), la migración (*Zhou y cols., 2015*) y sinaptogénesis (*Fernandez-Ruiz y cols., 2000; Berghuis y cols., 2005; Keimpema y cols., 2011*).

1.4.1. Desarrollo embrionario y desarrollo postnatal

La adquisición de una citoarquitectura neuronal característica y el patrón de conectividad, dependen de los mecanismos y agentes de señalización y de su expresión coordinada e interacción temporal (*Ibáñez y Ernfors, 2007; Fishell y Hanashima, 2008*). Estudios realizados en la corteza cerebral en desarrollo, han mostrado que el establecimiento inicial de la estructura funcional y la conectividad recae sobre 3 eventos principales del desarrollo temprano: la proliferación y diferenciación de progenitores neuronales que conducen a la generación puntual de subtipos neuronales apropiados, la migración de las neuronas a localizaciones específicas y el establecimiento de conexiones sinápticas funcionales entre neuronas tras completarse la diferenciación neuronal (*Marin y cols., 2003*). Se ha visto que el SEC participa en todos estos procesos.

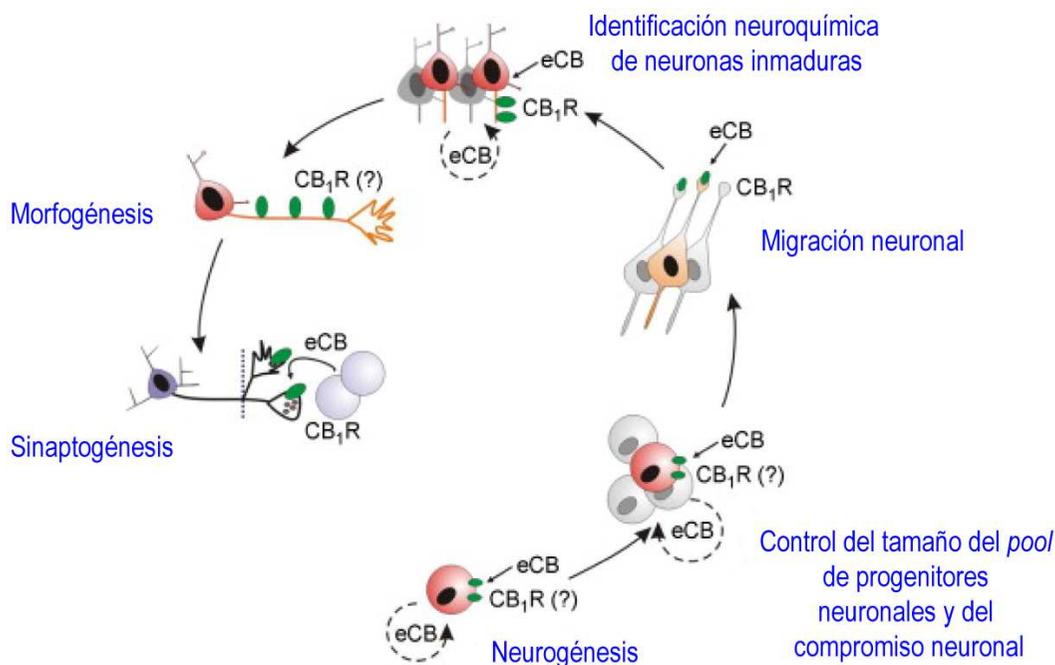


Figura 8: Esquema que ilustra las distintas etapas de la especificación neuronal donde participa el SEC. Los eCBs actúan sobre los receptores CB₁ (verde). Las flechas discontinuas indican un posible mecanismo autónomo a través de la expresión de los DAGL intrínsecos que regularían la liberación de eCBs; las flechas sólidas, señalan la acción de los eCBs que derivan de los procesos de especificación determinados. Los signos de interrogación apuntan a otros posibles receptores sensibles a cannabinoides (CB₂, GPR55) que podrían participar en cada proceso en particular. Modificado de Harkany y colaboradores; *Mol Cell Endocrinol.*, 2008a.

El receptor CB₁, como hemos mencionado, está presente y es activo desde las etapas más tempranas del desarrollo ontogénico, lo que indica su importancia en la neurogénesis y desarrollo neuronal (*Berrendero y cols., 1998; Fride y cols., 2009; Mechoulam y Parker 2013*). Este receptor tiene un perfil de expresión característico durante el desarrollo embrionario que es regulado en el tiempo en diferentes áreas cerebrales (*Harkany y cols., 2007*) hasta que se alcanza el patrón del cerebro adulto (*Freund y cols., 2003*).

El CB₁ es particularmente abundante en la sustancia blanca embrionaria. Esa expresión disminuye con el desarrollo (*Romero y cols., 1997*) mientras que su nivel

incrementa progresivamente en la sustancia gris en hipocampo, cerebelo, estriado y córtex cerebral. De hecho, este incremento de la expresión de CB₁ en el sistema nervioso en desarrollo transcurre en paralelo a la diferenciación neuronal (*Harkany y cols., 2007*). Curiosamente, ocurre lo contrario con la actividad de CB₁ en áreas de sustancia blanca de cerebros fetales, donde la actividad de CB₁ se eleva mientras el ARNm disminuye (*Wang y cols., 2003*). Respecto a los enzimas de síntesis y degradación del 2-AG, se ha demostrado la existencia del ARNm del DAGL- α y DAGL- β y del MAGL en diferentes regiones cerebrales en etapas embrionarias (*Keimpema y cols., 2010*).

1.4.1.1. Efecto de los eCBs sobre los progenitores neurales

Los estudios realizados en los últimos años indican una implicación del receptor CB₁ en la supervivencia, proliferación, diferenciación y migración de progenitores neurales; existe, sin embargo, controversia al respecto. De hecho, mientras que en el embrión de pollo la expresión del receptor CB₁, al menos en la médula espinal, se restringe a células postmitóticas (*Begbie y cols., 2004; Watson y cols., 2008*), otros estudios han demostrado que, tanto las células neuronales progenitoras como las células neuronales inmaduras expresan CB₁ funcionales (para revisión *Galve-Roperh y cols., 2009*). En el mismo sentido, estudios *ex vivo* e *in vitro*, han mostrado señalización eCB en células indiferenciadas tanto en progenitores neuronales como en células madre neuronales en etapas embrionarias, postnatales y también en el adulto (*Jin y cols., 2004; Aguado y cols., 2005,2007; Arevalo-Martin y cols., 2007*). Esta señalización controla directamente el tamaño de la población de progenitores neurales, por ejemplo, en el caso de las CG del cerebelo y neuronas olfatorias (*Trazzi y cols., 2010*).

Parece ser que el CB₁ tiene también efecto en la regulación de la capacidad neuronal de los progenitores para diferenciarse y alcanzar un fenotipo maduro. Diferentes estudios han mostrado una influencia negativa en dicha diferenciación producida por eCBs (*Rueda y cols., 2002; Jiang y cols., 2005; Sideris y cols., 2012*), aunque existen también trabajos que apoyan el efecto contrario (*Soltys y cols., 2010*).

En conjunto, la idea general que podemos extraer de los estudios realizados hasta el momento, es que la activación de CB₁ promueve la proliferación, la supervivencia y la migración de células progenitoras pero retrasa la transición del fenotipo progenitor multipotente, proliferativo y migratorio-competente al fenotipo establecido bien diferenciado postmitótico. Sin embargo, la duración del tratamiento y los factores de crecimiento presentes pueden modular este efecto (para mayor información al respecto ver *Gaffuri y cols., 2012*).

1.4.1.2. Implicación del SEC en la neuritogénesis y crecimiento axónico

Además del papel que los eCBs juegan en la proliferación celular, trabajos recientes demuestran su papel crucial en el crecimiento de neuritas y direccionalidad axónica durante el desarrollo (*Oudin y cols., 2011; Gaffuri y cols., 2012*). Aunque en este apartado incluimos los datos más actuales al respecto, querría subrayar la necesidad de más estudios concluyentes que resuelvan las controversias existentes hasta el momento.

Uno de los primeros pasos en la diferenciación neuronal es la neuritogénesis, es decir, el desarrollo de extensiones que se transformarán en un axón y diversas dendritas que conduce, en última instancia, a la polarización neuronal. El establecimiento de la polaridad neuronal depende de factores intrínsecos y extrínsecos desde el entorno (*Arimura y Kaibuchi, 2007; Barnes y cols., 2008*). El factor extrínseco, dependiendo del estadio del desarrollo, la identidad de la neurita (axón o dendrita), y la presencia o ausencia de otros factores extrínsecos, puede ser un regulador positivo o negativo del crecimiento neurítico.

La expresión y función de CB₁ y DAGL están estrictamente reguladas en el sistema nervioso en desarrollo, parece que con el fin de modular esta polarización y crecimiento axónicos (*Bisogno y cols., 2003; Leterrier y cols., 2006; Berghuis y cols., 2007; Vitalis y cols., 2008; Maison y cols., 2009; Walker y cols., 2010*). Además, el compromiso del linaje neuronal y la polarización axónica coincide con la expresión de CB₁ (*Coutts y cols., 2001; Begbie y cols., 2004; Berghuis y cols., 2007; Mulder y cols.,*

2008) y persiste en presencia de un tono particularmente alto de 2-AG (*Berrendero y cols., 1999*).

En cuanto al papel que el SEC puede jugar en este contexto, se ha descrito que el compromiso neurogénico regula diferencialmente la expresión de CB₁ (*Begbie y cols., 2004*), DAGL- α y β (*Walker y cols., 2010*) así como la del MAGL (*Maison y cols., 2009*). De hecho, durante la polarización neuronal, la tríada de señalización CB₁, DAGL y MAGL está co-transportada a lo largo del axón recién diferenciado (*Berghuis y cols., 2007; Mulder y cols., 2008; Keimpema y cols., 2010; Wu y cols., 2010*).

Sin embargo, los efectos de la activación del receptor CB₁ en el brotar neurítico tanto en células derivadas de neuroblastoma como en cultivos primarios, son controvertidos (*Gaffuri y cols., 2012*). Existen estudios que demuestran que promueven el crecimiento (*Williams y cols., 2003; Zorina y cols., 2010*), mientras que otros reportan una inhibición del desarrollo neurítico (*Berghuis y cols., 2005; Vitalis y cols., 2008*).

Estudios recientes han demostrado, por una parte, que la activación de CB₁ por AEA regula positivamente la longitud axónica, mientras que su inhibición aumenta el número de puntos de arborización (*Mulder y cols., 2008*) y disminuye la longitud de las neuritas principales (*Oudin y cols., 2011*).

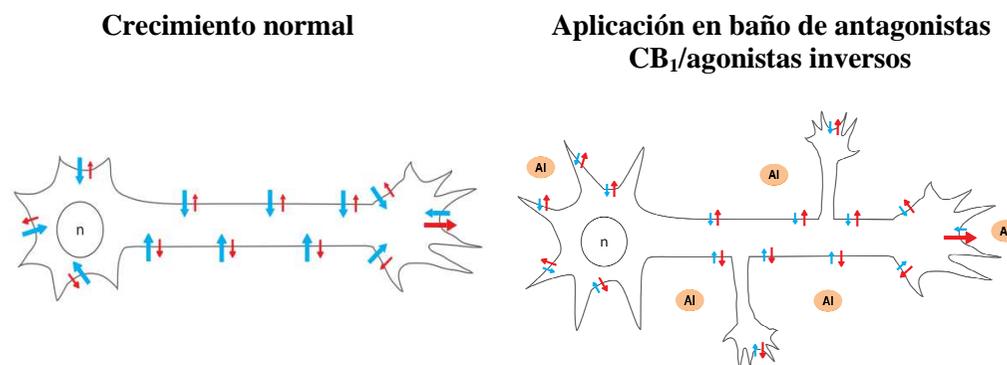


Figura 9: Esquema ilustrativo del crecimiento neurítico mediado por CB₁. La activación de CB₁ (flechas azules) conduce a un nivel de inhibición relativamente moderada que es superable por factores promotores de crecimiento locales (flechas rojas) en el cono de crecimiento resultando en un crecimiento polarizado más eficiente. El tamaño de la flecha es proporcional a la fuerza de la señal. AI, agonistas inversos. *Gaffuri y colaboradores; Pharmacology, 2012.*

El segmento distal y móvil del axón en proceso de crecimiento, el cono de crecimiento, es rico en actina y es altamente móvil. Esta región explora los entornos extracelulares, determina la dirección de crecimiento y dirige el crecimiento axónico. Numerosas evidencias sugieren que la señalización de CB₁ controla la navegación del cono de crecimiento, oponiéndose a las señales de atracción direccional química y eléctrica (*Gaffuri y cols., 2012*) influyendo así en la trayectoria axónica.

Estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo en el cerebro de ratones en desarrollo, revelan que CB₁ y los DAGL están co-expresados en los tractos axónicos y conos de crecimiento (*Bisogno y cols., 2003; Wu y cols., 2010; Argaw y cols., 2011*). Igualmente, observaciones *in vitro* demuestran claramente que CB₁ está particularmente acumulado en el filopodio de los mismos (*Coutts y cols., 2001; Berghuis y cols., 2007; Keimpema y cols., 2010; Argaw y cols., 2011*).

En este contexto, los datos en modelos DAGL- α -KO proponen inequívocamente al 2-AG como mensajero retrógrado extracelular y señalizador intracelular (*Kano y cols., 2009; Keimpema y cols., 2011*). Como ya hemos mencionado, los DAGL- α y DAGL- β

están co-expresados dentro del cono de crecimiento permitiendo así un lazo de señalización autocrina que conduce al crecimiento axónico. Las proteínas de anclaje (ej. homer-1/2b) parecen determinar los sitios subcelulares de síntesis del 2-AG uniéndose al DAGL- α (Roloff y cols., 2010). La actividad enzimática de los DAGLs, dependiente de Ca^{2+} , puede estar limitada espacialmente (dominio-específico) ya que la señalización de Ca^{2+} está lateralizada en el cono de crecimiento. Curiosamente, en condiciones fisiológicas, los cambios de calcio están altamente localizados en la región submembranosa del cono de crecimiento (Archer y cols., 1999; Chadborn y cols., 2002) que es suficiente para inducir la formación de un nuevo filopodio *in vivo* (Lau y cols., 1999) y las respuestas de giro del cono de crecimiento *in vitro* (Zheng, 2000). No es de extrañar, entonces, que los DAGLs funcionen como detectores coincidentes controlando localmente la disponibilidad del 2-AG, modulando la señalización autocrina sobre los CB_1 para limitar la protrusión de una nueva neurita o el proceso de giro del cono de crecimiento. Sin embargo, es necesario que el DAGL trabaje en conjunto con el enzima de degradación MAGL para que el proceso de crecimiento axónico se desarrolle correctamente (Keimpema y cols., 2010).

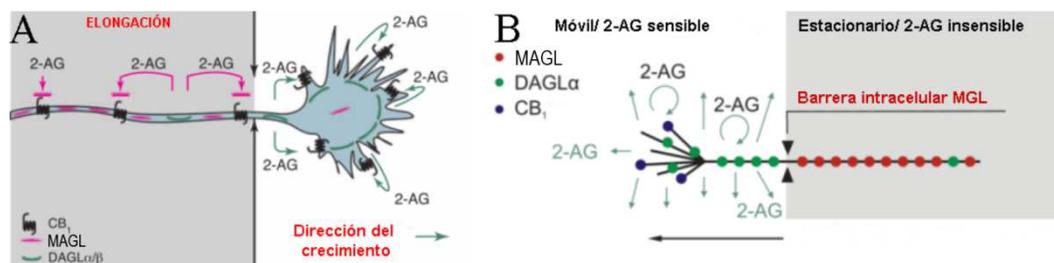


Figura 10: (A) Esquema de la localización de los componentes del SEC durante el desarrollo axónico y (B) el modelo del mecanismo funcional del MAGL, CB_1 y DAGL- α en el desarrollo. Keimpema y colaboradores; *Trends in pharmacological sciences*, 2011 y Keimpema y colaboradores; *JNeurosci.*, 2010, respectivamente.

El MAGL, es un enzima citosólico que puede ser reclutado a la membrana plasmática para inactivar el 2-AG (Labar y cols., 2010). El análisis subcelular desarrollado por Keimpema y colaboradores (2011) revela que el MAGL se acumula en los axones consolidados positivos para la tubulina, mientras que sus niveles disminuyen a través del

extremo del axón móvil rico en actina dejando una “región barrera” de 9-12 μ m con niveles bajos de MAGL. El gradiente decreciente de MAGL hacia el cono de crecimiento móvil permite la acumulación de 2-AG suficiente para activar el CB₁, afectando así a la trayectoria del mismo (*Keimpema y cols., 2011*). En el cono de crecimiento, este enzima sufre una degradación proteosomal local y rápida (*Keimpema y cols., 2010*). Se presenta así la posibilidad de que la redistribución del MAGL en el cono de crecimiento pueda ser fisiológicamente relevante para disminuir la velocidad de la movilidad inducida por el 2-AG cuando el cono de crecimiento se aproxima a su diana postsináptica para, de este modo, prevenir la elongación aberrante del axón más allá de su diana postsináptica apropiada. Cuando el 2-AG alcanza niveles elevados ocurre una remodelización masiva del cono de crecimiento, lo cual se evidencia en una clara reducción del número de filopodios y del tamaño de la superficie de los conos de crecimiento (*Berghuis y cols., 2007*).

Estos datos, en su conjunto, sugieren que el SEC participa en el mantenimiento de la morfología polarizada de las neuronas en crecimiento, promoviendo la extensión de un único proceso principal (*Gaffuri y cols., 2012*).

1.4.1.3. Establecimiento de las conexiones neuronales y sinaptogénesis

Un ejemplo del papel fundamental que los cannabinoides juegan en el establecimiento de conexiones neuronales, es el patrón de los axones excitadores de largo alcance de las células piramidales que precede a la especificación neuroquímica y al patrón sináptico de las interneuronas GABAérgicas durante la corticogénesis (*Galve-Roperh y cols., 2006, 2009; Harkany y cols., 2008a; Díaz-Alonso y cols., 2012; de Salas-quiroga y cols., 2015*). Los axones excitadores en proceso de fasciculación, definen un “protomapa eCB” demarcando puntos calientes ricos en eCBs y corredores en los mismos. Esta matriz espacial basada en eCBs, ofrece nichos permisivos y repulsivos para los axones GABAérgicos que navegan hacia sus objetivos postsinápticos. En el caso expuesto, los axones GABAérgicos locales carecen de capacidad de síntesis de 2-AG y usan el 2-AG como señal de navegación hacia el objetivo. En consecuencia, cuando un aferente inhibitor

se acerca a un microdominio de axones excitadores rico en eCBs, la estimulación de CB₁ activa efectores del citoesqueleto (GTPasas RhoA) iniciando una respuesta de repulsión con el colapso de la parte del cono de crecimiento frente al gradiente de 2-AG. A través de la liberación de 2-AG, los axones excitadores preexistentes determinan la distribución espacial de los aferentes inhibidores a lo largo de las dendritas de las neuronas piramidales. Este nuevo mecanismo de segregación sináptica impulsado por los eCBs, se ve apoyado por el hecho de que los niveles de CB₁ y DAGL alcanzan un pico en las neuronas corticales durante todo el período de elongación axónica, viéndose reducida la expresión de CB₁ progresivamente y aumentada la del DAGL a nivel somatodendrítico una vez termina la sinaptogénesis (Bisogno y cols., 2003; Begbie y cols., 2004; Galve-Roperh y cols., 2006, 2009; Berghuis y cols., 2007; Mulder y cols., 2008; Watson y cols., 2008; Díaz-Alonso y cols., 2012; de Salas-quiroga y cols., 2015). Se ha visto que la activación del CB₁, inhibe la formación de sinapsis (Kim y Thayer, 2001) vía Gα_{q/10}, a través de la disminución de la actividad AMPc (adenosín monofosfato-3',5' cíclico) y proteína quinasa A (PKA), que también parecen estar en la base del mecanismo de formación de nuevas sinapsis (Kavalali y cols., 1999). Además, la inhibición del DAGL-α incrementa los niveles de SNAP25 (del inglés, *Synaptosomal-associated protein 25*) sugiriendo que la inhibición del CB₁ induciría la sinaptogénesis (Mulder y cols., 2008). Así, una vez termina la sinaptogénesis, los DAGL se redistribuyen dentro del dominio somatodendrítico de las neuronas, mientras que tanto el CB₁ como el MAGL permanecen localizados en las terminales presinápticas (Dinh y cols., 2002; Gulyas y cols., 2004; Kano y cols., 2009; Keimpema y cols., 2010). De esta manera, los DAGL proporcionan el 2-AG necesario para la señalización retrógrada (Bisogno y cols., 2003).

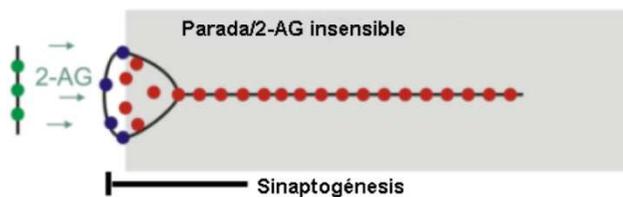


Figura 11: La sinaptogénesis coincide con la redistribución subcelular del MAGL. Se muestra la redistribución del MAGL (en rojo) durante la formación de la sinapsis. Keimpema y colaboradores; *JNeurosci.*, 2010.

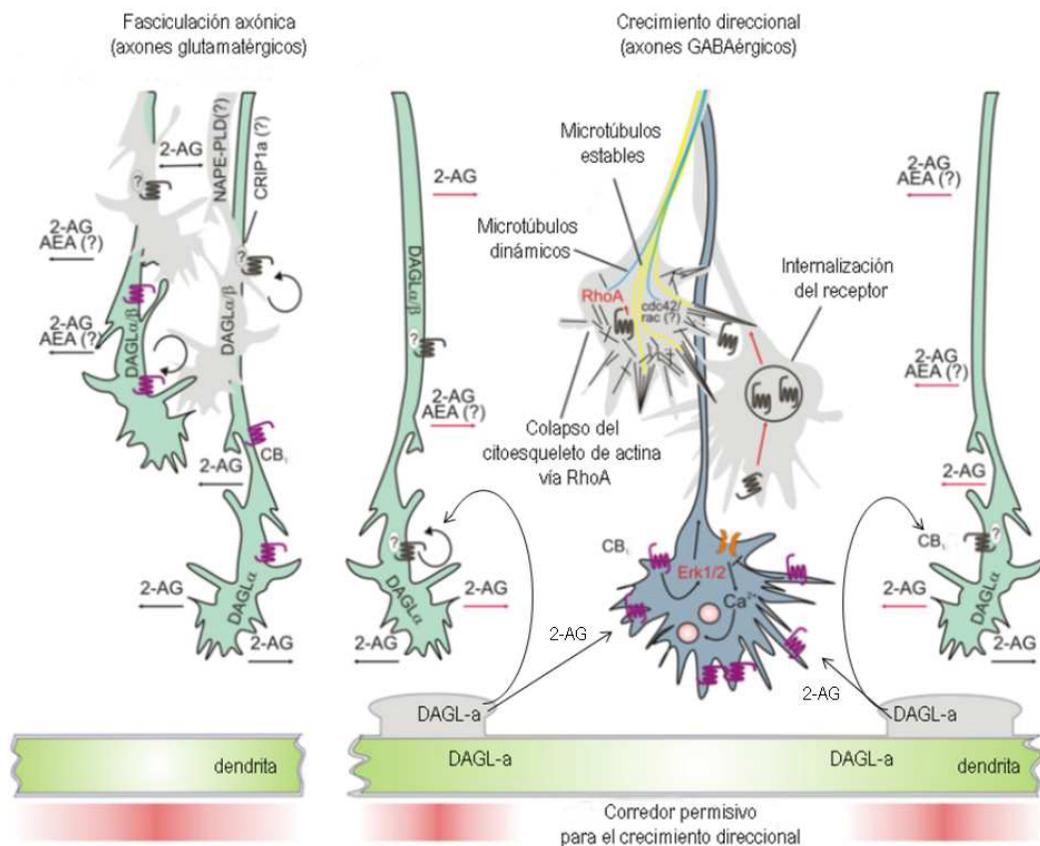


Figura 12: El mecanismo que define la segregación espacial propiciada por eCBs en sinapsis inhibitoras y excitadoras. *Harkany y colaboradores; Curr Opin Neurobiol., 2008b.*

En conjunto, durante el desarrollo, los mecanismos por los cuales las células localizan el CB₁, el DAGL, y el MAGL en los compartimentos celulares específicos en distintos estadios del desarrollo es, sin duda, el factor crítico que permite la señalización eCB. Esta posición y las interacciones específicas que se dan entre estos componentes juegan un papel clave en la regulación de las diferentes etapas del desarrollo neuronal.

1.5. CANNABINOIDES Y DESARROLLO CEREBELOSO

Dada la elevada participación del SEC en el funcionamiento del cerebelo y basándonos en estudios previos donde se demuestra la presencia del SEC en el cerebelo en desarrollo, pensamos que esta región, que además sufre sustanciales modificaciones morfológicas en el periodo postnatal, podría ser un modelo *in situ* ideal para el estudio de la participación del SEC en el desarrollo del SNC.

El SEC está altamente expresado en la corteza cerebelosa del adulto donde el CB₁ reside principalmente en las terminales sinápticas de las células en cesto y de las FP y, en menor medida, en las terminales de las FT (*Kawamura y cols., 2006*). La expresión de DAGL- α , por su parte, es elevada en las dendritas de las neuronas de Purkinje. Centrándonos en el desarrollo postnatal del cerebelo, la expresión del SEC únicamente ha sido estudiada en la última fase del periodo postnatal (*Kawamura y cols., 2006; Yoshida y cols., 2006; Tanimura y cols., 2012*). Estos estudios han mostrado a nivel ultraestructural que el CB₁ está presente en las TFP desde P14 (*Kawamura y cols., 2006*) y el DAGL- α está enriquecido en la base del cuello de la espina dendrítica y excluido del resto del compartimento espinoso de la CP desde P10 (*Yoshida y cols., 2006*). Otras células de la corteza cerebelosa, como las interneuronas o la GB, están prácticamente desprovistas de este enzima (*Yoshida y cols., 2006*). Mientras tanto, la expresión del MAGL es muy alta en las FP, débil en la GB y no se detecta en otras terminales sinápticas a P12 ni tampoco en el cerebelo adulto (*Tanimura y cols., 2012*). Todos estos datos, sin embargo, sólo hacen referencia a la CM recién formada.

En el cerebelo adulto, el 2-AG es liberado desde las CP y actúa como mensajero retrógrado activando el receptor CB₁ que se localiza en la TFP, induciendo una supresión de la liberación del neurotransmisor glutamato que interviene en diversos tipos de plasticidad sináptica (*Melis y cols., 2004; Safo y Regehr, 2005; Qiu y Knöpfel, 2007, 2009*). Sin embargo, cabría esperar que la expresión del SEC en el cerebelo en desarrollo, donde

estaría implicado en funciones muy diferentes a las que conlleva la transmisión sináptica del adulto, tuviera una composición y localización diferente al del sistema adulto.

A pesar de que los estudios de ARNm realizados hace años mostraron una expresión de CB₁ en el cerebelo embrionario (*Berrendero y cols., 1998; Buckley y cols., 1998*), no es conocido el patrón de CB₁ durante el desarrollo postnatal temprano en relación con los cambios que sufren los diferentes componentes de la corteza cerebelosa. Estudios de PCR han detectado la expresión de CB₁ en los precursores de las CG (*Trazzi y cols., 2010*).

Diversos estudios han mostrado la importancia del 2-AG en relación al crecimiento axónico durante el desarrollo, como ya he mencionado anteriormente (*Brittis y cols., 1996; Keimpema y cols., 2010; Oudin y cols., 2011*). La expresión de los enzimas DAGL- α y DAGL- β pasan de localizarse en el tracto axónico en desarrollo a los campos dendríticos una vez concluye la sinaptogénesis, fase en la cual los requerimientos funcionales lo precisan postsinápticamente (*Keimpema y cols., 2011*). Estudios realizados *in vitro* por el grupo de Patrick Doherty demuestran que tanto el CB₁ como el DAGL están presentes en el cono axónico de las CG (*Williams y cols., 2003*), mientras que el DAGL en el adulto se localiza en las espinas dendríticas en yuxtaposición al compartimento presináptico maduro (*Bisogno y cols., 2003; Katona y cols., 2006; Yoshida y cols., 2006*).

Siguiendo con estudios realizados en CG en cultivo, se ha demostrado que el CB₁ se expresa tanto en las neuritas como en el cuerpo celular (*Nogueron y cols., 2001*) y en el cono de crecimiento (*Williams y cols., 2003*). En este último trabajo, Williams y colaboradores (2003) observaron que antagonistas de CB₁ inhiben completamente el componente N-cadherina de la respuesta de crecimiento de neuritas así como el brote neurítico inducido por el FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2, del inglés *fibroblast growth factor 2*) pero no el estimulado por BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) a través de la activación del receptor TrkB

(receptor tirosina quinasa B, del inglés *tyrosine protein kinase B*) (*Williams y cols., 2003*). Estos hallazgos son coherentes pues en la vía de las N-cadherinas y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés *fibroblast growth factor*) está involucrada la hidrólisis del diacilglicerol (DAG); sin embargo, la vía del BDNF no es dependiente del DAG (*Lom y cols., 1998*). El empleo de agonistas y antagonistas de la N-cadherina, del RFGF (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos) y del receptor CB₁, muestra que el CB₁ se localiza corriente abajo del receptor FGF dentro de la cascada de reacciones involucradas en el brote neurítico, ya que sus antagonistas inhiben el brote cualquiera que haya sido el modo de estimulación (agonista de CB₁, aplicación de FGF o N-cadherina), mientras que inhibidores de la N-cadherina y RFGF no consiguen inhibir el brote provocado por la activación de CB₁ (*Williams y cols., 2003*). La aplicación de ácido araquidónico en cultivos primarios de neuronas cerebelosas también provoca el brote neurítico inducido por los CAMs (moléculas de adhesión celular, del inglés *cell adhesion molecules*) y FGF2 en algún nivel de la cascada corriente abajo del receptor del FGF y corriente arriba de la influencia del calcio en los conos de crecimiento (*Williams y cols., 1994a,c*). La respuesta al ácido araquidónico, sin embargo, resulta completamente inhibida por antagonistas de CB₁, lo que indica que el ácido araquidónico actúa corriente arriba del receptor CB₁, probablemente estimulando la síntesis de 2-AG (datos citados por *Williams y cols., 2003*).

La hidrólisis del DAG, se acopla a la vía del receptor de FGF en el cono de crecimiento y se estimula así el crecimiento axónico a través del influjo de calcio mediado por los canales de calcio N y L (para revisión ver *Doherty y cols., 2000; Williams y cols., 2003*). La activación del RFGF induce la activación de la fosfolipasa C gamma (PLC γ), el cual genera DAG que será convertido en 2-AG por el DAGL- α y ejerce acciones autocrinas sobre los CB₁ en los conos de crecimiento móviles. Es interesante que la formación del brote neurítico no se ve afectado tras estimulación por BDNF incluso bloqueando los canales de calcio, lo que demuestra de nuevo que los dos receptores de

tirosina quinasa, RFGF y TrkB, utilizan una cascada de señalización diferente para inducir el crecimiento axónico en las CG del cerebelo (*Williams y cols., 2003*).

Aproximaciones fisiológicas y farmacológicas revelan que la actividad de los canales iónicos dependientes de voltaje, los receptores de neurotransmisores y la oscilación del calcio intracelular son cruciales para la normal migración de las CG (*Komuro y Rakic, 1992, 1993; Rossi y Slater, 1993; Komuro y cols., 2015*). En el caso del cerebelo, la potenciación de la actividad de los canales de calcio tipo N (*N-type Ca²⁺ channels*) y/o el subtipo de los receptores de glutamato la N-metil-D-aspartato (NMDA) aumenta el ratio de la movilidad de las CG, mientras que la reducción de su actividad lo disminuye (*Komuro y Rakic, 1992, 1993, 1998a,b; Komuro y cols., 2015*). Estos mecanismos podrían interactuar con el SEC presente en el cerebelo a estas edades tempranas.

1.6. eCBs EN EL CEREBELO ADULTO

Los animales carentes del receptor CB₁ presentan trastornos motores (*Zimmer y cols., 1999; Kishimoto y Kano, 2006*). Este no es un hecho extraño, habida cuenta de la transcendencia que dichos receptores poseen en el sistema motor central tanto en el desarrollo como en la propia transmisión sináptica del adulto. Sin embargo, cabría esperar que las deficiencias que muestran estos animales fueran más limitantes, lo que lleva a pensar que posiblemente presentan cambios adaptativos que compensan estas deficiencias.

Dada la importancia que juega el SEC en los procesos puestos en marcha durante el desarrollo del cerebelo así como en la transmisión sináptica, decidimos analizar las consecuencias derivadas de la ausencia del CB₁ en el animal adulto.

1.6.1. Localización subcelular de los componentes del SEC en el cerebelo adulto

El SEC está ampliamente distribuido en el cerebelo adulto. De hecho, el receptor CB₁ se expresa en gran cantidad en las FP y en las células en cesto y en menor medida, en las FT (*Kawamura y cols., 2006*). Centrándonos en la sinapsis objeto de nuestro estudio, el CB₁ en las FP se localiza preferentemente en la porción longitudinal de las fibras/axones cercana a la varicosidad sináptica que se proyecta hacia las espinas de las CP. La especificidad y eficiencia de la supresión retrógrada mediada por endocannabinoides (SRE), no sólo depende de los niveles de expresión de CB₁ en los elementos presinápticos, sino también de la distancia entre el sitio de producción del 2-AG y el CB₁ presináptico. En la corteza cerebelosa, los eCBs son sintetizados por las CP. El DAGL- α se expresa en la superficie dendrítica y, ocasionalmente, en la superficie somática de las CP, estando especialmente concentrado en la base del cuello de la espina dendrítica y con menor densidad en la membrana somatodendrítica. Sin embargo, está excluido del resto de la estructura espinosa, como ya ha sido anteriormente comentado (*Yoshida y cols., 2006*).

El MAGL (*Blankman y cols., 2007*), enzima principal responsable de la hidrólisis del eCB 2-AG, se expresa abundantemente en las TFP, débilmente en la GB y está ausente de otras terminales sinápticas del cerebelo adulto (*Tanimura y cols., 2012*).

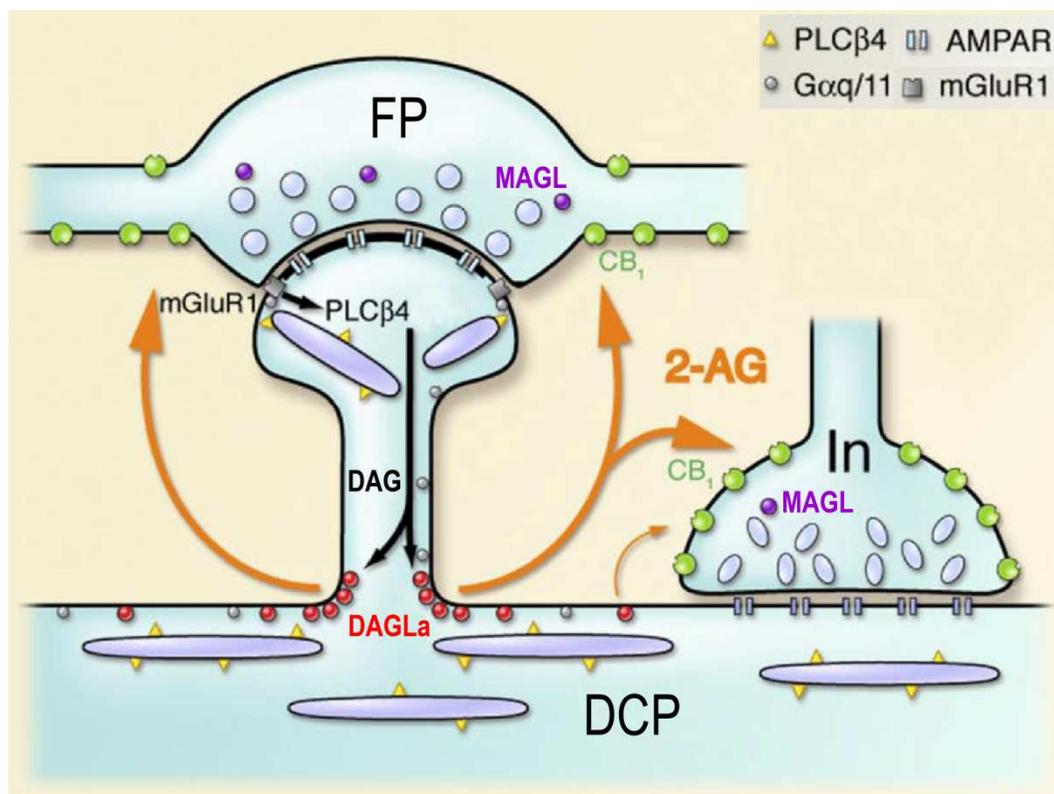


Figura 13: Esquema que ilustra la señalización eCB en las ramas espinosas de las células de Purkinje y la arquitectura molecular de los principales componentes que participan en el mecanismo de acción del SEC. FP, terminal de la fibra paralela; In, terminal inhibitoria; DCP, dendrita de la célula de Purkinje; DAG, diacilglicerol; PLC β 4, fosfolipasa C beta 4; mGluR1, receptor metabotrópico del glutamato tipo 1; G α q/11, subunidad α q/11 de la proteína G; AMPAR, receptor ionotrópico de glutamato α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico. *Modificado de Kano y colaboradores; American Physiological Society, 2009.*

1.6.2. SEC y plasticidad sináptica en el cerebelo adulto

En el cerebro adulto, se produce la síntesis de uno o más eCBs a nivel postsináptico que actúan como mensajeros retrógrados sobre los CB₁ presinápticos, induciendo la supresión de la liberación de neurotransmisor tanto en las sinapsis excitadoras como inhibitorias, como ya he comentado previamente (*Wilson y Nicoll, 2002; Bisogno y cols., 2003; Kawamura y cols., 2006*). Estos eCBs son capaces de modular la plasticidad sináptica a escalas temporales distintas (*Carey y cols., 2011*). En la corteza

cerebelosa, los CB₁ regulan varias formas de plasticidad sináptica a nivel de las sinapsis de las FP con las espinas dendríticas de las CP. Dos a corto plazo: la supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE, del inglés *depolarization-induced suppression of excitation*) (Urbanski y cols., 2009). En este caso, la despolarización de las CP eleva los niveles de calcio postsinápticos que desencadena la liberación de eCBs sin mediación de los receptores metabotrópicos del glutamato (mGluR). El otro tipo de plasticidad a corto plazo, es la supresión de la excitación evocada sinápticamente (SSE, del inglés *synaptically evoked suppression of excitation*) en la cual, la activación de receptores unidos a proteínas G_{q/11} y el calcio inducen la liberación de eCBs (Llano y cols., 1991; Kreitzer y Regehr, 2001a,b; Maejima y cols., 2001; Brenowitz y Regehr, 2003; Brown y cols., 2003). Esta forma de plasticidad se expresa presinápticamente y desaparece en los animales CB₁-KO, indicando que está mediada por los CB₁ (Safo y Regehr, 2005; Kawamura y cols., 2006).

Se ha descrito también que los eCBs regulan presinápticamente la plasticidad sináptica a largo plazo en estas sinapsis (Brenowitz y Regehr, 2003; Brown y cols., 2003; Safo y Regehr, 2005; Soler-Llavina y Sabatini, 2006; van Beugen y cols., 2006; Qiu y Knöpfel, 2009; Carey y cols., 2011). La estimulación de las FP por sí sola, induce una LTP (potenciación a largo plazo, del inglés *long-term potentiation*) presináptica (Lev-Ram y cols., 2002; Coesmans y cols., 2004). La liberación de eCB por las FT es capaz de suprimir esta forma presináptica de LTP de las FP. El mecanismo se basa en que la activación de CB₁ presináptico interfiere con la cascada de la adenilato ciclasa-proteína quinasa A (AC-PKA), bloqueando esta LTP (van Beugen y cols., 2006).

Por otra parte, estudios electrofisiológicos realizados *in vivo*, muestran que una LTD presináptica de las FP es detectable cuando la LTP presináptica es farmacológicamente frenada (Qiu y Knöpfel, 2009), mecanismo que requiere la activación de CB₁. En este caso, los eCBs son liberados de forma dependiente de receptores NMDA y no del mGluR1.

Los enzimas de biosíntesis del 2-AG, el DAGL- α y DAGL- β , se expresan en las CP del cerebelo adulto (*Bisogno y cols., 2003; Yoshida y cols., 2006*). Los experimentos con inhibidores de la síntesis del 2-AG (*Sugiura y cols., 2006*) demostraron que este eCB media la supresión retrógrada eCB a corto y largo plazo (*Melis y cols., 2004; Safo y Regehr, 2005*). La liberación de eCBs impulsada por receptores mGluRs no se observa en el cerebelo de animales DAGL- α -KO (*Tanimura y cols., 2010*). Este hecho se repite en diversas regiones cerebrales sugiriendo que es un mecanismo general y no exclusivo del cerebelo (*Chevalleyre y Castillo, 2003; Kim y Alger, 2004; Edwards y cols., 2006; Szabo y cols., 2006; Hashimotodani y cols., 2007; Lafourcade y cols., 2007; Uchigashima y cols., 2007*). Por otra parte, existen evidencias de que la degradación del 2-AG por MAGL determina el curso del tiempo de la depresión sináptica retrógrada mediada por eCB, y que la delección genética del MAGL causa una activación tónica con la consecuente desensibilización de los receptores CB₁ (*Zhong y cols., 2011*).

Por último, existe una plasticidad sináptica presente en el cerebelo que fue la primera en describirse y se cree es la base del aprendizaje motor. Nos referimos a la LTD postsináptica a nivel de las sinapsis de las FP-CP que requiere el receptor CB₁ (*Safo y Regehr, 2005*). Esta LTD está mediada por un mecanismo heterosináptico (la actividad conjunta de las FP y FT) y se expresa como una reducción de la respuesta postsináptica a la liberación del transmisor glutamato por las FP (*Ito y Kano, 1982; Linden y cols., 1991; Ito 2001*).

1.6.3. Estudios realizados en CB₁-KO

Los estudios inmunohistoquímicos, bioquímicos y electrofisiológicos realizados en ratones CB₁-KO han proporcionado evidencias que confirman que el CB₁ es el principal receptor cannabinoide presináptico en las sinapsis inhibitoras y excitadoras en varias regiones cerebrales (*Katona y cols., 1999,2001; Farquhar-Smith y cols., 2000; Hajos y cols., 2000, 2001; Wilson y Nicoll, 2001; Yoshida y cols., 2002; Bodor y cols., 2005; Kofalvi y cols., 2005; Kawamura y cols., 2006*).

Los agonistas de CB₁ causan ataxia y otras deficiencias en las funciones motoras dependientes del cerebelo (*Patel y Hillard, 2001*). A nivel de comportamiento, los animales CB₁-KO presentan diversos síntomas, entre ellos, déficits funcionales relacionados con el cerebelo como es el condicionamiento retardado de parpadeo (*Kishimoto y Kano, 2006*). Esta afectación es típica en modelos animales de degeneración espontánea de las CP (*Chen y cols., 1996,1999*) o en deleciones genéticas que resultan en defectos de la función sináptica cerebelosa (*Aiba y cols., 1994; Shibuki y cols., 1996; Kishimoto y cols., 2001b,c; 2002; Miyata y cols., 2001*). Parece ser que en la base del condicionamiento retardado de parpadeo podría estar la LTD postsináptica del cerebelo. De hecho, animales con deficiencias en la LTD como los KO del mGluR1 (*Aiba y cols., 1994; Kishimoto y cols., 2002*), fosfolipasa Cβ4 (*Kishimoto y cols., 2001c; Miyata y cols., 2001*) y de la subunidad δ2 del receptor de glutamato (*Kishimoto y cols., 2001b*) presentan alterado este tipo de condicionamiento.

Un estudio más reciente ha demostrado que los animales CB₁-KO y los ratones carentes de CB₁ en las FP (CB₁α6⁻) presentan un fenotipo neuroinflamatorio en el cerebelo derivado de la activación microglial, cursando con alteraciones del aprendizaje condicionado y la coordinación motora que revierten tras el tratamiento con miociclina (*Cutando y cols., 2013*).

Las distintas formas de plasticidad sináptica entre las FP y las CP no se observan en el ratón CB₁-KO (*Kawamura y cols., 2006*) ni tampoco en CB₁α6⁻ (*Carey y cols., 2011*). Concretamente, la eliminación selectiva del receptor CB₁ de las CG a partir de P18 (ratones CB₁α6⁻), produce deficiencias en la DSE, SSE, y desaparece la LTD postsináptica en las sinapsis de las FP-CP, mientras que la LTP presináptica se mantiene en estas sinapsis (*Carey y cols., 2011*). El empleo de esta herramienta genética proporciona una evidencia directa del papel que el receptor CB₁ ejerce en las FP en la modulación de respuestas funcionales y comportamentales. Existe por el contrario controversia con respecto a los resultados obtenidos con el test del *rotarod* en los animales CB₁-KO; de hecho, no todos los estudios realizados detectan deficiencias en la coordinación motora

(*Bilkei-Gorzo y cols., 2005; Kishimoto y cols., 2006; Kishimoto y Kano, 2006*). Sin embargo, el hecho de que no esté afectada la coordinación motora, podría deberse a que el aprendizaje motor discreto y la coordinación motora estén sustentados por diferentes mecanismos (*Chen y cols., 1995; Kishimoto y cols., 2006*).

1.6.4. Estudios realizados en KO de otros componentes del SEC

Al igual que ocurre en los CB_1 -KO, los DAGL-KO carecen de DSE y DSI (supresión de la inhibición mediada por despolarización, del inglés *depolarization-induced suppression of inhibition*) mediada por eCBs en el cerebelo, así como tampoco presentan un incremento de 2-AG inducido por estimulación (*Tanimura y cols., 2010*). Tanto la supresión retrógrada de la transmisión sináptica como el contenido de 2-AG son normales en los DAGL- β -KO. Estos resultados apuntan al 2-AG producido por el DAGL- α como el principal eCB que media la señalización retrógrada en el cerebelo.

En el caso de los ratones MAGL-KO, estos exhiben una actividad motora normal y no muestran una ataxia significativa en el test del *rotarod* (*Chanda y cols., 2010*). La actividad locomotora normal en estos ratones sugiere que los circuitos cerebelosos realizan cambios adaptativos en respuesta a elevaciones sustanciales de 2-AG. La delección del MAGL, sin embargo, prolonga la DSE mediada por mGluR1 en el cerebelo y causa una supresión tónica de la transmisión excitadora basal y una desensibilización del receptor CB_1 (*Zhong y cols., 2011*).

2. HIPÓTESIS

Estudios recientes demuestran el papel crucial del SEC en el crecimiento y trayectoria de los axones durante el desarrollo. El 2-AG parece ser el eCB implicado en estos procesos de señalización temprana (*Bisogno y cols., 2003; Berghuis y cols., 2007; Mulder y cols., 2008; Gaffuri y cols., 2012; Keimpema y cols., 2013a,b*). Durante la formación cerebral, el DAGL- α , enzima de síntesis del 2-AG, se localiza específicamente en el mismo tracto axónico que el receptor CB₁ (*Bisogno y cols., 2003*) y en posición postsináptica al cono de crecimiento que expresa CB₁ en las últimas fases del desarrollo embrionario (*Berghuis y cols., 2007*). Este hecho sugiere que los eCBs pueden funcionar de manera autocrina (*Bisogno y cols., 2003; Aguado y cols., 2005*) o diana-dependiente (*Berghuis y cols., 2007*) con objeto de controlar el crecimiento axónico y la selección de la diana postsináptica, respectivamente (*Mulder y cols., 2008*).

Hasta la fecha, se conoce que el CB₁ está presente en el cerebelo desde el día 14 de desarrollo postnatal (P14) (*Kawamura y cols., 2006*). Asimismo, el 2-AG es sintetizado y liberado por las neuronas postsinápticas y el DAGL- α está presente desde P10 localizándose sobre todo en la base del cuello de las espinas dendríticas de las CP (*Yoshida y cols., 2006*). En cuanto al MAGL, enzima principal responsable de la hidrólisis del 2-AG (*Blankman y cols., 2007*), se expresa abundantemente en los axones y las TFP desde P12 (*Tanimura y cols., 2012*).

Sin embargo, el estado del arte descrito muestra un desconocimiento sobre la localización precisa de los componentes del SEC en los estadios postnatales más tempranos del cerebelo intacto.

Por otro lado, los estudios *in vivo* e *in vitro* indican que la señalización eCB juega un papel central en la trayectoria axónica en el cerebro en desarrollo (*Galve-Ropehr y cols., 2009*); de tal modo, los eCBs a través de la activación del receptor CB₁ modulan la morfología, movilidad y direccionalidad del cono de crecimiento con objeto de permitir a los axones alcanzar sus dianas específicas (*Gaffuri y cols., 2012*). Si bien es cierto que el SEC participa en dichos procesos, nos planteamos si las TFP carentes del receptor CB₁

alcanzan su diana postsináptica específicamente o, por el contrario, establecen conexiones sinápticas aberrantes.

Teniendo en cuenta todo ello, nos planteamos las siguientes hipótesis:

1- El receptor cannabinoide tipo 1 (CB₁) y los enzimas DAGL- α y MAGL de síntesis y degradación del 2-AG, respectivamente, podrían sufrir modificaciones en su localización relacionadas con los diferentes mecanismos que subyacen a la maduración de la corteza cerebelosa.

El análisis subcelular aportaría una descripción detallada y una evidencia morfológica tangible de la participación del SEC en los procesos de desarrollo neuronal postnatal temprano.

2- Las TFP carentes de CB₁ podrían mostrar sinapsis con dianas postsinápticas no-selectivas, así como cambios morfológicos adoptados durante el desarrollo y consolidados en el adulto; todos ellos relacionados con la falta de señalización CB₁ durante el desarrollo.

El análisis ultraestructural de parámetros morfológicos de las TFP y el de sus elementos postsinápticos directos en el ratón adulto *CB₁-KO* y *CB₁-WT*, aportaría información sobre las consecuencias anatómicas de la ausencia de este receptor.

3. OBJETIVOS

Objetivos generales

- 1- Las CG que se generan a partir de sus progenitores en la CGE, experimentan procesos de proliferación neuronal, diferenciación, crecimiento, migración y sinaptogénesis durante las tres primeras semanas postnatales. Por este motivo, nos preguntamos si los componentes del SEC muestran una distribución diferencial en determinados compartimentos neuronales del cerebelo en estadios tempranos del desarrollo postnatal.
- 2- Teniendo en cuenta la participación del SEC, en concreto del receptor CB₁ en los procesos del desarrollo, nos preguntamos si la ausencia del mismo podría tener algún impacto en las características ultraestructurales anatómicas típicas de las TFP, objeto de nuestro estudio.

Por todo ello, los **objetivos específicos** que nos planteamos en este trabajo son los siguientes:

- 1- Analizar la distribución celular del receptor CB₁ y de los enzimas DAGL- α y MAGL de síntesis y degradación del 2-AG, respectivamente, en los distintos estadios de los días postnatales 0 (P0), P5 y P12 del desarrollo de la corteza cerebelosa.
- 2- Investigar la distribución subcelular específica del receptor CB₁, de DAGL- α y MAGL en los procesos axónicos de las CG en distintas etapas del desarrollo postnatal temprano de la corteza cerebelosa:
 - 2.a- Localización subcelular de CB₁, DAGL- α y MAGL en los compartimentos axónicos inmaduros de las CG en la capa granular externa a P0, P5 y P12.
 - 2.b- Localización subcelular de CB₁, DAGL- α y MAGL en los fascículos axónicos de las FP en la CM a P0, P5 y P12 y su comparación con la localización que muestran en las FP a P21 y en la edad adulta (8 semanas).
- 3- Estudiar a nivel subcelular las características fenotípicas de las TFP en la CM de los lóbulos 5 y 10 del cerebelo de ratones adultos CB₁-KO carentes de CB₁, respecto a CB₁-WT.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. PLAN DE TRABAJO

Con el fin de alcanzar los objetivos planteados, hemos utilizado anticuerpos específicos en combinación con técnicas inmunohistoquímicas para microscopía de luz (convencional y confocal) y microscopía electrónica. Estas técnicas han sido empleadas para analizar el SEC en tejido cerebeloso de ratas en desarrollo y animal adulto, así como en animales adultos transgénicos carentes del receptor CB₁, objeto de nuestro estudio.

4.2. ANIMALES EMPLEADOS

Los procedimientos experimentales realizados en este estudio se han regido según la Directiva del 22 de Septiembre de 2010 del Parlamento Europeo y del Consejo (2010/63/UE) y el Real Decreto español (R.D. 1201/2005; R.D. 53/2013). El protocolo para el uso y cuidado de los animales de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad del País Vasco (CEBA/94/2010/GRANDESMORENO; CEBA/93/2010/GRANDESMORENO). Además, se ha realizado un gran esfuerzo para minimizar el número de animales utilizados así como evitar su sufrimiento.

En este trabajo de Tesis Doctoral se han empleado los siguientes animales de experimentación:

- Ratas albinas **Sprague Dawley** de distintas edades postnatales: P0, P5, P12, P21 y rata adulta de 8 semanas (AD).
- **CB₁-WT**: Son ratones C57 silvestres o denominados en nuestro trabajo *CB₁-wild-type*. Estos animales presentan una distribución normal del receptor CB₁.
- **CB₁-KO**: Son ratones de la cepa C57 que carecen del receptor CB₁. *CB₁-knock-out*.

Los ratones empleados han sido suministrados por el Dr. Giovanni Marsicano (Neurocentre Magendie, INSERM U862, Burdeos, Francia).

4.3. GENERACIÓN DE LOS RATONES CB_1 -KO

La generación, genotipado y caracterización comportamental de los ratones CB_1 -KO ha sido descrita previamente por Giovanni Marsicano (*Marsicano y cols., 2002*).

En resumen, se generó un constructo que contenía el gen CB_1 flanqueado por dos sitios *loxP* y se electroporó a células madre embrionarias de ratón E14 (día embrionario 14) para obtener así el alelo *floxed-neo*. Los ratones que portaban este alelo *floxed-neo* (CB_1^{ff}) fueron cruzados con ratones transgénicos que expresaban la recombinasa Cre de forma ubicua (*Schwenk y cols., 1995*). A continuación, se cruzaron los ratones que portaban una delección transmisible de línea germinal de CB_1 durante 5 generaciones con ratones C57BL/6N (Charles River) y se obtuvieron ratones homocigotos deficientes de CB_1 (denominados $CB_1^{-/-}$ o CB_1 -KO) y sus correspondientes ratones *wild-type* o silvestres (denominados $CB_1^{+/+}$ o CB_1 -WT).

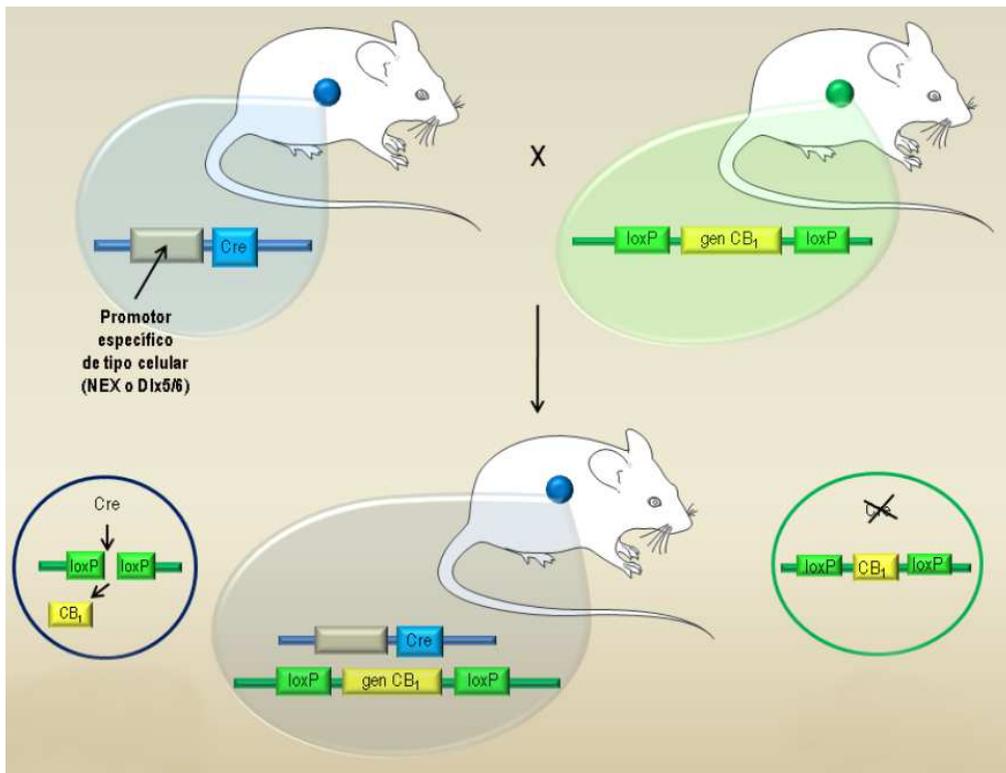


Figura 14: Esquema ilustrativo de la generación de los ratones mutantes para el receptor CB_1 .

4.4. ANESTESIA Y PERFUSIÓN

Los animales fueron anestesiados con Ketamina/Xilacina 80/10 mg/kg inyectada intraperitonealmente y perfundidos transcardíacamente mediante el tampón fosfato salino (TFS 1X; pH=7,4) durante 20s seguido de una mezcla fijadora compuesta por formaldehído al 4%, ácido pícrico saturado al 0,2% y glutaraldehído al 0,1% durante 10-15min, mantenida a 4°C. Una vez extraídos los encéfalos (conservados a 4°C en fijador diluido a 1:10 y azida sódica al 0,025%, hasta su utilización), se obtuvieron secciones parasagittales de cerebelo de 40µm mediante el vibrotomo sobre las que se realizaron los procedimientos inmunohistoquímicos pertinentes.

4.5. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten detectar la expresión de moléculas *in situ*, aprovechando la reacción específica antígeno-anticuerpo. Estas técnicas consisten, a grosso modo, en crear las condiciones óptimas para la unión específica antígeno-anticuerpo, así como detectar esta unión mediante alguno de los sistemas de visualización.

Con objeto de comprobar si el anticuerpo secundario muestra marcado de fondo que pueda estar interfiriendo con la verdadera señal, se omite la incubación con el antisuero primario y se lleva a cabo el resto del experimento bajo las mismas condiciones (control de sustitución o control negativo). Además del control negativo, se corroboró la especificidad y fiabilidad de los anticuerpos empleados sobre todo, mediante los animales *knock-out* para los mismos.

4. 6. ANTICUERPOS EMPLEADOS

Los anticuerpos empleados fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios:

- **CB₁** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal producido en cabra que reconoce 31 aminoácidos del extremo C-terminal (NM007726) del receptor CB₁ de ratón.

- **DAGL- α** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal producido en conejo que reconoce 42 aminoácidos del extremo C-terminal (NM198114) del DAGL- α de ratón.
- **DAGL- α** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal producido en cabra que reconoce 42 aminoácidos del extremo C-terminal (NM198114) del DAGL- α de ratón.
- **MAGL** (Frontier Science co. Ltd.): Anticuerpo policlonal producido en conejo que reconoce los aminoácidos 1-35 (NM_011844) del MAGL de ratón.
- **EAAT1** (abcam®): Anticuerpo policlonal producido en conejo que reconoce 20 residuos del extremo C-terminal del péptido sintético del EAAT1 (transportador de glutamato glial GLAST) de rata.
- **Calbindina D-28k** (Swant®): Anticuerpo monoclonal producido en ratón mediante la hibridación de las células de mieloma de ratón con las células del bazo desde ratones inmunizados con calbindina D-28k.

Tabla 1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Casa comercial	Especie	Concentración/ Dilución	Método IHQ
CB₁	Frontier Science	Cabra	2 μ g/ml	MO, IF, ME
DAGL-α	Frontier Science	Cabra	2 μ g/ml	MO, IF,
DAGL-α	Frontier Science	Conejo	2 μ g/ml	IF,ME
MAGL	Frontier Science	Conejo	2 μ g/ml	MO, IF, ME
EAAT1	abcam®	Conejo	1:500	IF
Calbindina D-28K	Swant®	Ratón	1:10000	IF

Caracterización de los anticuerpos primarios:

Los anticuerpos empleados en este estudio son anticuerpos de probada especificidad, como mostramos a continuación en diferentes reseñas bibliográficas en algunos casos publicados por nuestro grupo de investigación. En el caso concreto de los anticuerpos frente a CB₁, DAGL- α y MAGL utilizamos tejido de ratones *knock-out* para establecer su especificidad.

- **CB₁** (Frontier Science co. Ltd.): El inmunoblot reconoce una única banda proteica de 52kDa y marca de forma selectiva terminales y preterminales nerviosas de neuronas excitadoras e inhibitoras (Hoja de datos del anticuerpo, Frontier Science). *Referencias: Fukudome y cols., 2004; Yoshida y cols., 2006; Uchigashima y cols., 2007; Reguero y cols., 2011; Etienne Hebert-Chatelain y cols., 2014a,b; Gutiérrez-Rodríguez y cols., 2016.*

- **DAGL- α** (Frontier Science co. Ltd.): El inmunoblot reconoce una banda de 105 o 120kDa en hipocampo y cerebelo, respectivamente. *Referencias: Yoshida y cols., 2006; Uchigashima y cols., 2007; Reguero y cols., 2014.*

- **MAGL** (Frontier Science co. Ltd.): El inmunoblot reconoce dos bandas proteicas, de 37 y 35kDa, y una tercera banda adicional de alrededor de 62kDa, que no se ven tras la absorción del anticuerpo con el péptido inmunógeno. *Referencias: Dinh y cols., 2002; Suárez y cols., 2008, 2010; Uchigashima y cols., 2011.*

- **EAAT-1** (abcam®): Este anticuerpo, transportador de glutamato glial [anti-EAAT1 (ab416)] reconoce el transportador de glutamato-aspartato en las muestras del SNC de la rata, conocido también como GLAST. Se expresa mucho en el cerebelo. El inmunoblot predice una banda proteica de 60kDa en la corteza cerebral de la rata y una banda adicional de 150kDa correspondiente posiblemente al dímero. *Referencias: Gosselin y cols., 2013; Cady y cols., 2010; Barcia y cols., 2008.*

- **Calbindina D-28k** (Swant®): El McAB 300 es un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con la calbindina D-28k. El anticuerpo CB300 marca específicamente las subpoblaciones neuronales y el inmunoblot detecta una única banda proteica de 28KDa. La calbindina D-28k en el cerebelo es un marcador específico de las células de Purkinje que permite visualizar sus somas y dendritas. *Referencias: Celio y cols., 1990; Kretsinger, 1981; Airaksinen y cols., 1997.*

Anticuerpos secundarios:

- **Biotinilado anti-cabra** (Vector Laboratories, Inc.): Inmunoglobulina IgG (H+L) biotinilada, producida en caballo frente a cabra.
- **Biotinilado anti-conejo** (Vector Laboratories, Inc.): Inmunoglobulina IgG (H+L) biotinilada, producida en cabra frente a conejo.
- **A488 anti-cabra** (Molecular Probes, Life Technologies Corporation): IgG (H+L) producida en burro frente a cabra, unida al fluorocromo Alexa Fluor® 488.
- **Cy5 anti-ratón** (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.): IgG (H+L) producida en burro frente a ratón, conjugada con el fluorocromo Cy5.
- **Cy3 anti-conejo** (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.): IgG (H+L) producida en burro frente a conejo, conjugada con el fluorocromo Cy3.
- **Nanogold anti-cabra** (Nanoprobes, Inc.): Corresponde a la fracción Fab' de una IgG producida en conejo frente a cabra, marcada con una partícula de oro de 1,4nm de diámetro.
- **Nanogold anti-conejo** (Nanoprobes, Inc.): Corresponde a la fracción Fab' de una IgG producida en cabra frente a conejo, marcada con una partícula de oro de 1,4nm de diámetro.

Tabla 2. Resumen de los anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo	Casa comercial	Especie	Dilución	Método IHQ
Biotinilado anti-cabra	Vector Laboratories	Caballo	1:200	MO
Biotinilado anti-conejo	Vector Laboratories	Cabra	1:200	MO
A488 anti-cabra	Molecular Probes	Burro	1:650	IF
Cy5- anti-ratón	Jackson ImmunoResearch	Burro	1:650	IF
Cy3- anti-conejo	Jackson ImmunoResearch	Burro	1:650	IF
Nanogold anti-cabra	Nanoprobes	Conejo	1:100	ME
Nanogold anti-conejo	Nanoprobes	Cabra	1:100	ME

4.7. MÉTODO DE LA AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDADA (ABC): Fundamento teórico

La técnica del ABC es una técnica indirecta que utiliza un anticuerpo secundario biotinilado que reconoce al anticuerpo primario unido a la proteína que se quiere detectar. La amplificación de la señal se lleva a cabo mediante la adición de complejos avidina-biotina-peroxidasa. Dichos complejos consisten en una mezcla de biotina asociada a peroxidasa y avidina en una proporción que deja algunos de los puntos de unión avidina-biotina libres. La biotina del anticuerpo secundario se unirá a las valencias libres de la avidina en el complejo ABC que, a su vez, se unirá a otros complejos. El cromógeno

empleado en nuestro caso es la 3,3'-diaminobencidina (DAB), que se oxida en un medio que contiene peróxido de hidrógeno y la peroxidasa del complejo avidina-biotina. La peroxidasa cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno, de forma que el oxígeno liberado oxida la DAB; este óxido de DAB es insoluble y da un precipitado de color marrón rojizo al microscopio convencional (Fig.15).

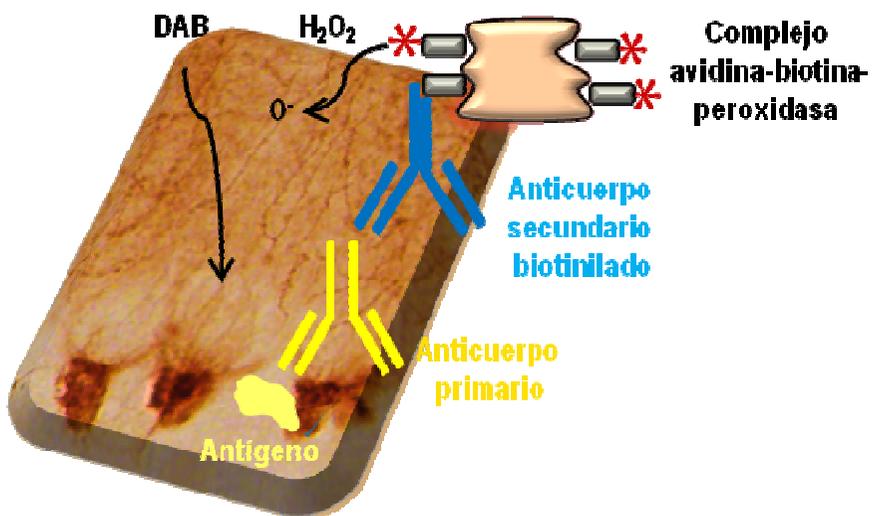


Figura 15: Diagrama que muestra las distintas etapas de la técnica inmunohistoquímica de la avidina-biotina-peroxidasa.

Técnica inmunohistoquímica de la avidina-biotina-peroxidasa para microscopía convencional

Se cortaron secciones parasagitales cerebelosas de 40 μ m en el vibrotomo que fueron recogidas en tampón fosfato (TF) 0,1M a temperatura ambiente (TA). Las secciones se preincubaron en una solución de bloqueo compuesta por 10% de albúmina de suero bovino (del inglés *bovine serum albumine* o BSA) o 10% suero de caballo, azida sódica al 0,1% y tritón X-100 al 0,5% preparado en tampón salino Tris-HCl (TTS 1X, pH=7,4) durante 30min a TA. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente: anti-CB₁ (2 μ g/ml), anti-DAGL- α (2 μ g/ml), anti-MAGL (2 μ g/ml), preparados en la misma solución del bloqueo durante 24h a TA y agitación constante.

Después de varios lavados en BSA al 1% o 1% suero de caballo, tritón X-100 al 0,5% en TTS, las secciones de tejido se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (1:200) preparados en la solución de lavado durante 1h en placa a TA y agitación constante. A continuación se lavaron en la solución de arriba descrita y se aplicó el método de la avidina-biotina-peroxidasa. El tejido se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (1:50) (ABC, Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) preparado en la solución de lavado durante 1h a TA. Tras ese periodo, las secciones se lavaron y a continuación se pusieron en contacto con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0,05% en TF 0,1M con tritón X-100 al 0,5% y peróxido de hidrógeno al 0,01%, durante 5min a TA. Tras varios lavados en TF 0,1M con tritón X-100 al 0,5%, el tejido se montó y se deshidrató en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96°, 100°) hasta el xilol y se cubrió con el medio de montaje DPX. Las secciones se observaron y fotografiaron con el microscopio de luz Zeiss Axiophot. La composición de las figuras se hizo a 300 dpi. La edición y los ajustes en brillo y contraste se hicieron empleando Adobe Photoshop (CS, Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

4.8. MÉTODO DE INMUNOFLORESCENCIA: Fundamento teórico

Este método inmunohistoquímico consiste en la incubación del tejido con un anticuerpo primario frente a la proteína que se quiere detectar. Sobre este antisuero se aplica un anticuerpo secundario que está unido a un fluorocromo. El fluorocromo es una molécula que al ser excitada con la luz de una determinada longitud de onda es capaz de emitir energía de una longitud de onda mayor, permitiendo observar una señal fluorescente en el microscopio de fluorescencia (Fig.16).

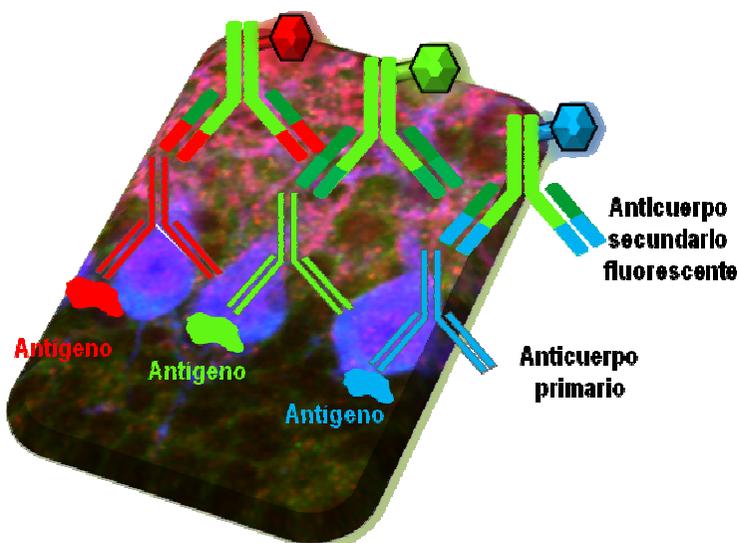


Figura 16: Diagrama que muestra las etapas de la técnica inmunohistoquímica de fluorescencia.

Técnica de inmunofluorescencia

Se cortaron secciones parasagitales cerebelosas de 40µm en el vibrotomo y se recogieron en TF 0,1M a TA. Las secciones se preincubaron en una solución de bloqueo de suero de ternera (del inglés *newborn calf serum* o NCS) al 3% o suero de caballo al 3%, azida sódica al 0,025% y tritón X-100 al 0,5% preparado en tampón fosfato salino (TFS 1X, pH=7,4) durante 1h a TA. Entonces, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-CB₁ (2µg/ml), anti-DAGL-α (2µg/ml), anti-MAGL (2µg/ml), anti-Calbindina D-28k (1:10000), anti-EAAT1 (1:500), preparados en la solución de bloqueo, en la placa durante 48h a 4°C y agitación constante.

Tras varios lavados en TFS 1X y NCS al 1,5% o suero de caballo al 1,5%, las vibrosecciones se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes a una dilución de trabajo del 1:650, preparados en la solución de lavado. Las secciones se mantuvieron durante 24h a 4°C y agitación constante. Tras la incubación, se lavaron en la solución de lavado, se montaron en un medio de montaje Vectashield (Vector laboratories) y se obtuvieron las imágenes en el microscopio confocal Leica LCS SP2 AOBS.

4.9. MÉTODO DE INMUNO-ORO INTENSIFICADO CON PLATA PREINCLUSIÓN: Fundamento teórico

Es una técnica ideal en estudios de localización ultraestructural de proteínas (*Baude y cols., 1993; Luján y cols., 1997; Mateos y cols., 1999; Elezgarai y cols., 2003; Alonso-Espinaco y cols., 2008; Puente y cols., 2010a,b; Reguero y cols., 2011, 2014; Gutiérrez-Rodríguez y cols., 2016*). El anticuerpo secundario es una fracción Fab' conjugada a una partícula de oro de 1,4nm que reconoce la fracción constante de los anticuerpos primarios. Su pequeño tamaño le permite una mayor penetración en el tejido, incrementando la sensibilidad del método. Una vez realizada la unión antígeno-anticuerpo, las pequeñas partículas de oro se intensifican con plata para aumentar su tamaño y hacerlas visibles al microscopio electrónico (Fig.17). La reacción

antígeno-anticuerpo en esta técnica de preinclusión no presenta alteraciones con el osmio ni con la polimerización de las resinas a altas temperaturas.

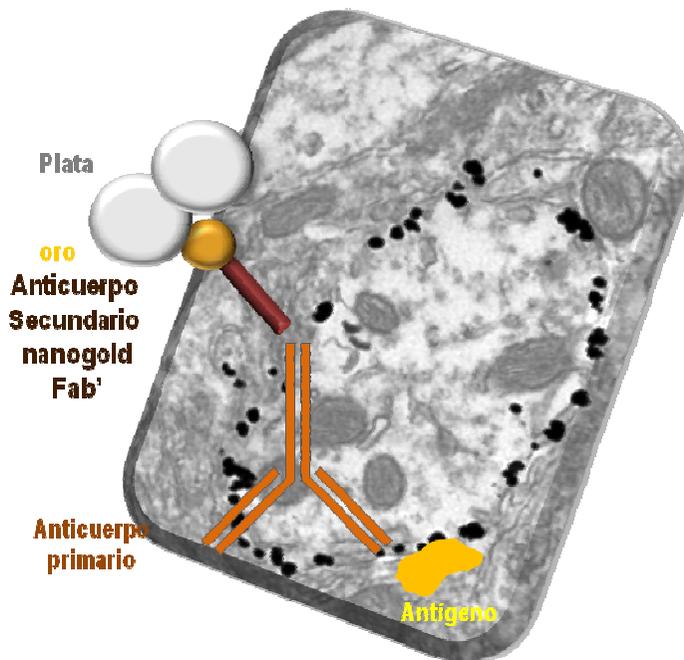


Figura 17: Diagrama que muestra las etapas de la técnica inmunohistoquímica de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión.

Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica

Se cortaron secciones parasagitales cerebelosas de 40µm en el vibrotomo que fueron recogidos en TF 0,1M a TA. Las secciones se preincubaron en una solución de bloqueo de 10% de BSA o 10% suero de caballo, azida sódica al 0,1% y saponina al 0,02% preparado en tampón salino Tris-HCl (TTS 1X, pH=7,4) por 30min a TA. Las secciones se incubaron en el anticuerpo primario correspondiente: anti-CB₁, anti-DAGL- α y anti-MAGL a

la concentración de 2 μ g/ml diluidos en la solución de incubación que consiste en un 10% de BSA o 10% suero de caballo, azida sódica al 0,1% y saponina al 0,004% preparado en tampón salino Tris-HCl (TTS 1X, pH=7,4) durante 48h a 4°C y agitación constante.

Tras varios lavados en TTS 1X, BSA al 1%, y saponina al 0,004%, las secciones de tejido se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario nanogold (1:100) preparados en la solución de incubación antes descrita durante 3h en la placa a TA. El tejido cerebeloso se lavó durante toda la noche a 4°C y agitación constante y se postfijó en glutaraldehído al 1% durante 10min a TA. Tras los siguientes lavados en agua bidestilada, las partículas de oro se intensificaron con plata con el intensificador comercial HQ Silver kit (Nanoprobes), durante alrededor de 12min en oscuridad. A continuación, el tejido se lavó en agua bidestilada y, posteriormente, en TF 0,1M (pH=7,4). Las secciones de tejido se osmificaron en tetróxido de osmio al 1% durante 20min. Tras los lavados en TF 0,1M, las secciones se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96°, 100°) y se realizó el aclarado en óxido de propileno. Las secciones de tejido se incluyeron en resina y óxido de propileno 1:1 durante 24h a TA con agitación lenta. Después, se incluyó el tejido en la resina Epon 812 y tras su polimerización a 60°C durante 48h se obtuvieron secciones semifinas de 1 μ m en el ultramicrotomo hasta alcanzar la zona de interés. Las secciones ultrafinas de 80nm se recogieron en rejillas de níquel, contrastadas con citrato de plomo al 2,5% durante 20min y se examinaron mediante el microscopio electrónico de transmisión Philips EM208S.

4.10. RESUMEN DE LOS PROTOCOLOS DE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DESARROLLADAS

4.10.1. Pasos de la técnica de la avidina-biotina peroxidada (ABC) para microscopía óptica

1. Cortes en vibrotomo: Secciones parasagitales de 40µm recogidas en TF 0,1M.
2. Bloqueo de uniones inespecíficas durante 30min a TA con la solución de bloqueo compuesta por tampón salino Tris-HCl (TTS 1X), 10% de albúmina de suero bovino (BSA) o 10% de suero de caballo, 0,1% de azida sódica y 0,5% de tritón X-100.
 1. Incubación con el anticuerpo primario correspondiente: anti-CB₁ (2µg/ml), anti-DAGL-α (2µg/ml), anti-MA
 2. GL (2µg/ml) en la misma solución del bloqueo durante 24h a TA y agitación constante.
4. Lavados en TTS 1X, 1% BSA o 1% suero de caballo y 0,5% tritón durante 30min.
5. Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (1:200) en la solución de lavado durante 1h a TA y agitación constante.
6. Lavados en TTS 1X, 1% de BSA o 1% de suero de caballo y 0,5% de tritón durante 30min.
7. Incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (1:50) en la solución de lavado durante 1h a TA.
8. Lavados en TTS 1X, 1% de BSA o 1% de suero de caballo y 0,5% de tritón durante 30min. Los últimos lavados en TF 0,1M y 0,5% de tritón.
9. Revelado con DAB al 0,05% en TF 0,1M y 0,5% de tritón y peróxido de hidrógeno al 0,01% durante 5min a TA.
10. Lavados con TF 0,1M y 0,5% de tritón durante 30min.
11. Montaje de las secciones sobre portaobjetos gelatinizados y dejar secar.
12. Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96°, 100°) durante 5min cada uno.
13. Aclarado en xilol (3x 5min).
14. Cubrir los portaobjetos con el medio de montaje DPX.
15. Observación del material en el microscopio convencional.

4.10.2. Pasos del método de la inmunofluorescencia

1. Cortes en vibrotomo, secciones parasagiales de 40µm recogidas en TF 0,1M.
2. Bloqueo de uniones inespecíficas durante 1h a TA con la solución de bloqueo compuesta por TFS 1X, 3% de suero de ternera (NCS) o 3% de suero de caballo, 0,025% de azida sódica y 0,5% de tritón X-100.
3. Incubación con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-CB₁ (2µg/ml), anti-DAGL-α (2µg/ml), anti-MAGL (2µg/ml), anti-Calbindina D-28k (1:10000), anti-EAAT1 (1:500) en la misma solución del bloqueo durante 48h a 4°C y agitación constante.
4. Lavados en TFS 1X y 1,5% de NCS o 1,5% de suero de caballo durante 30min.
5. Incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (1:650) en la solución de lavado durante 24h a 4°C y agitación constante.
6. Lavados en TFS 1X y 1,5% de NCS o 1,5% de suero de caballo durante 30min.
7. Montaje de las secciones sobre portaobjetos gelatinizados y dejar secar.
8. Montar con el medio de montaje Vectashield, cubrir y guardar a 4°C.
9. Observación del material en el microscopio de fluorescencia.

4.10.3. Pasos del método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión

1. Cortes en vibrotomo, secciones parasagiales de 40µm recogidas en TF 0,1M.
2. Bloqueo de uniones inespecíficas durante 30min a TA con la solución de bloqueo compuesta por el tampón salino Tris-HCl (TTS 1X), 10% de BSA, 0,1% de azida sódica y 0,02% de saponina.
3. Incubación con el anticuerpo primario correspondiente: anti-CB₁ (2µg/ml), anti-DAGL-α (2µg/ml) y anti-MAGL (2µg/ml), en la misma solución del bloqueo, a excepción de la saponina que se utiliza al 0,004%, durante 48h a 4°C y agitación constante.
4. Lavados en TTS 1X, 1% de BSA o 1% de suero de caballo y saponina al 0,004% durante 30min.
5. Incubación con el correspondiente anticuerpo secundario nanogold (1:100) en TTS 1X,

- 1% de BSA o 1% de suero de caballo y 0,004% de saponina durante 3h a TA.
6. Lavados en TTS 1X y 1% BSA o 1% suero de caballo durante 24h a 4°C y agitación constante.
7. Postfijación en glutaraldehído al 1% en TTS 1X durante 10min a TA.
8. Lavados en agua bidestilada durante 30min a TA.
9. Intensificación de las partículas de oro, utilizando el intensificador comercial HQ Silver kit (Nanoprobes), durante 12min en oscuridad.
10. Lavados en agua bidestilada durante 30min a TA.
11. Lavados en TF 0,1M durante 30min a TA.
12. Osmificación con tetróxido de osmio al 1% en TF 0,1M y agua bidestilada durante 20min a TA.
13. Lavados en TF 0,1M durante 30min a TA.
14. Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96° y 100°) durante 5min cada uno y tres pasos de 5min para el de 100°.
15. Aclarado en óxido de propileno en tres pasos de 5min cada uno.
16. Inclusión en resina Epon 812 y óxido de propileno 1:1 durante toda la noche a TA y agitación lenta.
17. Inclusión en resina Epon812.
18. Polimerización de la resina en una estufa a 60°C durante 48h.
19. Obtención en el ultramicrotomo de secciones semifinas de 1µm.
20. Obtención en el ultramicrotomo de secciones ultrafinas de 80nm recogidas en rejillas de níquel.
21. Contraste de las secciones con citrato de plomo al 2,5% durante 20min.
22. Observación en el microscopio electrónico de transmisión.

El estudio ultraestructural de las características anatómicas llevado a cabo en los animales *CB₁-WT* y *CB₁-KO* no requirió el uso de ningún anticuerpo. En este caso, el tejido cerebeloso se procesó únicamente para su observación y análisis mediante microscopía electrónica. Los pasos a seguir en este caso fueron los siguientes:

1. Cortes en vibrotomo, secciones parasagitales del vermis de 30 μ m recogidas en TF 0,1M.
2. Postfijación en glutaraldehído al 1% en TTS 1X durante 10min a TA.
3. Lavados en agua bidestilada durante 30min a TA.
4. Lavados en TF 0,1M durante 30min a TA.
5. Osmificación con tetróxido de osmio al 1% en TF 0,1M y agua bidestilada durante 20min a TA.
6. Lavados en TF 0,1M durante 30min a TA.
7. Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96° y 100°) durante 5min cada uno y tres pasos de 5min para el de 100°.
8. Aclarado en óxido de propileno en tres pasos de 5min cada uno.
9. Inclusión en resina Epon 812 y óxido de propileno 1:1 durante toda la noche a TA y agitación suave.
10. Inclusión en resina Epon812.
11. Polimerización de la resina en una estufa a 60°C durante 4h.
12. Obtención en el ultramicrotomo de secciones semifinas de 1 μ m de grosor.
13. Obtención en el ultramicrotomo de secciones ultrafinas de 80nm recogidas en rejillas de níquel.
14. Contraste de las secciones con citrato de plomo al 2,5% durante 20min.
15. Observación en el microscopio electrónico de transmisión.

4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.11.1. Implicación del SEC en el desarrollo neuronal postnatal

El análisis estadístico se aplicó a los datos resultantes del estudio a nivel de microscopía electrónica, a partir de las micrografías electrónicas capturadas a 18.000 aumentos. Estas imágenes se obtuvieron a partir de las rejillas que portaban las secciones ultrafinas de 80nm de grosor de la corteza cerebelosa de las ratas postnatales P0, P5, P12,

P21 y del AD; todas ellas fueron tomadas a un nivel similar de profundidad del tejido. Además, para evitar falsos negativos, examinamos únicamente las secciones ultrafinas de las primeras 1,5 μ m desde la superficie de la vibrosección cerebelosa. En los tres componentes del SEC estudiados durante el desarrollo postnatal (el receptor CB₁ y las enzimas DAGL- α y MAGL), el número de animales empleados por cada una de las edades objeto de nuestro estudio fue de 3. La medición del perímetro de membrana y del área de los característicos axones de las FP de las CG en cada una de las fases del desarrollo de la CGE, así como de las varicosidades, axones y botones terminales de dichas fibras en la CM, se hizo mediante el programa Image-J (versión 1.43u, NIH, USA).

La CGE está constituida en su región más externa por las CG proliferativas que se hallan dividiéndose activamente, y las CG postmitóticas premigratorias en su región más interna (*Komuro y cols., 2001; Miyasaki y cols., 2003; Trazzi y cols., 2010*). Cabe destacar que en el presente estudio, hemos considerado la CGE en toda su totalidad. Se analizó el porcentaje de compartimentos de axones de las CG inmunopositivos para cada proteína, y se presentaron los datos como la media \pm EEM utilizando el programa estadístico GraphPad (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc, San Diego, USA). Dada la naturaleza de los datos, se estudiaron las diferencias entre los grupos mediante el test de la chi-cuadrado de 2X2, con un nivel de confianza (NC) del 95%, y considerando significativo un valor de $p < 0,05$.

En los perfiles inmunopositivos se analizó el número de inmunopartículas para el receptor CB₁ y el enzima DAGL- α localizadas sobre la membrana plasmática (inmunopartículas/ μ m) hasta aproximadamente un máximo de 30nm alejada de la misma, de los axones de las CG en crecimiento de la CGE y de las varicosidades, axones y los botones terminales de las FP en la CM. Dado el carácter citoplasmático del MAGL, se analizó el número de inmunopartículas/ μ m identificando el MAGL presente en la membrana así como el número de inmunopartículas localizadas en el citoplasma (inmunopartículas/ μ m²) de los compartimentos inmunopositivos en las edades estudiadas. Se analizaron estos datos de densidad mediante el programa estadístico anteriormente

mencionado y se obtuvieron los estadísticos descriptivos que indicaban la falta de normalidad entre los grupos de cada edad. Por ello, se aplicó a los datos el equivalente no-paramétrico al ANOVA de 1 vía, el test de Kruskal-Wallis con un NC del 95% y considerando significativo un valor de $p < 0,05$. Los datos se mostraron como la media \pm EEM.

El porcentaje de los distintos compartimentos de los axones de las CG inmunopositivos para las proteínas analizadas así como los resultados de densidad y su ulterior análisis, fueron corregidos considerando en cada caso los resultados obtenidos mediante el análisis de los controles negativos en las edades estudiadas.

4.11.2. Cambios morfológicos ultraestructurales en ausencia del receptor CB₁

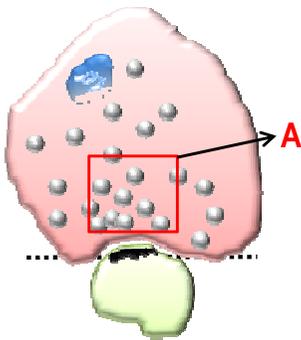
En la caracterización fenotípica subcelular de las TFP en ausencia de CB₁ en los CB₁-KO y su homólogo silvestre, CB₁-WT, se tuvo como objetivo analizar diversos parámetros anatómicos ultraestructurales. El análisis estadístico se aplicó a los datos resultantes de las micrografías electrónicas capturadas mediante el microscopio electrónico de alta resolución (22.000-28.000 aumentos). El número de animales empleados en cada uno de ambos grupos fue de 3.

Se estudió el número de contactos sinápticos establecidos por las TFP sobre las espinas dendríticas de las CP en CB₁-WT y CB₁-KO, y se presentaron los datos como la media \pm EEM utilizando el programa estadístico GraphPad (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc, San Diego, USA).

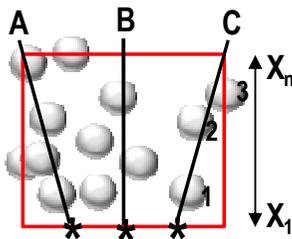
Mediante el programa Image-J (versión 1.43u, NIH, USA), se midieron el área de las TFP y de las espinas dendríticas de las CP así como el perímetro de las sinapsis, y se utilizó el mismo programa estadístico para el análisis de los resultados obtenidos. Los datos resultantes, se presentaron como la media \pm EEM. En todos los casos, los datos se

contrastaron mediante el test no-paramétrico para dos muestras independientes, el test *U* de Mann-Whitney, con un NC del 95% y considerando significativo un valor de $p < 0,05$.

En el estudio de las vesículas sinápticas, se establecieron algunos criterios que se mantuvieron en los diversos análisis hechos en las mismas.



Se seleccionaron las TFP cortadas transversalmente carentes de mitocondria (en azul) en la zona activa y se alinearon según su zona activa (línea discontinua). Se trazó un cuadrante de dimensiones constantes (A; área= $0,075\mu\text{m}^2$) dispuesto inmediatamente por encima de la sinapsis. Se contó el número de vesículas contenidas en el área A. Se tomó como criterio considerar aquellas que tocaran cualquiera de los lados del cuadrante A.



El cuadrado rojo, representa el cuadrante A. Para el estudio de la distribución de las vesículas muy cerca de la sinapsis, se trazó la línea central o B desde la base inferior del cuadrante. Se trazó una línea desde la mitad de cada lado establecido por la línea central B, las líneas A y C que cruzan por el ápice superior del cuadrante. Las tres líneas, establecen el punto base (asterisco) a partir del cual se empezó a medir la distancia (nm) a la que se hallaba cada vesícula de la zona activa (X_1 a X_n).

Se utilizó también el programa Image-J (versión 1.43u, NIH, USA), para el contaje del número de vesículas que poseen las TFP, la densidad de vesículas contenidas en las TFP (n° vesículas/ μm^2 TFP) así como el número de vesículas presentes en las cercanías de la sinapsis. El mismo programa se utilizó para medir la distancia (nm) de las vesículas sinápticas desde la base de dicho cuadrante, en ambos grupos de animales en los lóbulos objeto de estudio. En todos los casos, los datos se presentaron como la media \pm EEM utilizando el programa estadístico GraphPad (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc,

San Diego, USA). Debido a la distribución normal de los datos de densidad de las vesículas por área de TFP así como el de los datos del número de las vesículas en el cuadrante arriba descrito (zona activa), se aplicó el test *t de Student* para dos muestras independientes con un NC del 95% y considerando significativo un valor de $p < 0,05$. A los datos resultantes del análisis del número de vesículas por TFP se les aplicó el equivalente no-paramétrico para dos muestras independientes, el test *U de Mann-Whitney*, así como el test *t de Student* con un NC del 95% y considerando significativo un valor de $p < 0,05$. Se midió la distancia (nm) desde la zona activa a cada vesícula mediante el programa Image-J (versión 1.43u, NIH, USA), y se mostraron los resultados como la frecuencia de las vesículas en los rangos previamente establecidos por nosotros.

5. RESULTADOS

En este estudio empleamos distintas técnicas inmunohistoquímicas que nos permitieron analizar el patrón de distribución de los diversos componentes del SEC en la corteza cerebelosa de la rata desde edades tempranas en el desarrollo postnatal (P0, P5 y P12) hasta la edad adulta [animal adulto joven (P21) y en el adulto de 8 semanas (AD)] tanto a nivel celular como a nivel subcelular.

5.1. MICROSCOPIA CONVENCIONAL

Para un primer acercamiento, se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas para microscopía convencional para cada proteína objeto de este estudio.

5.1.1. Patrón de expresión de CB₁ en la corteza cerebelosa de la rata

A través de la técnica inmunohistoquímica de la avidina-biotina-peroxidasa, pusimos de relieve la distribución de CB₁ durante el desarrollo postnatal temprano (P0, P5, P12), P21 y adulto (AD).

Durante este periodo (Fig. 18A-C), la corteza cerebelosa muestra la CGE, capa adicional que desaparece a medida que dicha corteza va adquiriendo el patrón adulto (Fig. 18D,E). A P0, a P5 y a P12, la CGE mostró un débil y homogéneo inmunomarcado del neuropelo (Fig. 18A-C). La CM, que con la edad va ocupando una región más extensa y que alcanza el límite inferior de la CGE, resultó inmunopositiva para CB₁ (Fig. 18A-C). Este último exhibió mayor inmunomarcado que la CGE. La CM, capa recién generada, refleja un patrón de expresión similar al adulto desde P12, con la distribución en forma de puntos inmunopositivos típica de los botones terminales de las FP (Fig. 18C). Cabe destacar, el gradiente ascendente de superficial a profundo del marcaje de CB₁ de la CM siendo más notorio a P12 que a edades más tempranas (Fig. 18C). También a P12, en la capa de las células de Purkinje (CCP), el receptor delimitó los somas de las CP (Fig. 18C,*) comenzándose a intuir los relieves de la formación “*pinceau*” (Fig. 18C, punta flecha).

En el animal adulto joven (P21) y en el AD (Fig. 18D,E), la expresión de CB₁ en la corteza cerebelosa mostró su patrón típico, donde la inmunorreactividad para CB₁ se concentró en la CM repleta de puntos inmunopositivos, sugiriendo su localización en los

botones terminales de las FP. En la CCP, el CB₁ delimitó los somas de las CP donde puso de relieve la formación “*pinceau*” que forman las células “en cesto” (Fig. 18,D,E punta flecha).

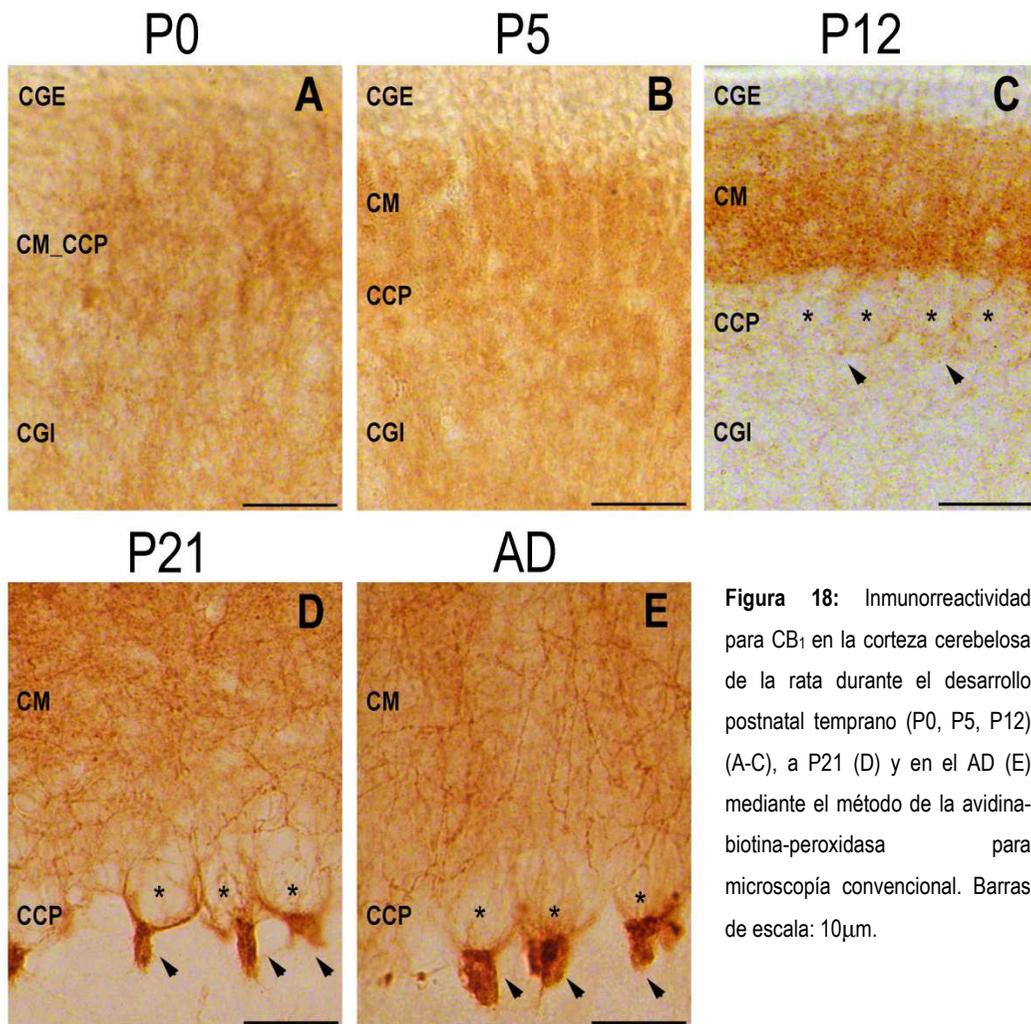


Figura 18: Inmunorreactividad para CB₁ en la corteza cerebelosa de la rata durante el desarrollo postnatal temprano (P0, P5, P12) (A-C), a P21 (D) y en el AD (E) mediante el método de la avidina-biotina-peroxidasa para microscopía convencional. Barras de escala: 10μm.

5.1.2. Patrón de expresión de DAGL- α en la corteza cerebelosa de la rata

A las edades postnatales tempranas estudiadas (P0, P5 y P12), la CGE mostró un inmunomarcado a modo de puntos sobre un neuropelo homogéneamente inmunorreactivo (Fig. 19A-C). La CM, exhibió un patrón inmunopositivo intenso para el enzima delineando la región somatodendrítica de las CP (Fig. 19A-C) que se hizo más notable a P12 debido al desarrollo del árbol dendrítico de las mismas (Fig. 19C).

En la corteza cerebelosa del animal adulto joven (P21) y en el AD (Fig. 19D,E), la inmunorreactividad para DAGL- α se restringió a la CM. Esta capa exhibió un patrón inmunopositivo intenso que delineó los árboles dendríticos y espinas dendríticas de las CP.

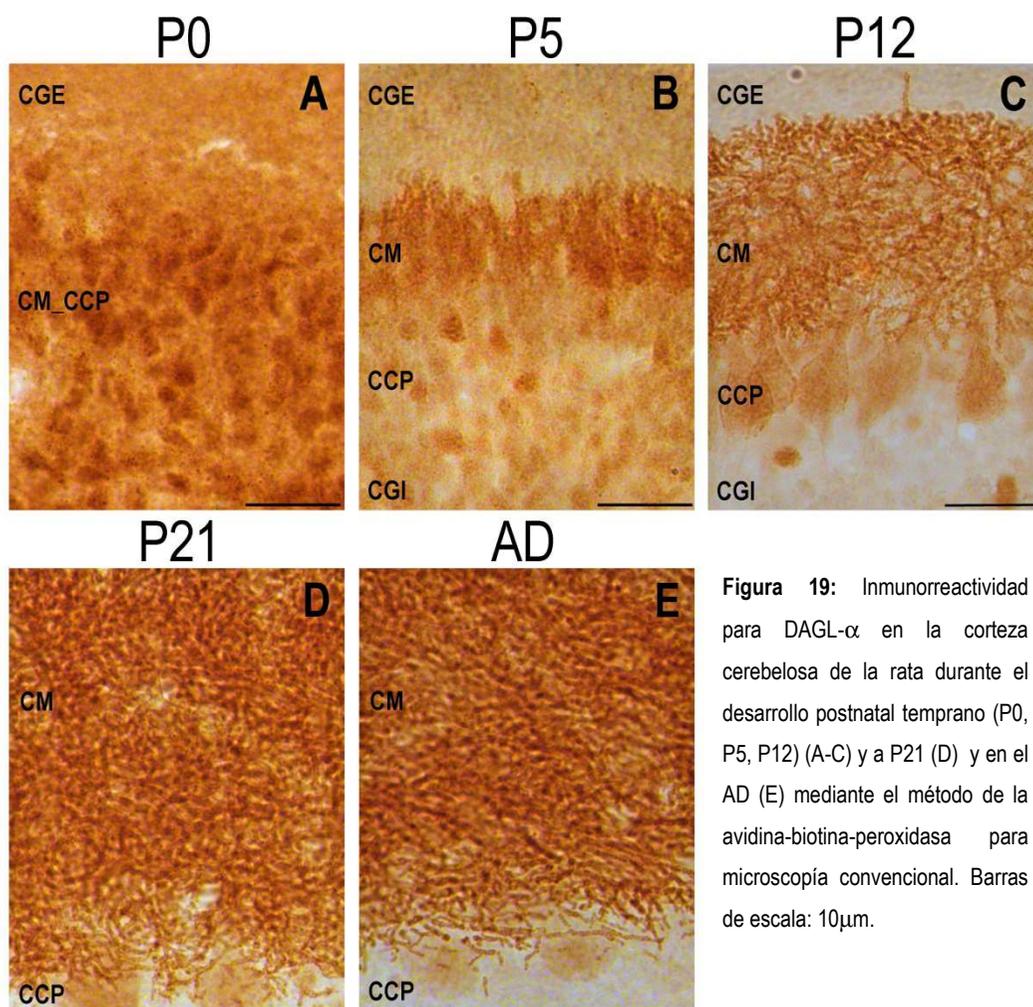


Figura 19: Inmunorreactividad para DAGL- α en la corteza cerebelosa de la rata durante el desarrollo postnatal temprano (P0, P5, P12) (A-C) y a P21 (D) y en el AD (E) mediante el método de la avidina-biotina-peroxidasa para microscopía convencional. Barras de escala: 10 μ m.

5.1.3. Patrón de expresión de MAGL en la corteza cerebelosa de la rata

En las edades postnatales estudiadas (P0, P5 y P12), el neuropelo homogéneamente inmunomarcado de la CGE así como los puntos inmunopositivos sobre el mismo, mostraron un incremento notorio para MAGL según avanza la edad (Fig. 20A-C). En cuanto a la CM_CCP, a P0 y a P5, la inmunopositividad para MAGL mostró un patrón punteado sobre la superficie somatodendrítica de las CP (Fig. 20A,B,*). Además, exhibió una pequeña cantidad de puntos inmunopositivos en el neuropelo de la interfase entre la CM y la CCP, sobre todo a P5 (Fig. 20B). A P12 (Fig. 20C), el inmunomarcado para MAGL se concentró mayoritariamente en la CM donde mostró un gradiente creciente de superficial a profundo, presumiblemente correspondiente a los botones terminales de las FP. Los somas de las CP (Fig. 20A-C) resultaron inmunonegativos para dicho enzima.

A P21 y en el AD (Fig. 20D,E), la inmunopositividad para MAGL en la corteza cerebelosa se restringió a la CM. Dicha capa, exhibió múltiples puntos inmunopositivos para MAGL sobre el neuropelo que confería una tinción uniforme de la capa, lo que sugirió su posición presináptica típica final en los botones terminales de las FP. Los somas de las CP de la CCP no mostraron inmunorreactividad para el enzima (Fig. 20D,E,*).

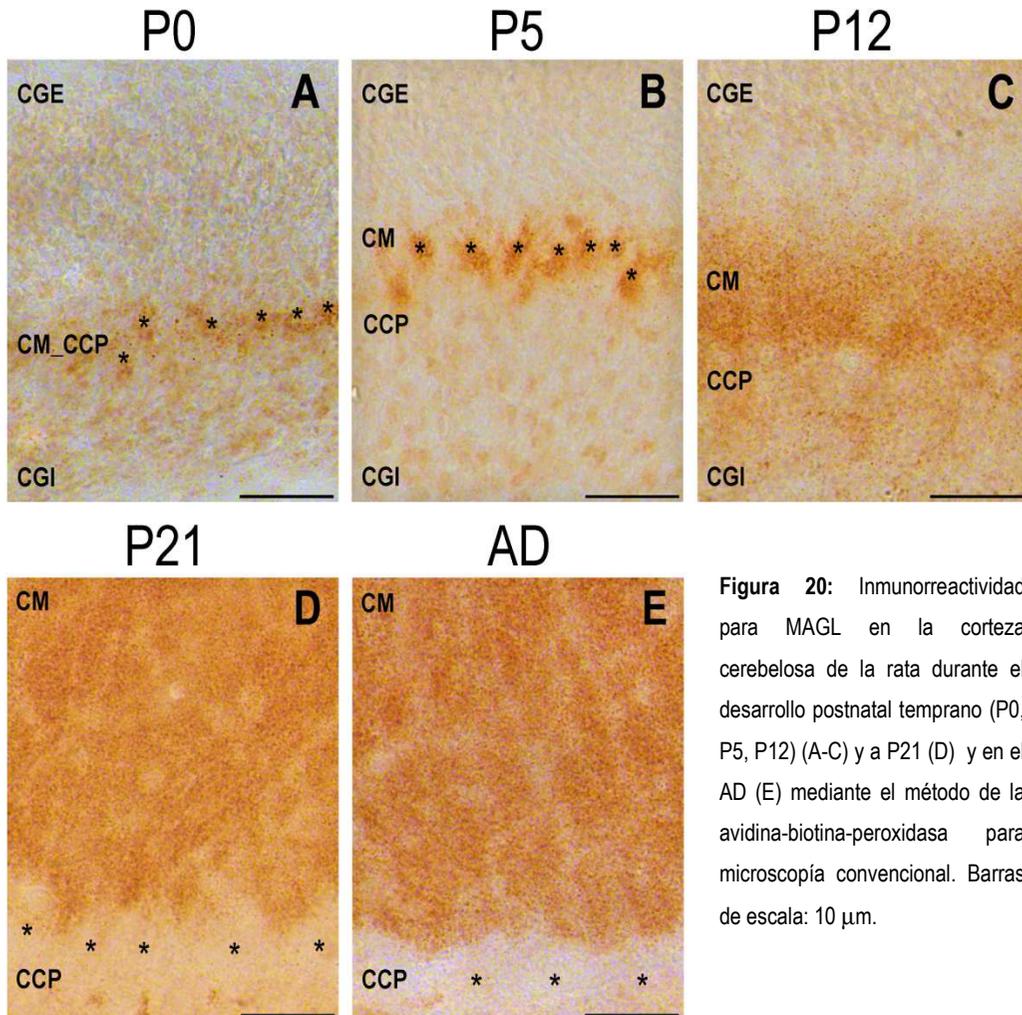


Figura 20: Inmunoreactividad para MAGL en la corteza cerebelosa de la rata durante el desarrollo postnatal temprano (P0, P5, P12) (A-C) y a P21 (D) y en el AD (E) mediante el método de la avidina-biotina-peroxidasa para microscopía convencional. Barras de escala: 10 μm .

Con objeto de analizar la localización precisa de estos componentes del SEC a nivel subcelular, empleamos la técnica de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica.

5.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

5.2.1. Localización del SEC en el desarrollo neuronal postnatal

5.2.1.1. Análisis del patrón de distribución subcelular del receptor cannabinoide CB₁

Se identificaron los distintos compartimentos de las FP de las CG de la corteza cerebelosa de la rata en los estadios tempranos del desarrollo postnatal estudiados (P0, P5, P12) y a P21 y en el AD (Fig. 21) utilizando criterios ultraestructurales (*Rakic y Sidman, 1973*). Una vez identificados, se abordó el análisis semi-cuantitativo de la distribución de las inmunopartículas que identificaron el receptor en dichos perfiles. Finalmente, se analizó la densidad de marcado (nº inmunopartículas/ μm) para CB₁.

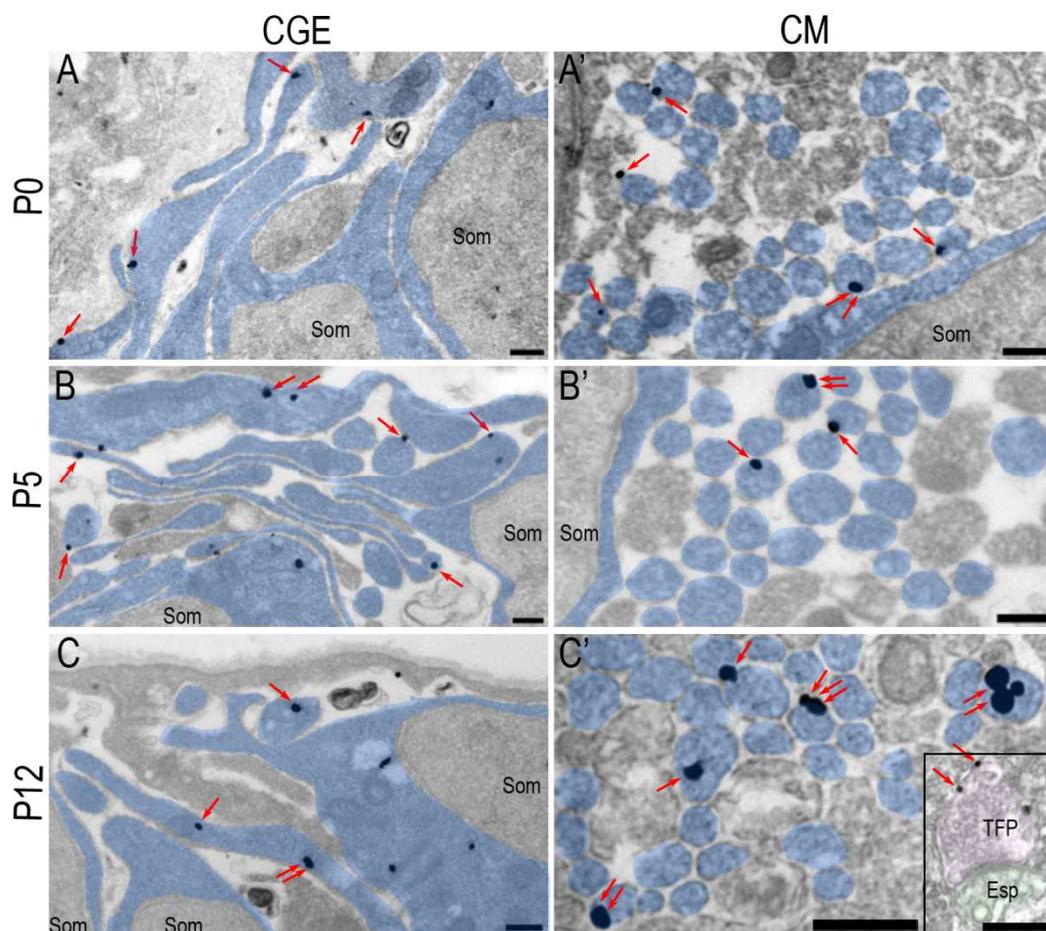


Figura 21: (A-C') Localización subcelular de CB₁ en los distintos compartimentos de las CG en los días 0 (A, A'), 5 (B, B') y 12 (C, C') del desarrollo postnatal. Método de inmuno-oro preinclusión. Las micrografías electrónicas A, B y C ilustran la CGE con los somas de las CG en descenso y sus característicos procesos axónicos inmaduros en proceso de diferenciación y crecimiento (en azul) que muestran partículas de oro en su membrana señalando CB₁ (flechas) en todas las edades estudiadas. En A', B' y C' se puede observar la CM llena de las varicosidades y axones de las FP (flechas). A P12, el receptor, además muestra ya su característica posición final (flechas) en la TFP (recuadro en C'). CGE, capa granular externa; CM, capa molecular; TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina; Som, soma. Barras de escala: 0,250 μ m.

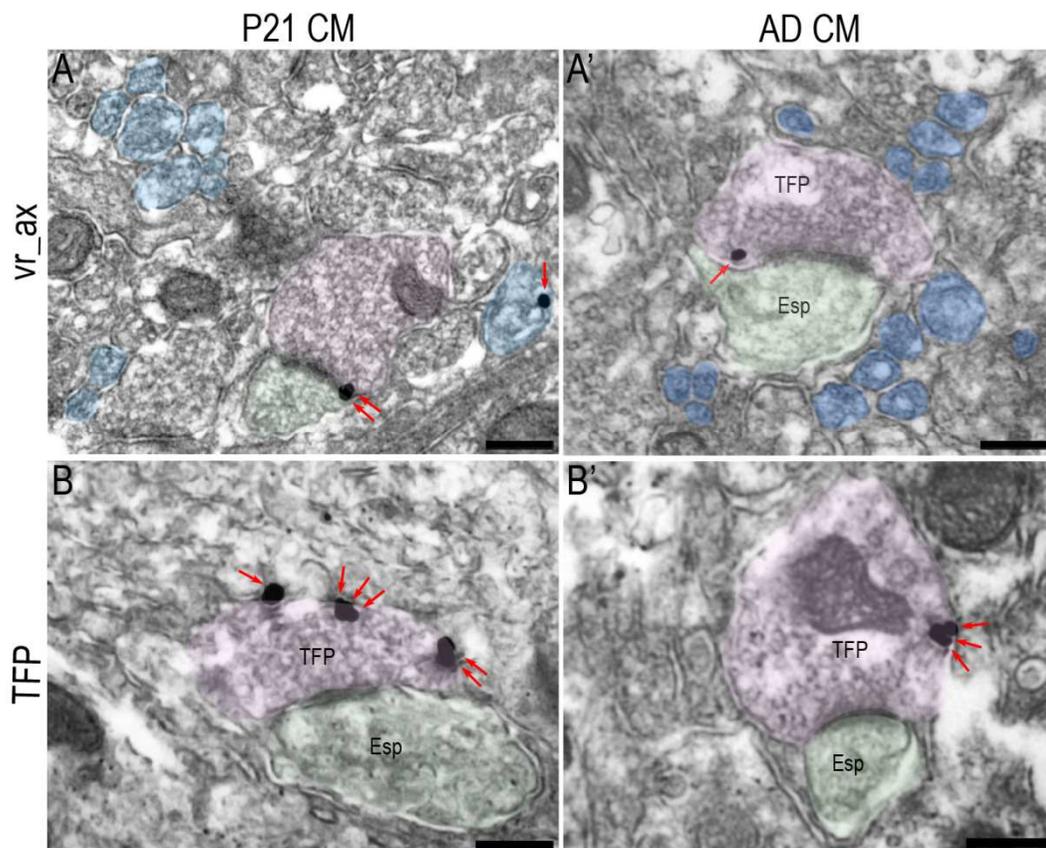


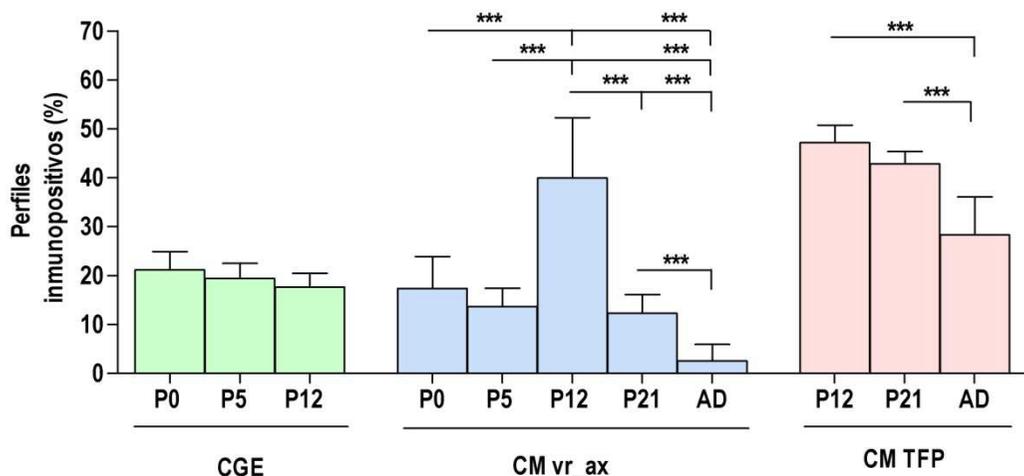
Figura 22: (A-B') Localización subcelular de CB₁ en el día 21 del desarrollo postnatal (A, B) y en el AD (A', B'). Método de inmuno-oro preinclusión. En A y A', se muestran las varicosidades y axones de las FP de la CM (en azul) que presentan, a estas edades más avanzadas, muy pocas partículas de oro en su membrana (flechas) siendo esta ausencia más notable en el AD. En B y B', se puede observar su posición final presináptica (indicado con flechas) sobre la membrana plasmática del botón terminal de las FP (rosa). CM, capa molecular; vr_ax, varicosidad_axón; TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina. Barras de escala: 0,250 μ m.

En la CGE, el CB₁ estuvo presente en la membrana de los procesos axónicos inmaduros de las CG mientras están sufriendo los procesos de morfogénesis a estas edades tempranas del desarrollo postnatal (su crecimiento axónico) (Fig. 21,A-C). Las partículas metálicas se distribuyeron igualmente a lo largo de toda la profundidad de la CGE, desde las inmediaciones piales a las zonas más profundas, lo que indicó que el receptor estuvo presente en la membrana de los procesos de las CGE en diferentes fases

del desarrollo como son la proliferación, diferenciación, crecimiento axónico y la migración tangencial, desde P0 hasta P12 (Fig. 21, A-C). De hecho, en dicha capa, el porcentaje de procesos axónicos inmunopositivos para este receptor en la CGE permaneció estable desde P0 hasta P12 ($21,12\pm 3,74\%$ a P0; $19,38\pm 3,11\%$ a P5; $17,62\pm 2,80\%$ a P12) (Fig. 23). En la CM (Fig. 21, A'-C'), por su parte, el porcentaje de varicosidades y axones de las CG que mostraron CB₁ en su membrana, creció de manera altamente significativa a P12 (Fig. 21, C' y 23); el $39,92\pm 12,34\%$ de las varicosidades y axones presentaron partículas de oro señalando CB₁ en su membrana, mientras que sólo un $17,35\pm 6,53\%$ y $13,62\pm 3,82\%$ de estos perfiles a P0 y a P5, respectivamente (Fig. 21, A'-B' y 23), resultó inmunopositivo para el receptor.

Cabe destacar, que a P12 aparece un nuevo perfil en la CM correspondiente a los botones terminales de las fibras paralelas que establecen sinapsis asimétricas y por tanto, de carácter excitador, sobre las espinas dendríticas de las CP (ver figura 21 recuadro en C'). El $47,14\pm 3,61\%$ de las TFP a P12 mostró partículas de oro en su membrana señalando el CB₁ (Fig. 23).

Una vez estudiada la distribución de CB₁ en estas edades postnatales tempranas se contrastó con aquella del animal adulto (P21 y AD) (Fig. 22, A, A', B, B'). A estas edades adultas, el porcentaje de las varicosidades y axones marcados fue claramente menor que lo observado a P12; el $12,27\pm 3,86\%$ de varicosidades y axones inmunopositivos a P21 (Fig. 22, A y 23) y $2,54\pm 3,39\%$ de los mismos en el AD (Fig. 22, A' y 23), frente al $39,92\pm 12,34\%$ de las varicosidades y axones marcados a P12 (Fig. 21, C' y 23). A P21 (Fig. 22, B y 23), el porcentaje de las TFP inmunopositivas para CB₁ permaneció sin cambios significativos respecto al porcentaje observado a P12, siendo éste del $42,84\pm 2,54\%$. Sin embargo, el porcentaje de las TFP de las CG inmunopositivas para CB₁ en el AD (Fig. 22, B' y 23), mostró una reducción altamente significativa respecto al P12; sólo un $28,31\pm 7,77\%$ de las TFP mostró partículas de oro en su membrana (Fig. 23).



EDAD POSTNATAL	CAPA	COMPARTIMENTO	χ^2	VALOR de p
P0 vs P5	CGE	Procesos de las CG	0,13	0,7138
P0 vs P12	CGE	Procesos de las CG	0,62	0,4308
P5 vs P12	CGE	Procesos de las CG	0,19	0,6625
P0 vs P5	CM	Varicosidad_axón	2,20	0,1377
P0 vs P12	CM	Varicosidad_axón	134,10	<0,0001
P0 vs P21	CM	Varicosidad_axón	0,19	0,6657
P0 vs AD	CM	Varicosidad_axón	31,08	<0,0001
P5 vs P12	CM	Varicosidad_axón	192,20	<0,0001
P5 vs P21	CM	Varicosidad_axón	0,55	0,4570
P5 vs AD	CM	Varicosidad_axón	24,20	<0,0001
P12vs P21	CM	Varicosidad_axón	65,29	<0,0001
P12 vs AD	CM	Varicosidad_axón	136,20	<0,0001
P21 vs AD	CM	Varicosidad_axón	24,73	<0,0001
P12vs P21	CM	TFP	0,76	0,3835
P12 vs AD	CM	TFP	11,37	0,0007
P21 vs AD	CM	TFP	14,27	0,0002

Figura 23: Análisis estadístico del porcentaje de los distintos compartimentos de las CG inmunopositivos para CB₁. Los resultados del test de la chi-cuadrado se recogen en la tabla; Chi-cuadrado p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***. El área total estudiada: 2415,12 μm^2 a P0, 1018,16 μm^2 a P5, 712,428 μm^2 a P12, 1898,52 μm^2 a P21 y 3413,45 μm^2 en el AD.

Tabla 3: Tabla resumen de la densidad de inmunopartículas (nºpartículas/ μ m membrana) de oro señalando el receptor CB₁. El resultado de la densidad se muestra como la media \pm EEM. Los resultados del test de Kruskal-Wallis, se recogen en la siguiente tabla; $p>0,05$ ns.

EDAD Y CAPA	COMPARTIMENTO	DENSIDAD (nºpartículas/ μ m)
P0 CGE	Procesos de las CG	0,2001 \pm 0,0588
P0 CM	Varicosidad_axón	0,2287 \pm 0,0710
P5 CGE	Procesos de las CG	0,1654 \pm 0,0218
P5 CM	Varicosidad_axón	0,2451 \pm 0,0487
P12 CGE	Procesos de las CG	0,1629 \pm 0,0167
P12 CM	Varicosidad_axón	0,5986 \pm 0,1985
P12 CM	TFP	0,7205 \pm 0,1226
P21 CM	Varicosidad_axón	0,6378 \pm 0,2498
P21 CM	TFP	0,4421 \pm 0,0227
AD CM	Varicosidad_axón	0,5618 \pm 0,1572
AD CM	TFP	0,3692 \pm 0,0500

CAPA	TEST DE KRUSKAL-WALLIS	VALOR de p
CGE	0,62	0,7326
CM vr_ax	5,67	0,2255
CM TFP	5,96	0,0509

Nuestros resultados muestran una presencia constante del receptor CB₁ en la membrana de los procesos axónicos de las CG en desarrollo dentro de la CGE en las edades postnatales estudiadas. Este marcado es homogéneo a lo largo de toda la profundidad de la capa donde están presentes los procesos de las CG en diferentes fases del desarrollo. El receptor CB₁ se muestra en los procesos de las CG que van formando la CM tanto en la membrana de los propios procesos, así como en las terminales que comienzan a establecer sinapsis con las espinas de las CP. A P12, se da un pico en la expresión de CB₁ tanto a nivel de varicosidades y axones de las FP como en sus botones terminales que se ve reducida en edades posteriores.

5.2.2.2. Análisis del patrón de distribución subcelular del enzima de síntesis del 2-AG, el diacilglicerol lipasa-alfa (DAGL- α)

Una vez conocido el patrón de distribución del receptor cannabinoide CB₁, quisimos analizar el patrón que muestra el enzima de síntesis del 2-AG, el DAGL- α , en los distintos compartimentos de las FP en las distintas edades objeto de este estudio.

En primer lugar, al igual que en el caso del receptor CB₁, se abordó el análisis semi-cuantitativo de la distribución de las inmunopartículas que señalaron el enzima y se analizó la densidad de marcado (nº inmunopartículas/ μ m) para DAGL- α . El estudio se realizó como en el caso anterior en las diferentes capas de la corteza cerebelosa en las que están presentes los procesos axónicos de las CG en desarrollo.

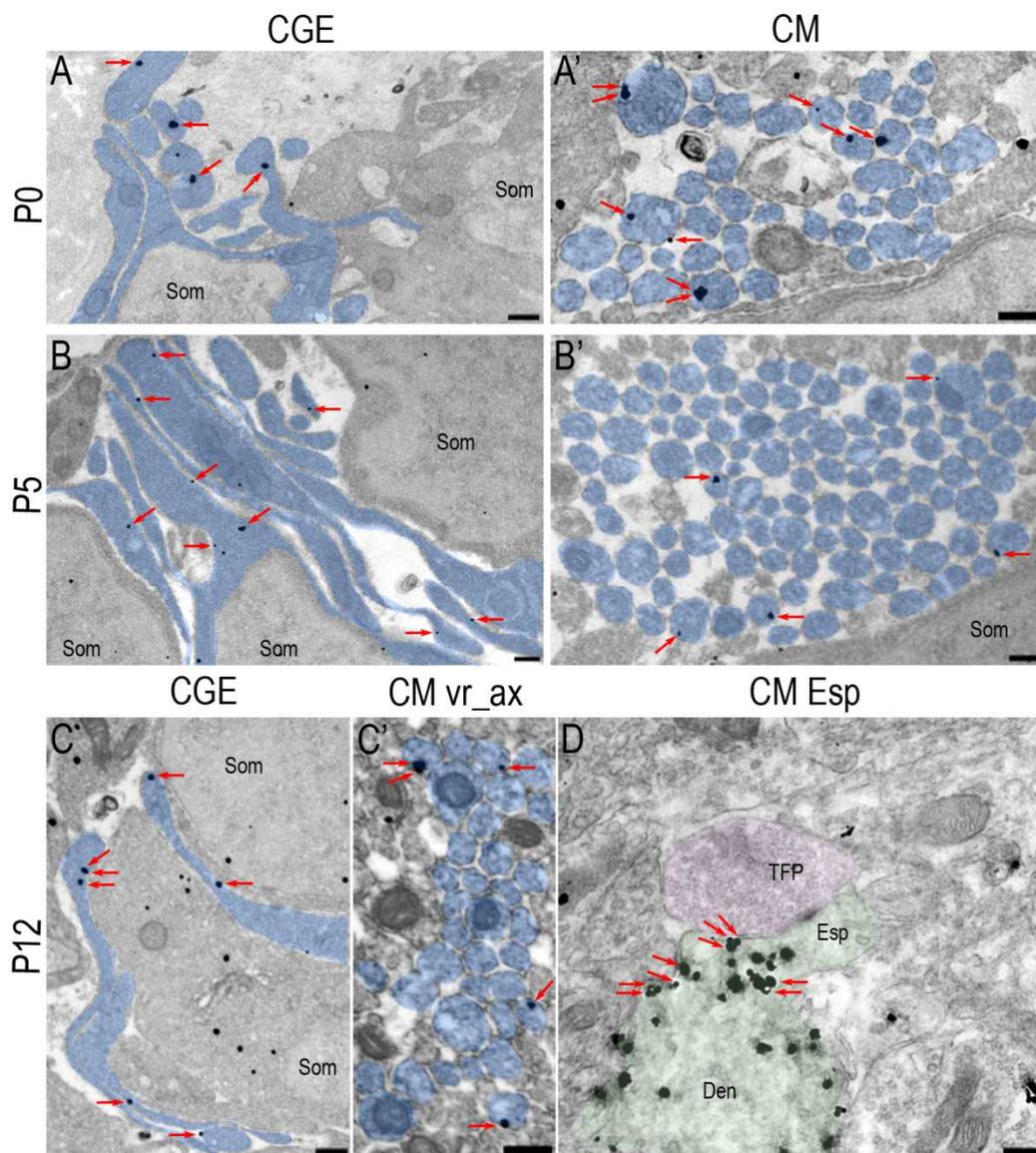


Figura 24: (A-D) Localización inmunocitoquímica del enzima DAGL- α en los distintos compartimentos de las CG a nivel subcelular a P0 (A, A'), P5 (B, B') y P12 (C, C', D). Método de inmuno-oro preinclusión. En A, B y C se muestran los procesos axónicos de las CG durante su morfogénesis, característicos de la CGE (en azul) que muestran partículas de oro en su membrana, señalando el DAGL- α (flechas). En A', B' y C' se observa la CM llena de las varicosidades y axones de las FP (en azul). A P12 (en D), comienza a expresarse en el compartimento postsináptico (indicado con flechas), concretamente en la base del cuello de las espinas dendríticas de las CP (en verde). CGE, capa granular externa; CM, capa molecular; TFP, terminal de la fibra paralela; vr_ax, varicosidad_axón; Esp, espina; Den, dendrita; Som, soma. Barras de escala: 0,250 μ m.

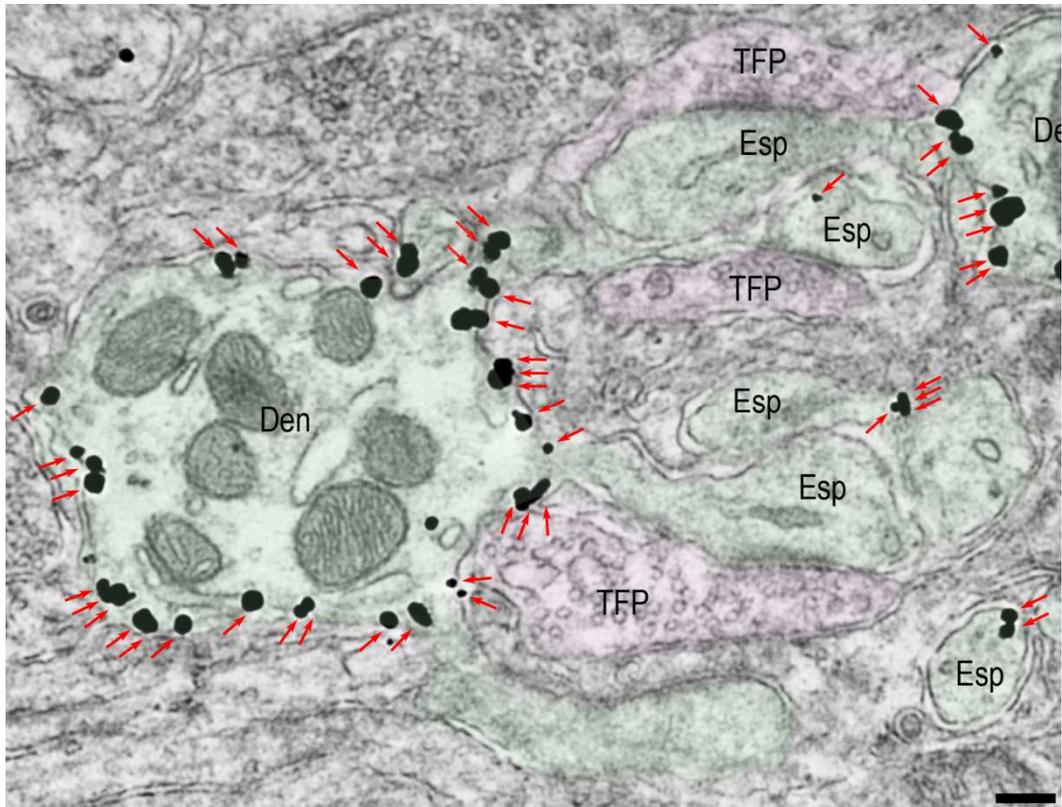


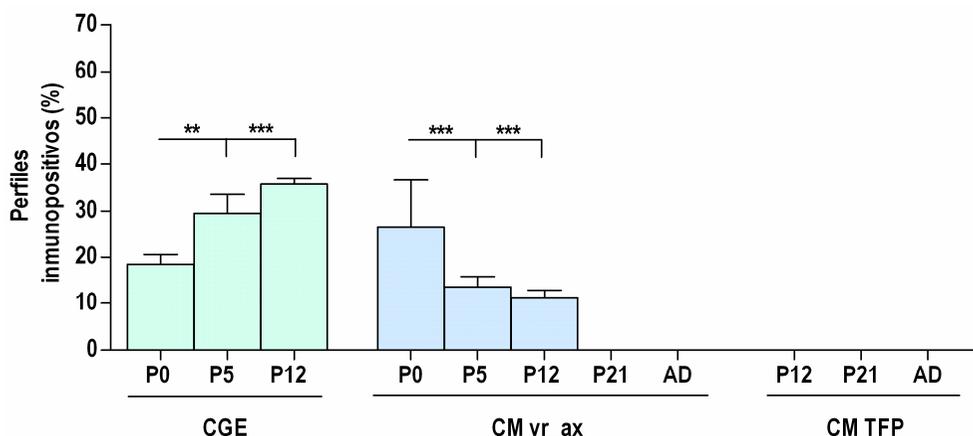
Figura 25: Localización inmunocitoquímica del enzima DAGL- α a nivel subcelular en el estadio adulto (P21 y AD). Método de inmuno-oro preinclusión. Se muestran las sinapsis de las TFP-CP donde el enzima (flechas) se localiza exclusivamente en el elemento postsináptico, en las dendritas y en las bases del cuello de las espinas dendríticas de las CP (en verde). Nótese la ausencia de inmunomarcado en las TFP (en rosa). TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina; Den, dendrita. Barras de escala: 0,250 μ m.

El DAGL- α estuvo presente en la membrana de los procesos axónicos inmaduros en proceso de proliferación, diferenciación y crecimiento tangencial. El inmuno-oro estuvo presente tanto en las estructuras superiores de la capa como en zonas más adyacentes al límite inferior, indicando su presencia en los procesos axónicos en diferentes fases de su desarrollo (Fig. 24,A,A',B,B',C,C'). En la CGE (Fig. 24,A-C), el porcentaje de estos compartimentos axónicos inmunopositivos para el enzima mostró un aumento muy significativo desde el nacimiento (P0) (Fig. 24,A y 26) alcanzando niveles significativamente mayores a P5 (Fig. 24,B y 26) y P12 (Fig. 24,C y 26). Concretamente, en este estadio más

temprano del desarrollo postnatal (P0), un $18,43 \pm 2,11\%$ de perfiles resultó inmunomarcado para DAGL- α , mientras que el $29,57 \pm 3,99\%$ de los mismos a P5 y el $35,74 \pm 1,15\%$ a P12 mostró partículas de oro en su membrana (Fig. 26).

En la CM (Fig. 24,A'-C'), las varicosidades y axones inmaduros de las FP mostraron ya a P0 la presencia del DAGL- α en su membrana. De hecho, el mayor porcentaje de dichos compartimentos inmunopositivos se observó a esta edad más temprana del desarrollo postnatal, siendo éste del $26,42 \pm 10,19\%$ (Fig. 24,A' y 26). Sin embargo, se observó un descenso altamente significativo del porcentaje de los perfiles inmunopositivos para el enzima en las edades posteriores estudiadas ($13,55 \pm 2,21\%$ y $11,09 \pm 1,79\%$ a P5 y P12, respectivamente) (Fig. 24,B',C' y 26). Este descenso fue acompañado de una presencia notable de este enzima en la base del cuello de las espinas dendríticas de las CP (Fig. 24,D).

A P21 y en el AD (Fig. 25 y 26), no se observó ninguna inmunorreactividad para el DAGL- α en las varicosidades ni axones de las FP así como tampoco se observó la presencia del enzima en los botones terminales de las FP. Este hecho, confirmó la expresión postsináptica del enzima una vez concluidos los procesos de maduración que tienen lugar en la corteza cerebelosa de la rata durante el desarrollo postnatal temprano.



EDAD POSTNATAL	CAPA	COMPARTIMENTO	χ^2	VALOR de p
P0 vs P5	CGE	Procesos de las CG	9,06	0,0026
P0 vs P12	CGE	Procesos de las CG	16,92	<0,0001
P5 vs P12	CGE	Procesos de las CG	2,16	0,1420
P0 vs P5	CM	Varicosidad_axón	13,40	0,0003
P0 vs P12	CM	Varicosidad_axón	17,27	<0,0001
P0 vs P21	CM	Varicosidad_axón	–	–
P0 vs AD	CM	Varicosidad_axón	–	–
P5 vs P12	CM	Varicosidad_axón	0,64	0,4224
P5 vs P21	CM	Varicosidad_axón	–	–
P5 vs AD	CM	Varicosidad_axón	–	–
P12 vs P21	CM	Varicosidad_axón	–	–
P12 vs AD	CM	Varicosidad_axón	–	–
P21 vs AD	CM	Varicosidad_axón	–	–
P12 vs P21	CM	TFP	–	–
P12 vs AD	CM	TFP	–	–
P21 vs AD	CM	TFP	–	–

Figura 26: Análisis estadístico del porcentaje de los perfiles de las CG inmunopositivos para el DAGL- α durante el desarrollo postnatal temprano. Los resultados del test de la chi-cuadrado se recogen en la tabla; Chi-cuadrado $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$. El área total estudiada a cada edad: 2026,48 μm^2 a P0, 2387,36 μm^2 a P5, 2276,32 μm^2 a P12, 1094,8 μm^2 a P21 y 1273,3 μm^2 en el AD de 8 semanas. Barras de escala: 0,250 μm .

Tabla 4: Tabla resumen de la densidad de inmunopartículas (nºpartículas/ μ m) de oro señalando el DAGL- α . El resultado de la densidad se muestra como la media \pm EEM. Los resultados del test de Kruskal-Wallis, se recogen en la en la siguiente tabla; $p < 0,05^*$.

EDAD POSTNATAL Y CAPA	COMPARTIMENTO	DENSIDAD (nºpartículas/ μ m)
P0 CGE	Procesos de las CG	0,2955 \pm 0,0248
P0 CM	Varicosidad_axón	0,4092 \pm 0,1106
P5 CGE	Procesos de las CG	0,1988 \pm 0,0191
P5 CM	Varicosidad_axón	0,1902 \pm 0,0088
P12 CGE	Procesos de las CG	0,2393 \pm 0,0409
P12 CM	Varicosidad_axón	0,2237 \pm 0,0104
P12 CM	TFP	–
P21 CM	Varicosidad_axón	–
P21 CM	TFP	–
AD CM	Varicosidad_axón	–
AD CM	TFP	–

CAPA	TEST DE KRUSKAL-WALLIS	VALOR de p
CGE	2,25	0,3248
CM vr_ax	12,72	0,0127(*)
CM TFP	–	–

Nuestros resultados muestran que el DAGL- α está presente en las inmediaciones de la membrana de los procesos axónicos inmaduros de las CG en la CGE así como en las varicosidades y axones de las FP de dichas células en la CM, desde el nacimiento. Este enzima resulta incrementado en los procesos axónicos en crecimiento y navegación de las CG de la CGE con la edad; a la vez, durante dicho periodo se va perdiendo su expresión en las varicosidades y axones de estas fibras en la CM para comenzar a expresarse en el compartimento postsináptico, concretamente en la base del cuello de las espinas dendríticas de las CP, localización que mantendrá en el adulto.

5.2.2.3. Análisis del patrón de distribución subcelular del enzima de degradación del 2-AG, el monoacilglicerol lipasa (MAGL)

Por último, estudiamos la distribución subcelular del principal enzima de degradación del 2-AG, el MAGL. Abordamos el análisis semi-cuantitativo de la distribución de las inmunopartículas señalando el enzima en los distintos compartimentos de las FP, como se hizo para el receptor CB₁ y el DAGL- α . En este caso, además del análisis de la densidad de marcado en membrana (nº inmunopartículas/ μm), se analizó también la densidad de las inmunopartículas citoplasmáticas (nº partículas/ μm^2) indicando el MAGL, debido a los cambios que podían darse en relación a su posición tanto en las inmediaciones de la membrana como en el citoplasma durante el desarrollo postnatal.

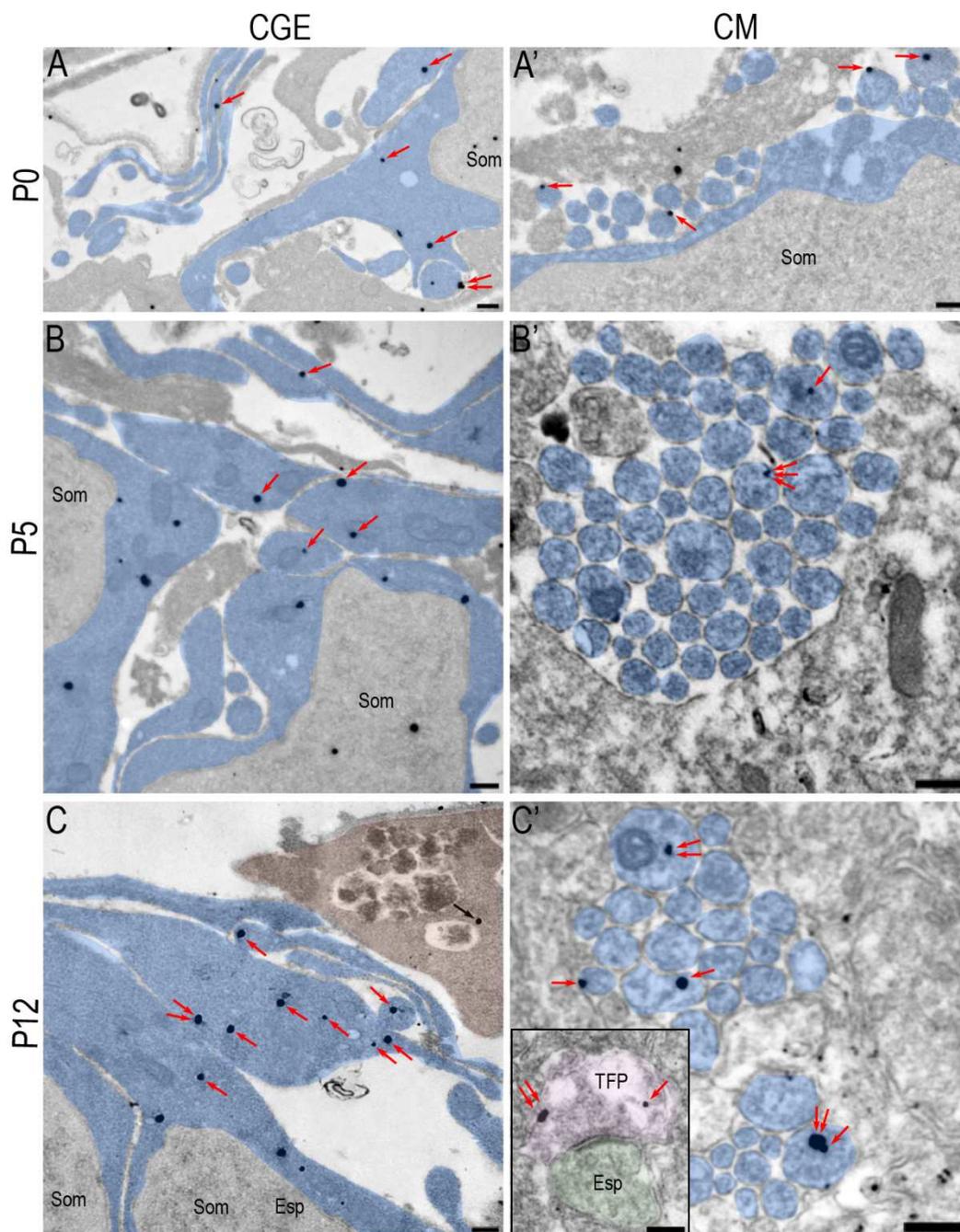


Figura 27: (A-C') Localización subcelular de MAGL en los compartimentos de las CG a P0 (A, A'), P5 (B, B') y P12 (C, C'). Método de inmuno-oro intensificado con plata preinclusión para microscopía electrónica. Las micrografías electrónicas en A, B y C ilustran los procesos axónicos de las CG en crecimiento y navegación en la CGE (en azul) que muestran partículas de oro que señalan MAGL (flechas) en su membrana así como en el citoplasma. Apréciase en C, el proceso de

la GB (en marrón) que contiene partículas de oro indicando el MAGL (flecha negra) en su citoplasma. En A', B' y C' se muestra la CM. En ellas, las inmunopartículas que marcan el MAGL (flechas) se localizan en la membrana y en el citoplasma de las varicosidades y axones de las FP (en azul). Nótese en C', a P12, la presencia del MAGL en la membrana así como en el citoplasma de la TFP (flechas en recuadro en C'). CGE, capa granular externa; CM, capa molecular; TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina. Barras de escala: 0,250 μ m.

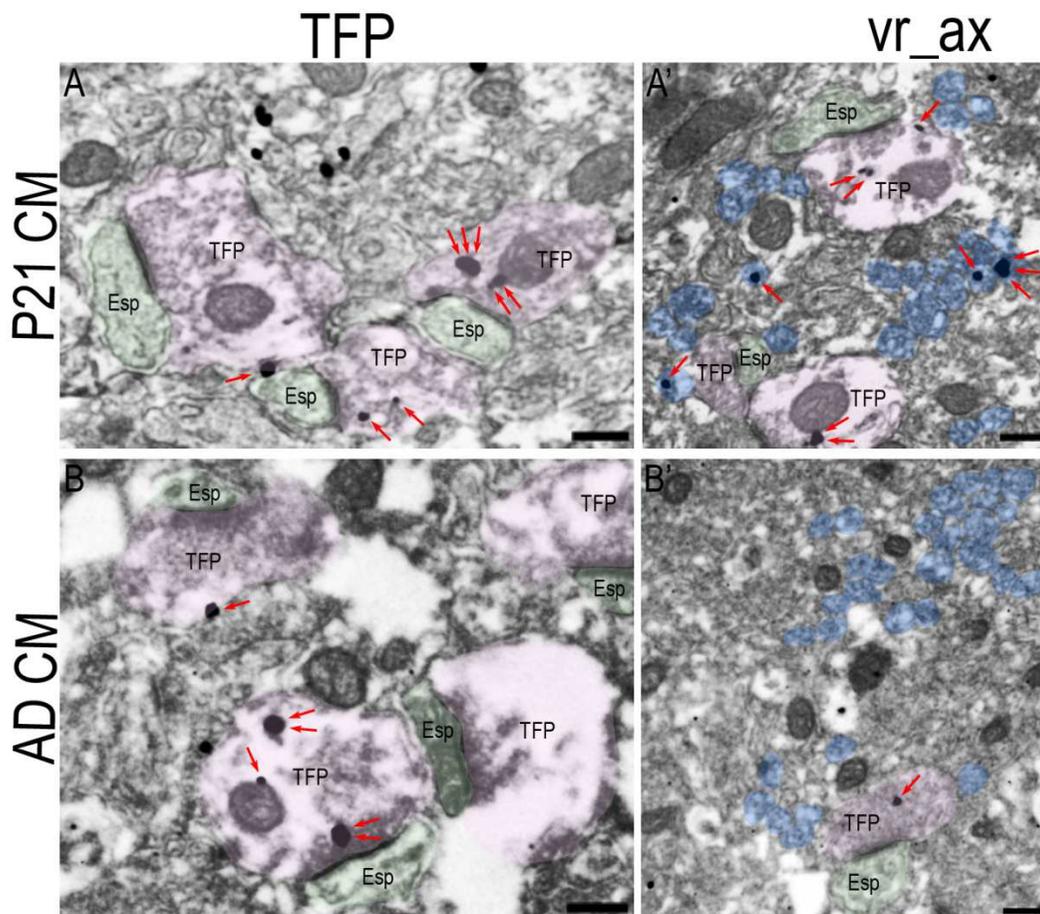


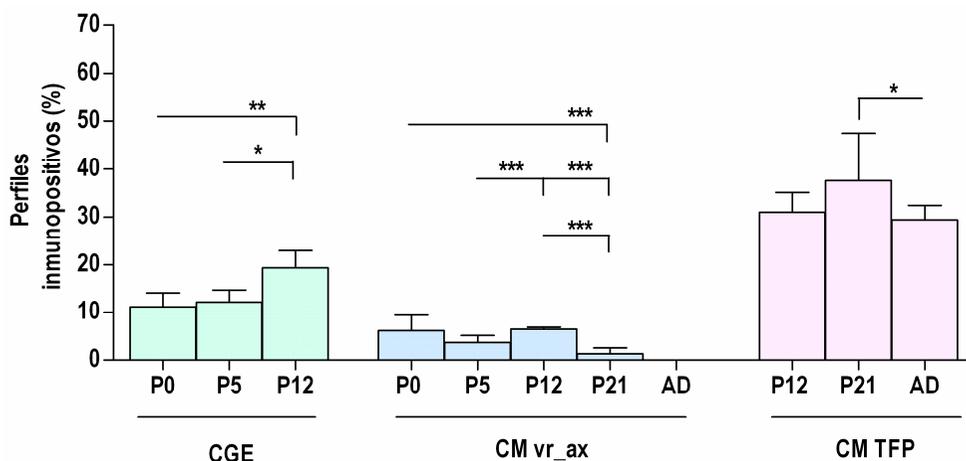
Figura 28: (A-B') Localización subcelular de MAGL en las FP a P21 (A, A') y en el AD (B, B'). Método de inmuno-oro preinclusión. En las micrografías electrónicas A' y B' se observan las varicosidades y axones que muestran un reducido número de inmunopartículas señalando el MAGL (flechas). En A, las inmunopartículas señalando el MAGL se localizan tanto en yuxtaposición a la membrana como en el citoplasma de las TFP (véase también en A'). En B, se puede observar su posición final, prevalentemente dentro del botón terminal de las FP (flechas) (véase también en B'). CM, capa molecular; TFP, terminal de la fibra paralela; vr_ax, varicosidad_axón; Esp, espina. Barras de escala: 0,250 μ m.

El enzima MAGL estuvo presente en los perfiles correspondientes a los procesos axónicos de las CG en la CGE (Fig. 27,A,B,C) desde el nacimiento; a P0 (Fig. 27,A y 29) el $11,10 \pm 2,90\%$ de los compartimentos axónicos mostró partículas de oro indicando el MAGL. Este porcentaje se mantuvo sin cambios a P5 (Fig. 27,B y 29), donde el porcentaje de perfiles inmunomarcados fue del $12,10 \pm 2,60\%$; a P12 (Fig. 27,C y 29), se observó un aumento significativo del porcentaje de los perfiles inmunopositivos para MAGL, siendo éste del $19,34 \pm 3,61\%$.

En la CM (Fig. 27,A',B',C'), el MAGL estuvo presente en las varicosidades y axones de las FP desde P0. A esta edad (Fig. 27,A' y 29), el $6,1 \pm 3,27\%$ de dichos compartimentos resultó inmunopositivo para el MAGL, a P5 (Fig. 27,B' y 29) fue del $3,63 \pm 1,49\%$ y a P12 (Fig. 27,C' y 29) del $6,44 \pm 0,40\%$. Más tarde, en el desarrollo postnatal, a P21 (Fig. 28,A' y 29), el porcentaje fue del $1,29 \pm 1,23\%$ y se redujo hasta prácticamente desaparecer en el AD (Fig. 28,B' y 29).

A P12 (Fig. 27,C', recuadro y 29), el inmunomarcado para el enzima correspondiente a los botones sinápticos de las FP de la CM fue del $31,03 \pm 4,10\%$. A P21 (Fig. 28,A y 29) el $37,59 \pm 9,84\%$ de las TFP y un $29,43 \pm 3,03\%$ de las mismas en el animal adulto (Fig. 28,B y 29) mostró inmunopositividad para el MAGL.

Asimismo, se observaron partículas de oro señalando el MAGL en el interior de los procesos de la GB (Fig. 27,C).



EDAD POSTNATAL	CAPA	COMPARTIMENTO	χ^2	VALOR de p
P0 vs P5	CGE	Procesos de las CG	1,04	0,3072
P0 vs P12	CGE	Procesos de las CG	8,70	0,0032
P5 vs P12	CGE	Procesos de las CG	5,35	0,0207
P0 vs P5	CM	Varicosidad_axón	2,23	0,1349
P0 vs P12	CM	Varicosidad_axón	1,16	0,2820
P0 vs P21	CM	Varicosidad_axón	49,42	<0,0001
P0 vs AD	CM	Varicosidad_axón	–	–
P5 vs P12	CM	Varicosidad_axón	14,37	0,0002
P5 vs P21	CM	Varicosidad_axón	40,23	<0,0001
P5 vs AD	CM	Varicosidad_axón	–	–
P12 vs P21	CM	Varicosidad_axón	83,25	<0,0001
P12 vs AD	CM	Varicosidad_axón	–	–
P12 vs P21	CM	TFP	1,67	0,1960
P12 vs AD	CM	TFP	0,42	0,5189
P21 vs AD	CM	TFP	4,57	0,0326

Figura 29: Análisis estadístico del porcentaje de los distintos compartimentos de las CG inmunopositivos para MAGL. Los resultados del test de la chi-cuadrado se recogen en la tabla; Chi-cuadrado $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$. El área total estudiada a cada edad: $1970,96 \mu\text{m}^2$ a P0, $3109,12 \mu\text{m}^2$ a P5, $2970,32 \mu\text{m}^2$ a P12, $1165,92 \mu\text{m}^2$ a P21 y $999,36 \mu\text{m}^2$ en el AD de 8 semanas.

Debido al carácter citoplasmático del MAGL, quisimos conocer su prevalencia con respecto a la posición que ocupa dentro del citoplasma en relación a la membrana en los distintos compartimentos de las CG a las edades estudiadas. Para ello, se analizó la densidad de partículas de oro/ μm de membrana así como la densidad de partículas de oro en el citoplasma (partículas/ μm^2).

Este análisis reveló que el MAGL se distribuye tanto en las cercanías de la membrana como en el citoplasma de los procesos axónicos inmaduros de las CG de la CGE y en la de las varicosidades y axones de las FP de la CM. Respecto a la localización del enzima en las TFP, éste se localizó tanto en la membrana como en el citoplasma hasta el AD, donde el MAGL mostró una posición final casi exclusivamente citoplasmática.

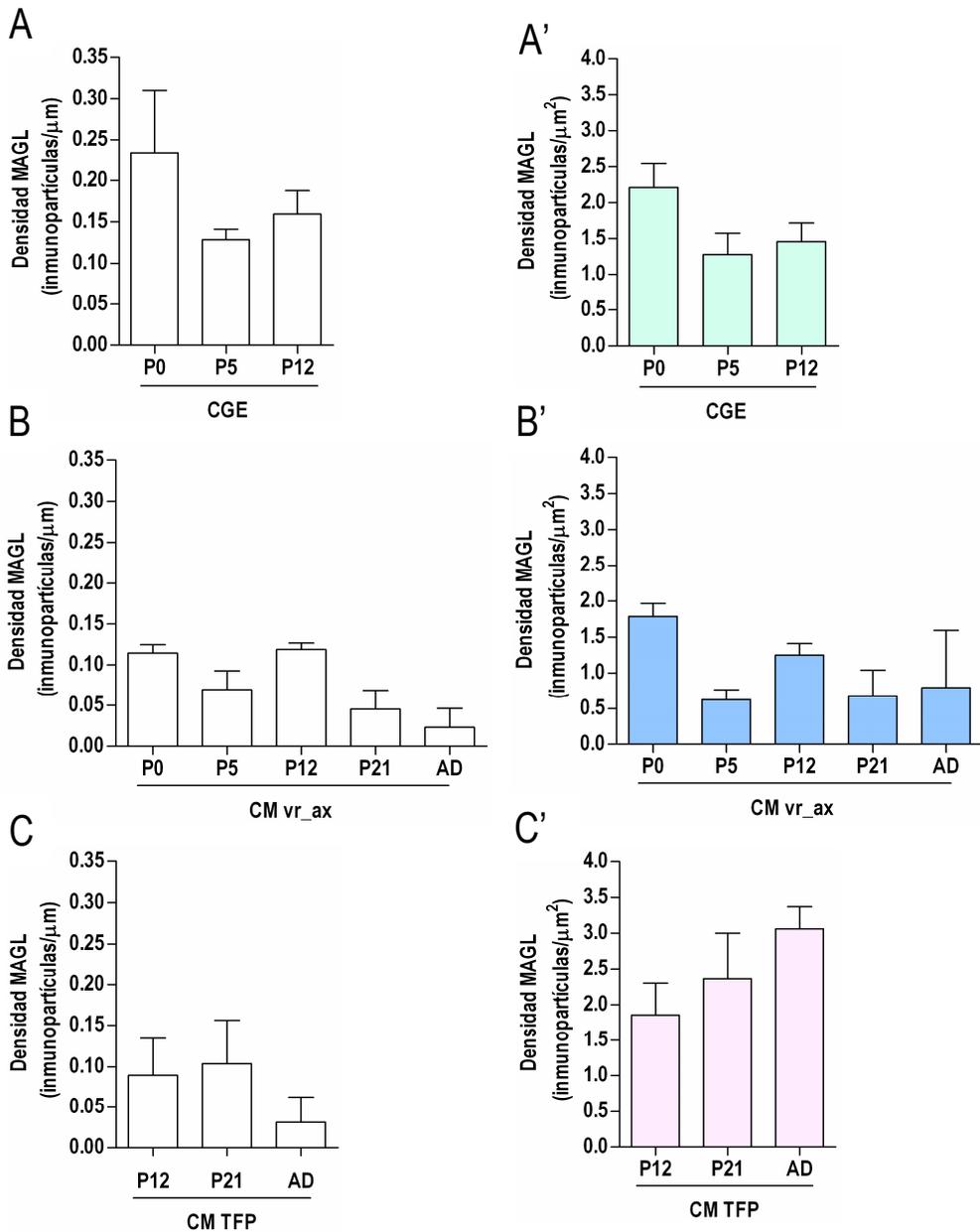


Figura 30: Análisis estadístico de la densidad de inmunopartículas/ μm de membrana y de inmunopartículas/ μm^2 de citoplasma en los distintos compartimentos de las CG. El MAGL, está presente tanto en la membrana como en el citoplasma de los procesos axónicos inmaduros de las CG de la CGE a P0, P5 y P12 (Fig. 30,A,A') y se localiza también en ambas localizaciones en las varicosidades y axones de las FP de la CM (Fig. 30,B,B'). Véase también la presencia tanto en la membrana como en el citoplasma de las TFP a P12 y a P21 y la localización prácticamente exclusiva en el citoplasma de las TFP en el AD (Fig. 30,C,C').

Tabla 5: Tabla resumen de la densidad de inmunopartículas/ μm de membrana y de partículas/ μm^2 en el citoplasma señalando el MAGL. Dichas partículas de oro indican el enzima en los distintos compartimentos de las CG durante el desarrollo cerebeloso postnatal temprano así como en las ratas adultas jóvenes P21 y AD de 8 semanas. El resultado de la densidad se muestra como la media \pm EEM. Los resultados del test de Kruskal-Wallis, se recogen en la siguiente tabla; $p>0,05$ ns.

EDAD Y CAPA	COMPARTIMENTO	DENSIDAD (n°partículas/ μm)	DENSIDAD (n°partículas/ μm^2)
P0 CGE	Procesos de las CG	0,2343 \pm 0,0755	2,211 \pm 0,3355
P0 CM	Varicosidad_axón	0,1145 \pm 0,0102	1,787 \pm 0,1800
P5 CGE	Procesos de las CG	0,1285 \pm 0,0124	1,279 \pm 0,2945
P5 CM	Varicosidad_axón	0,0695 \pm 0,0232	0,629 \pm 0,1373
P12 CGE	Procesos de las CG	0,1595 \pm 0,0283	1,458 \pm 0,2618
P12 CM	Varicosidad_axón	0,1189 \pm 0,0077	1,252 \pm 0,1588
P12 CM	TFP	0,0893 \pm 0,0455	1,858 \pm 0,4486
P21 CM	Varicosidad_axón	0,0454 \pm 0,0234	0,686 \pm 0,3564
P21 CM	TFP	0,1037 \pm 0,0525	2,367 \pm 0,6332
AD CM	Varicosidad_axón	0,0231 \pm 0,0231	0,797 \pm 0,7975
AD CM	TFP	0,0313 \pm 0,0313	3,061 \pm 0,3125

CAPA y LOCALIZACIÓN	TEST DE KRUSKAL-WALLIS	V ALOR de p
CGE membrana	3,778	0,1512
CGE citoplasma	4,250	0,1194
CM vr_ax membrana	8,080	0,0887
CM vr_ax citoplasma	6,967	0,1376
CM TFP membrana	1,167	0,5580
CM TFP citoplasma	3,139	0,2082

Nuestros resultados muestran la presencia de MAGL desde las etapas más tempranas del desarrollo postnatal de la corteza cerebelosa en los distintos compartimentos de las CG de la GGE y la CM, tanto en las inmediaciones de la membrana como en el citoplasma de dichos perfiles axónicos. Este enzima resulta incrementado en los procesos axónicos inmaduros de las CG de la CGE con la edad y experimenta un pico de expresión a P12, en los fascículos axónicos inmaduros de las FP que van formando la CM. Por otro lado, el enzima se localiza en los botones terminales de las FP una vez aparecen a P12, donde se localiza tanto yuxtapuesto a la membrana como en el citoplasma hasta por lo menos P21, y no es hasta la edad adulta (AD 8 sem) cuando el MAGL prevalece en el citoplasma de las TFP de la CM.

En resumen, el receptor cannabinoide CB_1 y los enzimas de síntesis ($DAGL-\alpha$) y degradación (MAGL) del 2-AG, están presentes en los procesos axónicos de las CG tanto en la CGE como en la CM, en las fases en las que estos axones sufren procesos de proliferación, diferenciación, elongación/crecimiento, navegación, migración y sinaptogénesis a P0, P5 y P12.

En la CGE, están presentes tanto en las regiones subpiales como en las inmediaciones de la CM, lo que indica que dichas moléculas están presentes en las diferentes fases en las que se encuentran los procesos axónicos de las CG. El receptor, presenta una localización preferentemente de membrana y mantiene sus niveles constantes en el desarrollo. Los enzimas, por su parte, se localizan en las inmediaciones de la membrana, y el MAGL está, además, localizado también a nivel citoplasmático. Ambos enzimas aumentan con el desarrollo en la CGE.

En cuanto a la CM, CB_1 resulta incrementado en las varicosidades y axones de las FP con la edad para localizarse en su posición presináptica final sobre la membrana de los botones terminales de las FP cuando éstas establecen sinapsis con las espinas dendríticas de las CP. Por el contrario, el $DAGL-\alpha$ tiene una mayor presencia en el nacimiento (P0) en

estos perfiles empezando a expresarse postsinápticamente en las dendritas y espinas dendríticas de las CP una vez concluida la sinaptogénesis. La presencia del MAGL en las varicosidades y axones de las FP, por su parte, crece durante el desarrollo postnatal temprano y a partir de dicho periodo, desaparece prácticamente de estos perfiles para localizarse casi con exclusividad en el interior de las TFP, en el AD.

Estos datos, en su conjunto, muestran que el receptor CB₁ y los enzimas de síntesis (DAGL- α) y degradación (MAGL) del 2-AG, si bien comparten compartimento neuronal, su distribución y localización difiere en cada una de las fases por las que pasan los procesos axónicos en desarrollo de las CG.

5.3. MICROSCOPIA CONFOCAL:

El análisis del patrón de distribución y de la localización subcelular específica que muestran los diferentes componentes del SEC estudiados en los diferentes estadios del desarrollo postnatal, indican que éstos, si bien están presentes en los mismos compartimentos neuronales de las CG, difieren tanto en su distribución como en su localización subcelular, por lo que quisimos conocer las posibles colocalizaciones que podrían presentar dichos componentes en los mismos.

Con ese fin, llevamos a cabo un marcado de inmunofluorescencia de las diferentes proteínas estudiadas. En primer lugar, quisimos conocer el patrón de distribución del receptor CB₁ y DAGL- α , en conjunto. Para ello, realizamos un triple marcado **CB₁_DAGL- α _calbindina**: empleamos la calbindina con objeto de delimitar la maduración de las diferentes capas a estudiar, identificando el soma y los procesos dendríticos de las CP. Las imágenes acopladas (Fig. 31,A-C) mostraron una colocalización entre el CB₁ y el DAGL- α en la CGE. Esta colocalización disminuyó con la edad. Con respecto a la CM, tanto el CB₁ como el DAGL- α fueron modificando progresivamente su localización; así, el CB₁ ocupó la CM según se iba formando, mientras que el enzima DAGL- α , comenzó a expresarse en el árbol dendrítico de las CP como cabía esperarse (Fig. 31,C).

A fin de descartar que el CB₁ discorra por el andamiaje ofrecido por los procesos de la GB, el otro compartimento en el que el CB₁ podría localizarse además de en las FP en desarrollo, realizamos la inmunofluorescencia empleando el EAAT1 como marcador de dichos procesos (Fig. 31,D-F). Como en el caso anterior, empleamos la calbindina como marcador del desarrollo de las CP.

CB₁_EAAT1_calbindina: nuestros resultados mostraron un marcado punteado para el CB₁ donde el receptor sigue el recorrido de los procesos de la GB; sin embargo, no se observó colocalización alguna entre ambas indicando que, si bien el CB₁ no se localiza en

la propia glía, parece estar en las CG en desarrollo que utilizan como eje estos procesos gliales (Fig. 31,D-F).

Con el mismo fin, llevamos a cabo la siguiente triple inmunofluorescencia **DAGL- α _EAAT1_calbindina**. Al igual que ocurre en el caso del CB₁, el DAGL- α se localizó siguiendo el recorrido marcado por los procesos de la GB pero no se expresó en la propia glía (Fig. 31,G-I).

Según estos resultados, tanto el CB₁ como el DAGL- α a edades postnatales tempranas parecen coexistir en los procesos axónicos inmaduros de las CG de la CGE que utilizan la GB como eje para su descenso migratorio hacia la CGI.

La colocalización del receptor y del enzima de síntesis del 2-AG en los procesos axónicos de las CG, nos sugirió que el enzima de degradación del 2-AG, el MAGL, podría colocalizar con ambas proteínas en dichos procesos. Con objeto de conocer su distribución celular, llevamos a cabo los siguientes triples marcajes, **MAGL_DAGL- α _calbindina** (Fig. 31,J-L) y **MAGL_CB₁_calbindina** (Fig. 31,M-O): como era de esperar, el MAGL estuvo presente en la CGE; sin embargo, no se observó colocalización con ninguna de las dos proteínas **DAGL- α** y **CB₁**.

Los estudios de microscopía convencional y de microscopía electrónica revelaron la presencia del receptor CB₁ y los enzimas de síntesis (DAGL- α) y degradación (MAGL) del 2-AG, en la CGE. Esta capa en modificación, está constituida por los procesos axónicos de las CG en desarrollo y la GB. Nuestros resultados a nivel de microscopía confocal indican que el CB₁ y el DAGL- α colocalizan en procesos fuera de la GB desde P0 hasta por lo menos P12. El MAGL, por su parte, parece ocupar el mismo compartimento, sin embargo, no colocaliza con esas moléculas, debido probablemente a una distribución más difusa dentro del mismo.

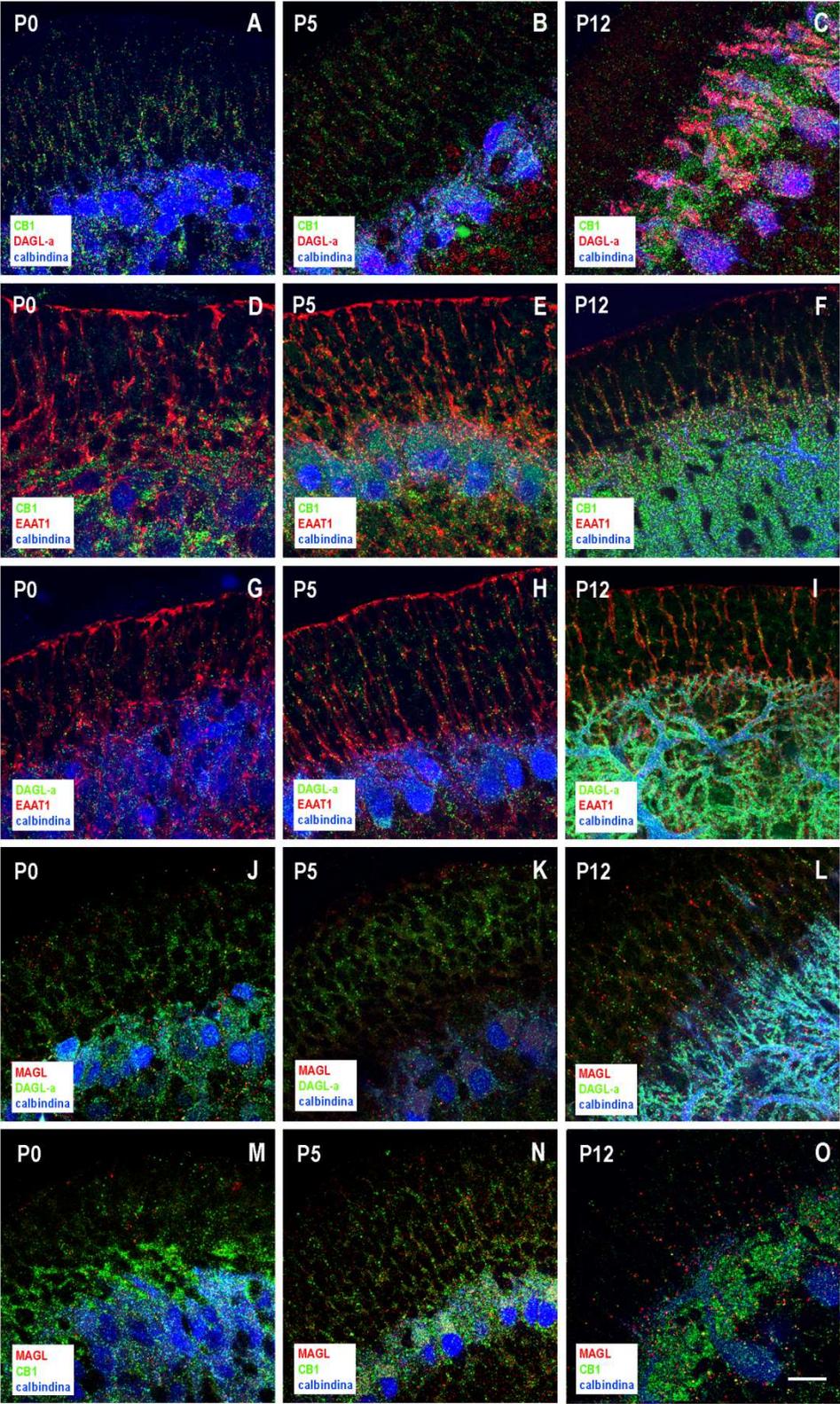
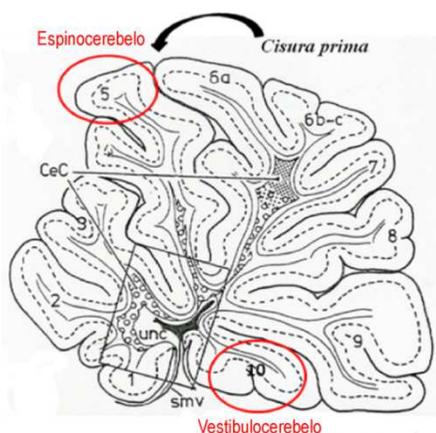


Figura 31: (A-O) Localización de CB₁, DAGL- α y MAGL en la corteza cerebelosa de la rata durante el desarrollo postnatal temprano (P0, P5, P12) mediante la técnica inmunohistoquímica de fluorescencia. La calbindina (A-O) delimita la maduración de las diferentes capas a estudiar identificando el soma y los procesos dendríticos de las CP (en azul) y el EAAT1 (D-I) identifica los procesos de la glía de Bergmann (en rojo). Nótese la presencia de CB₁, DAGL- α y MAGL en los procesos axónicos de las CG de la CGE (A-O). CB₁ y DAGL- α colocalizan en dichos procesos axónicos (A-C), mientras que MAGL no colocaliza con ninguna de las dos proteínas, DAGL- α y CB₁ (J-O). CB₁ y DAGL- α están yuxtapuestos pero excluidos de los procesos de la glía de Bergmann (D-I). Barras de escala: 0,25 μ m.

5.4. EFECTO DE LA AUSENCIA DEL RECEPTOR CB₁ EN LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LAS FIBRAS PARALELAS

Nuestros resultados apoyan desde una perspectiva ultraestructural las investigaciones que sugieren que la señalización eCB a través de CB₁ dependiente de DAGL- α , podría jugar un papel importante en los procesos de maduración de la corteza cerebelosa de la rata durante el desarrollo postnatal temprano. Este hecho hizo que nos preguntáramos si la carencia de CB₁ durante el desarrollo, podría tener un impacto sobre las características anatómicas típicas de las sinapsis de las FP con las CP en la CM del cerebelo adulto.

Con este fin, analizamos la morfología subcelular de las TFP y las sinapsis que establecen en ratones adultos carentes de CB₁ (CB₁-KO) y la comparamos con la de los animales silvestres (CB₁-WT).



Estudiamos 2 divisiones funcionales distintas del cerebelo: el lóbulo 5 que pertenece al espinocerebelo y el lóbulo 10 que pertenece al vestibulocerebelo, ya que presentan una distinta sensibilidad frente a los agentes que conducen al daño cerebeloso (Clark y cols., 2000; Tolbert y Clark, 2000; Orvis y cols., 2012). El estudio se llevó a cabo en secciones parasagitales del vermis cerebeloso de ambos tipos de animales.

En una primera aproximación observamos que las FP carentes de CB₁, al igual que las del animal CB₁-WT, establecen contactos sinápticos con las espinas dendríticas de las CP, sugiriendo una correcta selección y alcance de la diana; sin embargo, había algunas características fenotípicas que resultaban sumamente diferentes a simple vista y quisimos determinar éstas y otros aspectos ultraestructurales que nos dieran una visión realista de

las consecuencias que la ausencia del receptor CB_1 en las FP podría tener en el intrincado circuito cerebeloso.

Para ello, cuantificamos diversos parámetros morfológicos como son: número de sinapsis, tamaño de sinapsis, tamaño de terminal, número de vesículas, tamaño de espinas dendríticas y otros que iremos describiendo a continuación.

En primer lugar, analizamos las características fenotípicas de las TFP en el animal silvestre para CB_1 en los lóbulos objeto de nuestro estudio, dado que cada lóbulo participa en funciones cerebelosas distintas. Comenzamos analizando **el número de contactos sinápticos** que establecen las TFP con las espinas dendríticas de las CP (Fig.32A). Curiosamente, en la corteza cerebelosa correspondiente al lóbulo 10 hubo una cantidad significativamente menor de contactos sinápticos que en el lóbulo 5, siendo esta diferencia de un 24%. Una vez comprobada la diferencia existente entre los lóbulos del animal CB_1 -WT nos propusimos analizar de forma idéntica lo que ocurría en la corteza del animal CB_1 -KO. Al contrario de lo que ocurría en el CB_1 -WT, no se detectaron en el CB_1 -KO diferencias significativas interlobulares (Fig.32B).

A continuación, comparamos el número de sinapsis que establecen las TFP en los animales CB_1 -WT con los CB_1 -KO dentro de cada lóbulo (Fig.32C,D). Los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico evidenciaron las diferencias existentes en el número de sinapsis que las TFP establecen con las espinas dendríticas de las CP en el lóbulo 5, siendo significativamente menor en los CB_1 -KO. Curiosamente, no se detectaron diferencias entre los animales en el lóbulo 10.

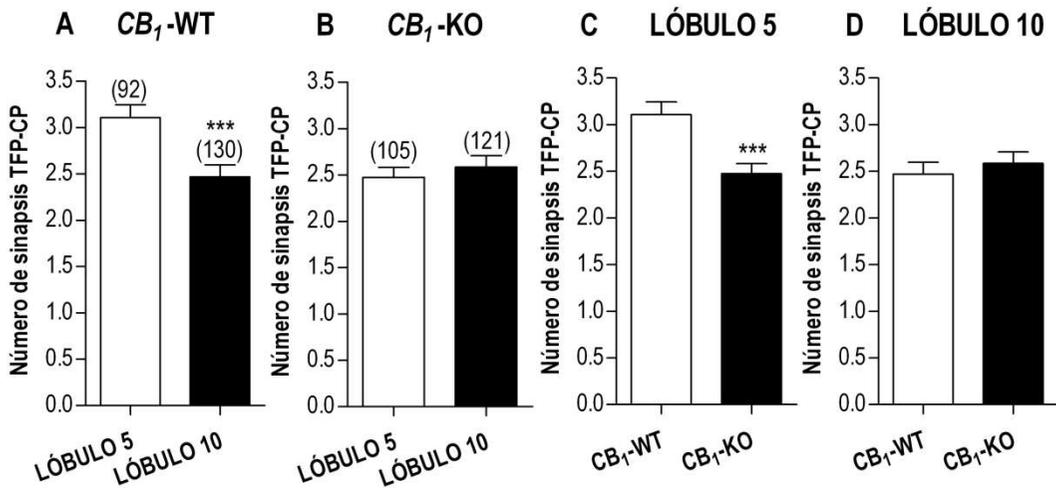


Figura 32: Análisis estadístico del número de contactos sinápticos establecidos por las TFP sobre las espinas dendríticas de las CP en los lóbulos 5 y 10 del animal CB_1 -WT y CB_1 -KO. En el CB_1 -WT (A), el número medio de contactos sinápticos fue de $3,109 \pm 0,137$ y $2,469 \pm 0,128$ en los lóbulos 5 y 10, respectivamente. En el CB_1 -KO (B) fue de $2,476 \pm 0,106$ en el lóbulo 5 y $2,587 \pm 0,121$ en el 10. Test *U de Mann-Whitney*, $p < 0,0001^{***}$ entre los lóbulos del CB_1 -WT y $p = 0,8931$ (ns) entre los lóbulos del CB_1 -KO. Nótese en el lóbulo 5 (C), el número de sinapsis significativamente menor en el CB_1 -KO [*U de Mann-Whitney*, $p = 0,0004^{***}$ y $p = 0,2364$ (ns) en el lóbulo 10 (D)]. Los números entre paréntesis indican el número de sinapsis analizadas en cada caso. El área de cada muestra fue de $10 \mu\text{m}^2$. Área total: $920 \mu\text{m}^2$ en CB_1 -WT y $1050 \mu\text{m}^2$ en CB_1 -KO en el lóbulo 5 y $1300 \mu\text{m}^2$ y $1210 \mu\text{m}^2$ en el lóbulo 10 del CB_1 -WT y CB_1 -KO, respectivamente.

Los ratones carentes de CB_1 presentan un número de sinapsis significativamente menor en el lóbulo 5 y no en el lóbulo 10.

En vista de las diferencias observadas en el número de sinapsis, nos pareció interesante analizar **el tamaño de la sinapsis** que presentan estos ratones (Fig. 33). Para ello, llevamos a cabo el análisis estadístico siguiendo el mismo diseño que en el caso anterior. En el animal silvestre para CB_1 , el perímetro de la sinapsis fue significativamente mayor en el lóbulo 10 (Fig. 33A). En el CB_1 -KO, sin embargo, no se observó ninguna diferencia (Fig. 33B). La comparación del perímetro de las sinapsis entre el animal WT y el KO en ambos lóbulos (Fig. 33C,D), dio como resultado un mayor tamaño de las sinapsis

del CB_1 -KO en el lóbulo 5 respecto del CB_1 -WT, sin embargo, no se detectaron diferencias en el lóbulo 10. No obstante, resultó interesante el hecho de que las TFP carentes de CB_1 mostraran un número y tamaño de sinapsis similar a aquellas del lóbulo 10, en ambos tipos de animales.

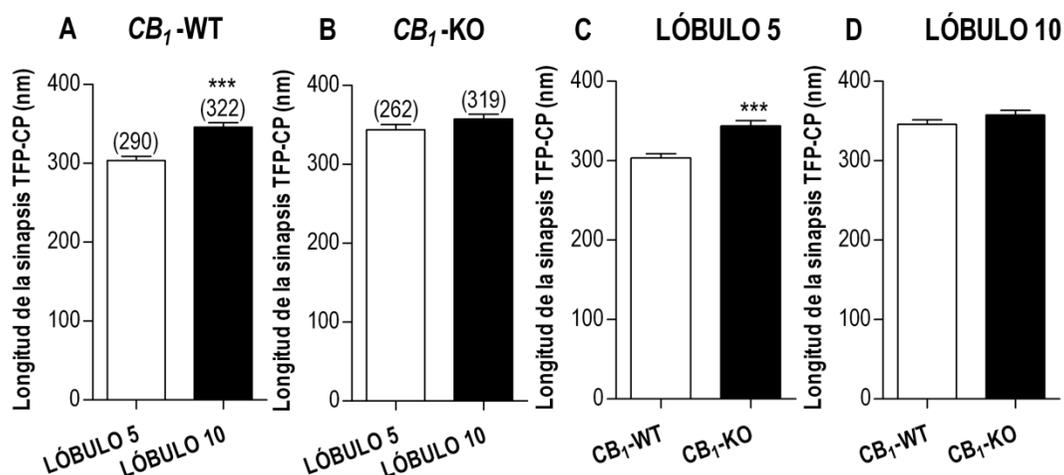


Figura 33: Análisis estadístico del perímetro de la sinapsis (nm) entre las TFP y espinas dendríticas de las CP en los lóbulos 5 y 10 del ratón CB_1 -WT y CB_1 -KO. En el CB_1 -WT (A), el perímetro medio fue de $303,6 \pm 5,372$ y $346 \pm 5,563$ en los lóbulos 5 y 10, respectivamente. En el CB_1 -KO (B) fue de $343,8 \pm 6,622$ en el lóbulo 5 y $357,5 \pm 6,137$ en el lóbulo 10. Test *U de Mann-Whitney*, $p < 0,0001$ *** entre los lóbulos del CB_1 -WT y $p = 0,2154$ (ns) entre los lóbulos del CB_1 -KO. Nótese en C, la longitud de la sinapsis significativamente mayor en el lóbulo 5 del CB_1 -KO (*U de Mann-Whitney*, $p < 0,0001$ ***). En el lóbulo 10 (D), *U de Mann-Whitney*, $p = 0,2347$ (ns). Los números entre paréntesis indican el número de sinapsis analizadas en cada caso.

Los ratones CB_1 -KO poseen sinapsis significativamente más largas que el animal WT en el lóbulo 5 y no en el lóbulo 10.

Una vez estudiados el número y tamaño de las sinapsis entre las TFP y las espinas dendríticas de las CP, nos dispusimos a estudiar una de las características visualmente más distintivas que presentaba *CB₁-KO*, que era el mayor **tamaño de las terminales de las FP**. Para corroborar estadísticamente este hecho, se analizó el área de las TFP (μm^2) en ambos lóbulos del *CB₁-WT* (Fig. 34,35). El área media de las TFP difirió en un 26% entre los lóbulos siendo mayor en aquellas terminales correspondientes al lóbulo 10.

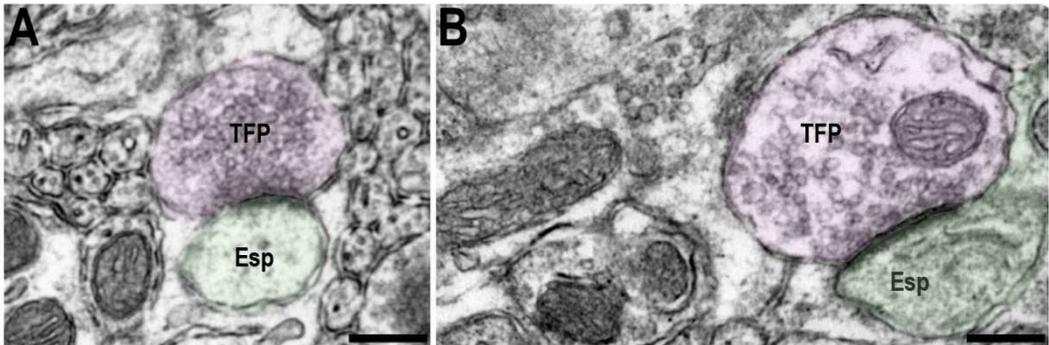


Figura 34: Micrografías electrónicas de secciones parasagitales de la corteza cerebelosa vermal de ratón adulto silvestre para *CB₁*. Se muestran las TFP que establecen contacto sináptico con las espinas dendríticas de la CP en los lóbulos 5 (A) y 10 (B). Nótese el mayor tamaño de la terminal correspondiente al lóbulo 10 (B). Barras de escala: 0,25 μm . TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina.

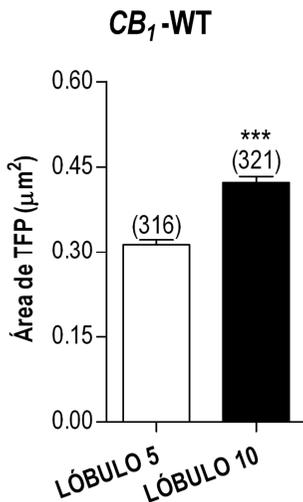


Fig. 35: Análisis estadístico del área de las TFP (μm^2) en los lóbulos 5 y 10 de *CB₁-WT*. El área media de las TFP (μm^2) en el lóbulo 5 fue de $0,31\mu\text{m}^2 \pm 0,008$ y de $0,42\mu\text{m}^2 \pm 0,011$ en el lóbulo 10. Test *U de Mann-Whitney*, $p < 0.0001^{***}$. Los números entre paréntesis indican el número de TFP analizadas en cada caso.

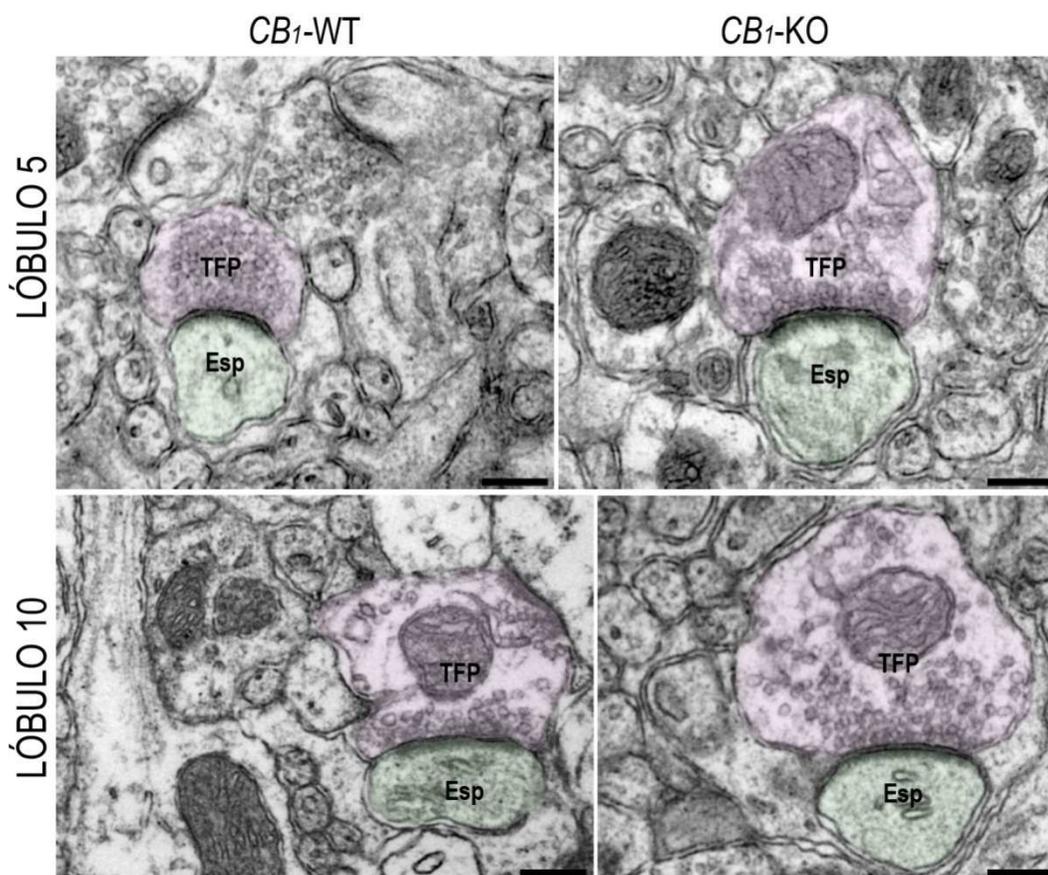


Figura 36: Micrografías electrónicas de secciones vermales parasagitales de la corteza cerebelosa de CB_1 -WT y CB_1 -KO. Se aprecia el mayor tamaño de las TFP en CB_1 -KO respecto a CB_1 -WT en el lóbulo 5 así como en el lóbulo 10. Barras de escala: 0,25 μm . TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina.

Una vez conocida la diferencia existente entre los lóbulos objeto de estudio en el animal CB_1 -WT, se midió el área de las TFP en el animal CB_1 -KO y se comparó con las del CB_1 -WT (Fig. 36,37). Al igual que sucedía en el CB_1 -WT, las TFP del lóbulo 10 del CB_1 -KO eran mayores que las del lóbulo 5. Sin embargo, el dato más llamativo fue que el área de las TFP carentes de CB_1 fue notablemente mayor para ambos lóbulos, un 28% y un 25% mayor en el lóbulo 5 y en el 10, respectivamente (Fig. 37).

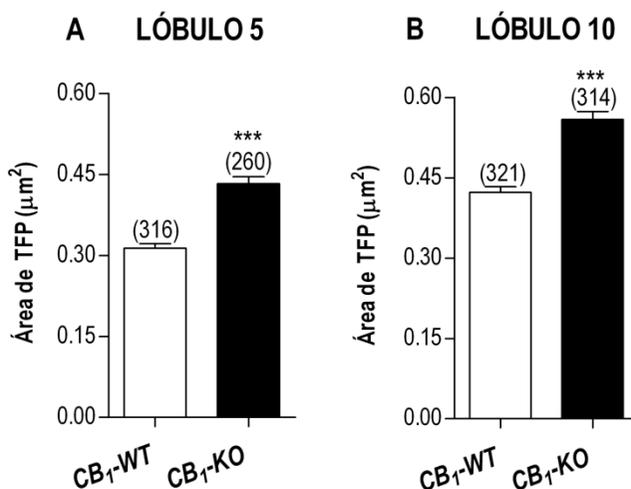


Figura 37: Análisis estadístico del área de las TFP (µm²) en el animal CB₁-KO en comparación con CB₁-WT en los lóbulos 5 y 10. El área media de las TFP (µm²) en el lóbulo 5 (A) fue de 0,31±0,008 en el CB₁-WT y de 0,43±0,013 en el CB₁-KO. El área media de las TFP (µm²) en el lóbulo 10 (B) del animal CB₁-WT fue de 0,42±0,011 y 0,56±0,015 en el CB₁-KO. Test *U de Mann-Whitney*, p<0.0001***. Los números entre paréntesis indican el número de TFP analizadas en cada caso.

En vista del mayor tamaño de las TFP carentes del receptor CB₁, nos planteamos la posibilidad de que el **número de contactos sinápticos por terminal** establecidos por las mismas sobre las espinas dendríticas de las CP se viera modificado. Los resultados, sin embargo, indicaron que el 95% de las TFP en ambos animales establece un único contacto sináptico (Fig. 38).

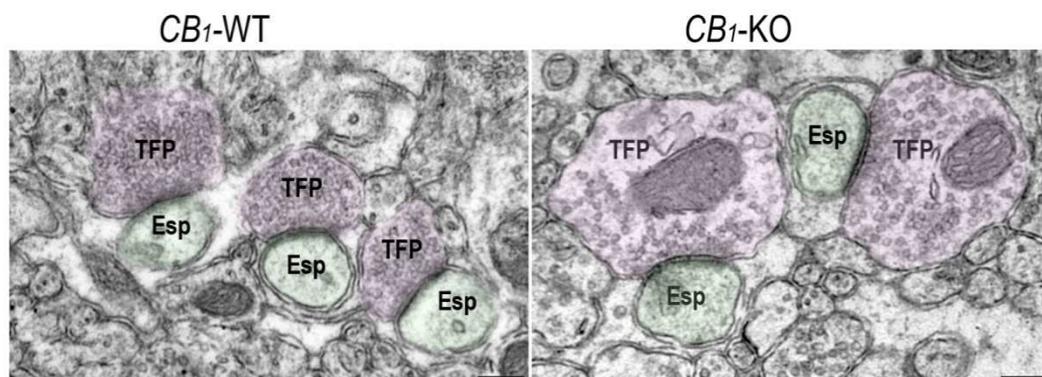


Figura 38: Micrográficas electrónicas de la corteza cerebelosa de los ratones *CB1*-WT y *CB1*-KO. Las TFP establecen un único contacto sináptico con las espinas dendríticas de las CP. Barras de escala: 0,25 μm . TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina.

El mayor tamaño (μm^2) de las TFP observado en *CB1*-KO nos condujo a plantearnos la hipótesis de si el área mayor de estas terminales requiere contener un mayor número de vesículas sinápticas para una eficiente liberación o si, por el contrario, se mantiene el número de las mismas. A fin de dar respuesta a esta cuestión, analizamos el número, la densidad y la dispersión de vesículas contenidas en las TFP.

En primer lugar, nos dispusimos a analizar **el número de vesículas** presentes en las terminales de cada uno de los lóbulos en el animal *CB1*-WT y en el *CB1*-KO (Fig. 39A,B). Mientras que en *CB1*-WT no se detectaron diferencias en el número de vesículas analizadas entre ambos lóbulos, en las terminales del lóbulo 10 de *CB1*-KO hubo un 30% más de vesículas que en las terminales del lóbulo 5, siendo esta diferencia altamente significativa. A continuación, comparamos este parámetro entre los animales dentro de cada lóbulo estudiado (Fig. 39C,D). No se observó ninguna diferencia en el número de vesículas en el lóbulo 10; sin embargo en el lóbulo 5, el animal *CB1*-KO mostró aproximadamente un 20% menos de vesículas que el animal silvestre.

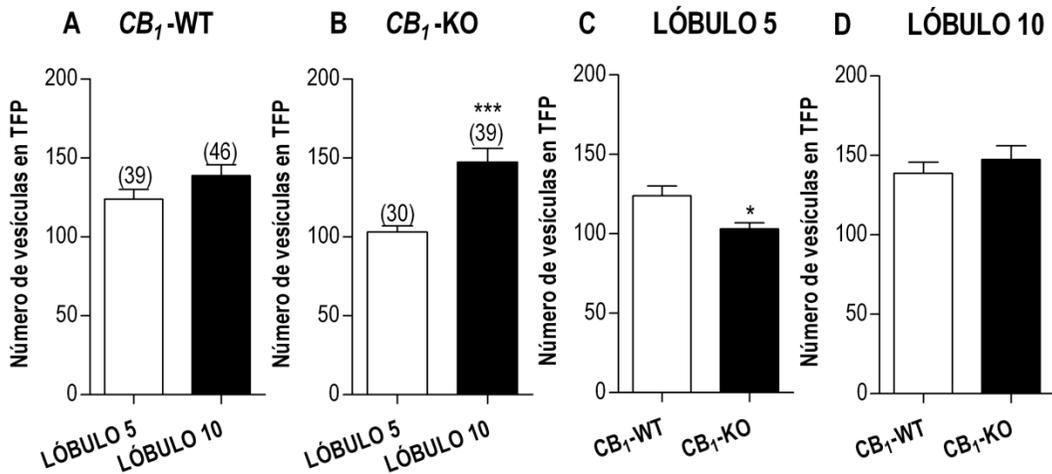


Figura 39: Análisis estadístico del número de vesículas en el vermis cerebeloso de los lóbulos 5 y 10 de *CB₁-WT* y *CB₁-KO*. En *CB₁-WT* (A), el número medio de vesículas fue de $123,8 \pm 6,245$ y $138,7 \pm 7,128$ en los lóbulos 5 y 10, respectivamente; test *t de Student*, $p=0,1275$ (ns). Nótese en B, el mayor número de vesículas en el lóbulo 10 de *CB₁-KO* ($147,4 \pm 8,666$) respecto del lóbulo 5 ($103,1 \pm 3,909$); test *U de Mann-Whitney*, $p < 0,0001$ ***. En el lóbulo 10 (D), no se detectaron diferencias; test *t de Student*, $p=0,4380$ (ns). En el lóbulo 5 (C), el *CB₁-KO* mostró un menor número de vesículas que aquel del *CB₁-WT*; test *U de Mann-Whitney*, $p=0,0252$ *. El área de cada muestra fue de $10 \mu\text{m}^2$. Área total: $390 \mu\text{m}^2$ en *CB₁-WT* y $300 \mu\text{m}^2$ en *CB₁-KO* en el lóbulo 5 y $460 \mu\text{m}^2$ y $390 \mu\text{m}^2$ en el lóbulo 10 del *CB₁-WT* y *CB₁-KO*, respectivamente.

En *CB₁-WT* no existen diferencias en el número de vesículas contenidas en las terminales de los lóbulos 5 y 10. Sin embargo, las terminales del lóbulo 10 de *CB₁-KO* presentan un mayor número de vesículas. Las terminales del lóbulo 5 de *CB₁-KO* presentan un menor número de vesículas que las de *CB₁-WT*.

El hecho de que los animales *CB₁-KO* presenten un mayor tamaño de terminal, podría influir en la densidad vesicular que muestra la terminal. Por ello procedimos a su análisis. El cálculo de la **densidad de vesículas** resultante del animal *CB₁-WT* (Fig. 40A) mostró que las TFP correspondientes al lóbulo 10 poseen una densidad de vesículas 34% menor que las del lóbulo 5. Por el contrario, en el ratón *CB₁-KO* (Fig. 40B) la densidad de

vesículas fue prácticamente igual en los lóbulos 5 y 10. Cabe destacar, que la densidad de vesículas en las TFP carentes del receptor CB_1 fue un 52,4% menor en el lóbulo 5 (Fig. 40C), mientras que no se detectaron diferencias entre ambos tipos de animales en el lóbulo 10 (Fig. 40D).

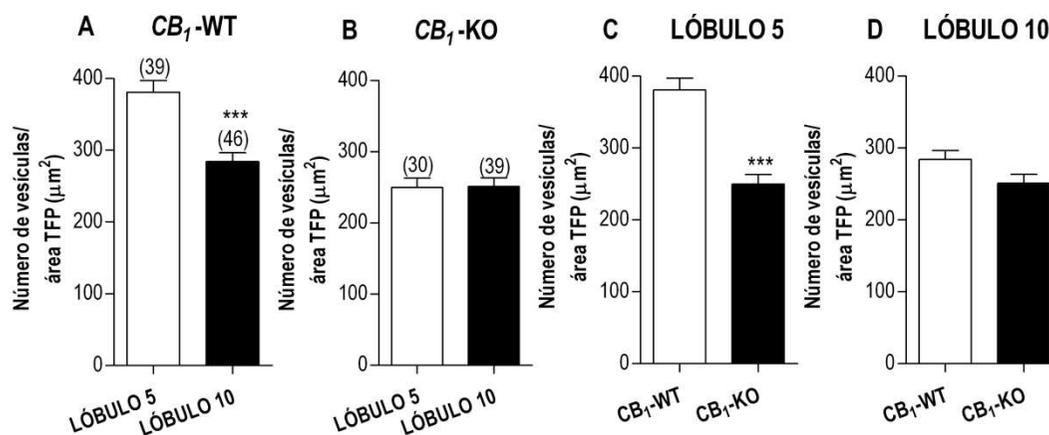


Figura 40: Análisis estadístico de la densidad de vesículas contenidas en las TFP (μm^2) en los lóbulos 5 y 10 del animal CB_1 -WT y CB_1 -KO. En CB_1 -WT (A), el número medio de vesículas fue significativamente menor en el lóbulo 10 respecto del lóbulo 5 siendo éste del $381 \pm 16,01$ y $284,2 \pm 12,23$ en los lóbulos 5 y 10, respectivamente. En CB_1 -KO (B), sin embargo, no hubo diferencias en el número medio de vesículas; éste fue de $249,9 \pm 13,13$ en el lóbulo 5 y $251,1 \pm 12,28$ en el lóbulo 10. Test *t de Student*, $p < 0,0001$ *** entre los lóbulos del CB_1 -WT y $p = 0,9493$ (ns) entre los lóbulos del CB_1 -KO. En el lóbulo 5 (C), las TFP de CB_1 -KO contenían un número de vesículas significativamente menor que aquellas del WT; test *t de Student*, $p < 0,0001$ ***. En el lóbulo 10 (D), no se detectaron diferencias entre los animales; test *t de Student*, $p = 0,0607$ (ns). Los números entre paréntesis indican el número de botones terminales de las FP analizados en cada caso.

En conjunto, las TFP de CB_1 -KO presentan un mayor tamaño que las de CB_1 -WT. Si bien el número total de vesículas por terminal del lóbulo 5 difiere moderadamente entre ambos tipos de animales, la densidad, es decir, el número de vesículas por área de terminal, es mucho menor en el KO.

Este hecho, podría ser un factor fundamental para la transmisión sináptica en el animal CB_1 -KO. Por ello, nos pareció interesante analizar la densidad de vesículas situadas en las inmediaciones sinápticas para ver si el grupo de vesículas dispuestas a liberarse podría verse modificada en el ratón CB_1 -KO. Para ello, establecimos una cuadrícula de dimensiones constantes dispuesta inmediatamente por encima de la sinapsis. El área del cuadrante A fue de $0,075\mu\text{m}^2$. Se cuantificaron las vesículas sinápticas contenidas en dicho área (Fig. 41,42).

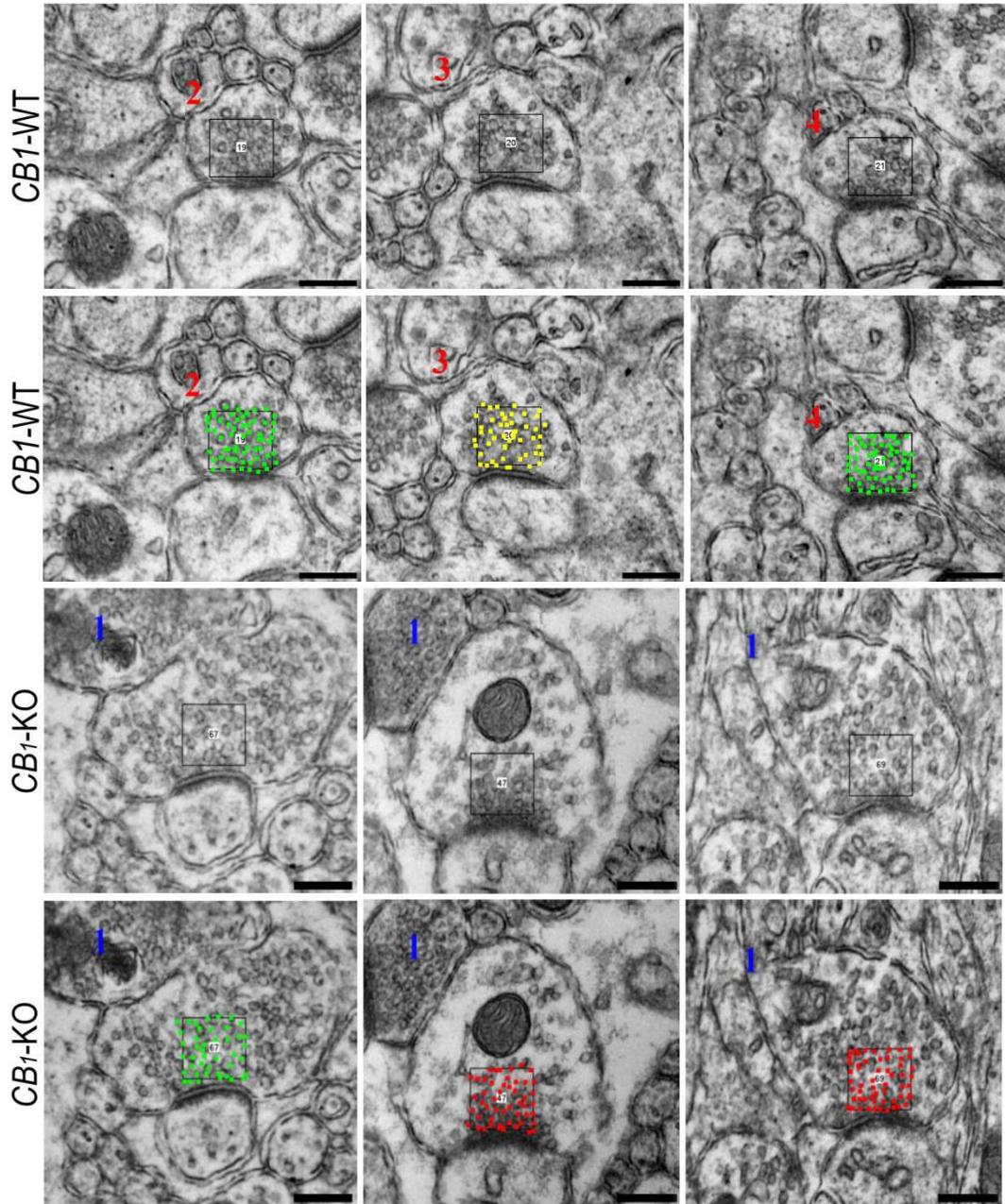


Figura 41: Micrografías electrónicas de la corteza cerebelosa de CB_1 -WT y CB_1 -KO. Las TFP están alineadas según su zona activa. En ellas, se muestra la disposición del cuadrante A (cuadrado en gris) y la manera en la que se ha llevado a cabo el conteo de las vesículas sinápticas contenidas en dicho cuadrante. Barras de escala: $0,25\mu\text{m}$.

Se analizó en primer lugar, la densidad de vesículas en la zona activa de las TFP en los lóbulos 5 y 10 del animal CB_1 -WT (Fig. 42A). Ésta fue un ~26,5% menor en el lóbulo 10. La densidad de vesículas en las TFP carentes de CB_1 fue un ~24% y un 14% menor que las TFP de CB_1 -WT, en el lóbulo 5 y 10, respectivamente (Fig. 42C,D). Por tanto, aunque la densidad de vesículas en las inmediaciones de la zona activa fue menor en ambos lóbulos de los animales CB_1 -KO, las diferencias existentes en el lóbulo 5 fueron más notorias que en el lóbulo 10.

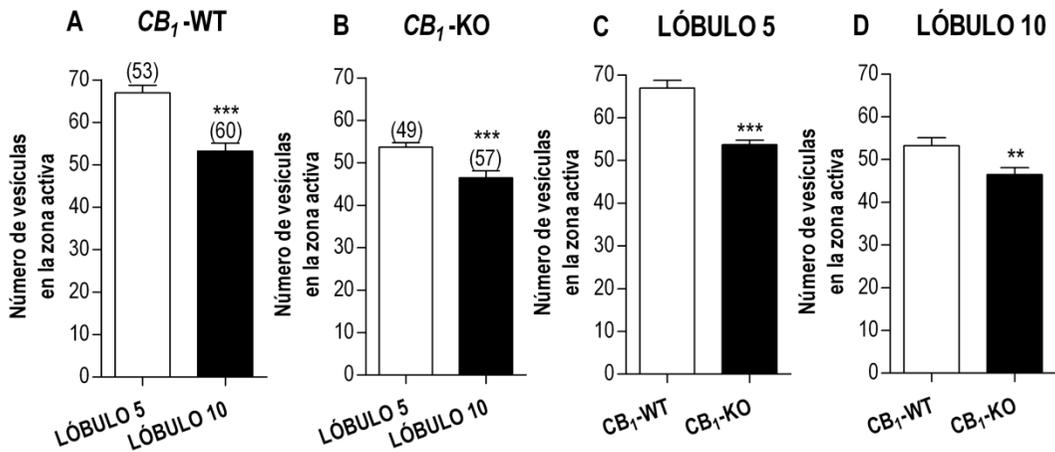


Figura 42: Análisis estadístico del número de vesículas en la proximidad de la zona activa (área=0,075 μ m²) de las TFP correspondientes a los lóbulos 5 y 10 de CB_1 -WT y CB_1 -KO. Comparativa entre los lóbulos 5 y 10. El n° medio de vesículas en CB_1 -WT (A) fue 66,94 \pm 1,798 y 53,23 \pm 1,873 en los lóbulos 5 y 10, respectivamente. Dado al carácter normal de los datos e independiente de las muestras, el valor del *t de Student*, $p < 0,0001$ *. El n° medio de vesículas en CB_1 -KO (B) fue 53,71 \pm 1,029 en el lóbulo 5 y de 46,47 \pm 1,625 en el lóbulo 10. Test *t de Student*, $p = 0,0004$ ***. Nótese en el lóbulo 5 (C), la menor densidad de vesículas sinápticas en las TFP de CB_1 -KO versus WT; test *t de Student*, $p < 0,0001$ ***. En el lóbulo 10 (D), esta diferencia fue menor; test *t de Student*, $p = 0,0077$ **.**

El estudio de las inmediaciones de la sinapsis pone de relieve las diferencias existentes entre CB_1 -WT y CB_1 -KO, siendo las densidades significativamente menores en los lóbulos 5 y 10 de CB_1 -KO.

El análisis de las vesículas en las proximidades de las sinapsis reveló la existencia de una distribución diferencial de las vesículas desde la membrana sináptica a los extremos de la cuadrícula empleada para el estudio de CB_1 -WT y CB_1 -KO. Las vesículas contenidas en las TFP de CB_1 -KO parecían estar más dispersas. Con el fin de responder a esta cuestión, se midió la dispersión de las vesículas en las TFP de CB_1 -WT y CB_1 -KO (Fig. 43,44,45).

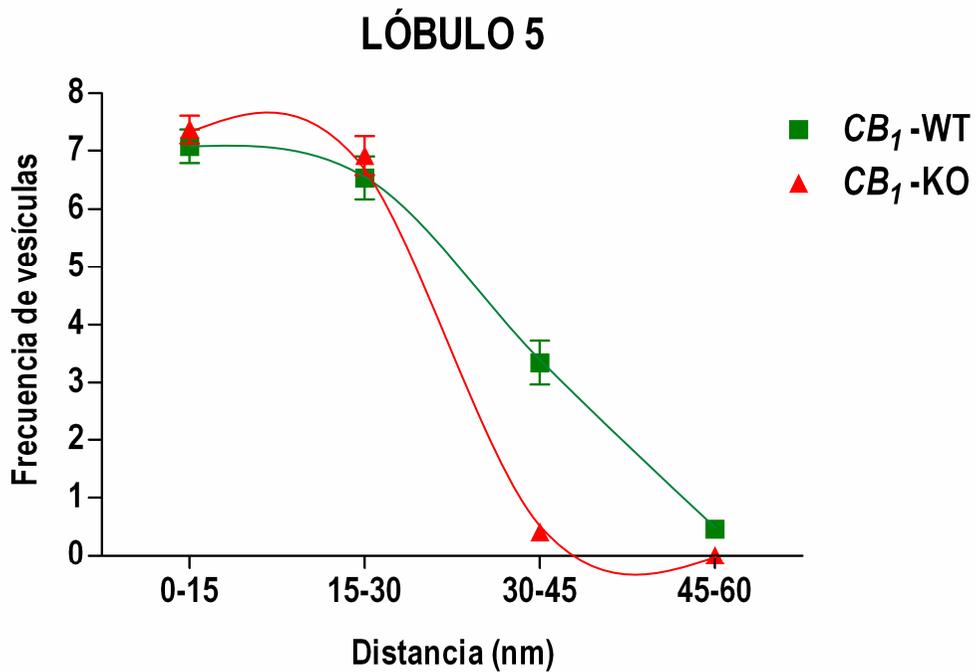


Figura 43: Gráfica que muestra la dispersión de las vesículas sinápticas en el lóbulo 5, en el cuadrante A. Se midió la distancia (nm) entre la zona activa y las vesículas. Se muestran las frecuencias de las vesículas en los distintos rangos de distancia establecidos (nm), en el lóbulo 5 del ratón CB_1 -WT y CB_1 -KO (media \pm EEM). En ambos tipos de animales, las vesículas sinápticas estaban presentes muy cerca de la zona activa (0-15nm) y se mantenían hasta el rango de 15-30nm. A partir de dicho rango (30-45nm), el número de vesículas en CB_1 -KO fue menor que en CB_1 -WT. En el rango de 45-60nm, las vesículas prácticamente desaparecen en ambos casos.

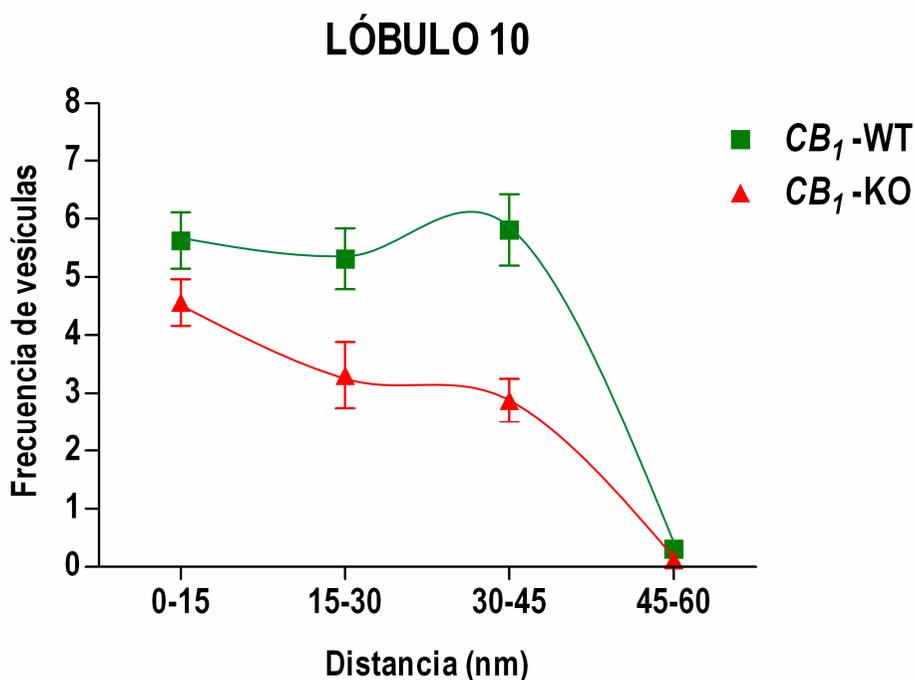


Figura 44: Gráfica de la dispersión de las vesículas sinápticas en el lóbulo 10, en el cuadrante A, mediante la medición de la distancia (nm) de las mismas desde la zona activa. Se muestran las frecuencias de las vesículas en los distintos rangos de distancia establecidos (nm), en el lóbulo 10 del ratón *CB₁-WT* y *CB₁-KO* (media±EEM). En ambos tipos de animales, las vesículas sinápticas estaban presentes muy cerca de la zona activa (0-15nm). A partir de dicho rango, ambos tipos de animales mostraron una tendencia muy distinta: en *CB₁-WT*, el número de vesículas se mantuvo hasta el rango de 30-45nm, rango a partir del cual prácticamente desaparecen (45-60nm); en *CB₁-KO*, por el contrario, conforme se aleja de la sinapsis, hubo una menor cantidad de vesículas, siendo esta diferencia más notable que en *CB₁-WT* en el rango de 30-45nm. A 45-60nm las vesículas desaparecían casi totalmente como en el caso de *CB₁-WT*. En cada uno de los rangos de distancia (nm) establecidos el número de las vesículas en *CB₁-KO* fue menor.

En resumen, la dispersión de vesículas resulta ser diferente en CB_1 -WT y CB_1 -KO. Mientras que en el lóbulo 10 el menor número de vesículas se hace evidente desde las inmediaciones de la sinapsis, en el lóbulo 5 el número de vesículas disminuye drásticamente a partir de los 30nm de distancia desde la sinapsis.

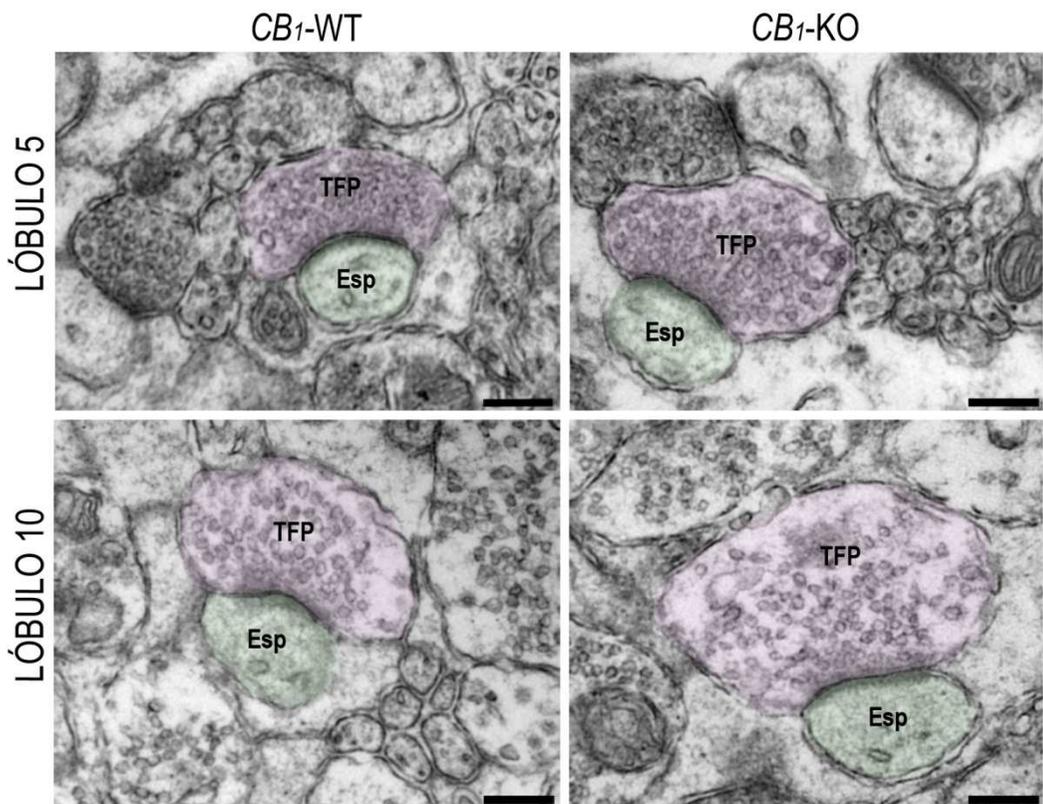


Figura 45: Micrografías electrónicas de secciones parasagitales de la corteza cerebelosa vermal de ratones CB_1 -WT y CB_1 -KO. En ellas, se muestran las TFP correspondientes a los lóbulos 5 y 10. Apréciase el mayor empaquetamiento de las vesículas sinápticas cerca de la sinapsis de las TFP correspondientes al lóbulo 5 respecto de aquellas del lóbulo 10. Barras de escala: 0,25 μ m. TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina.

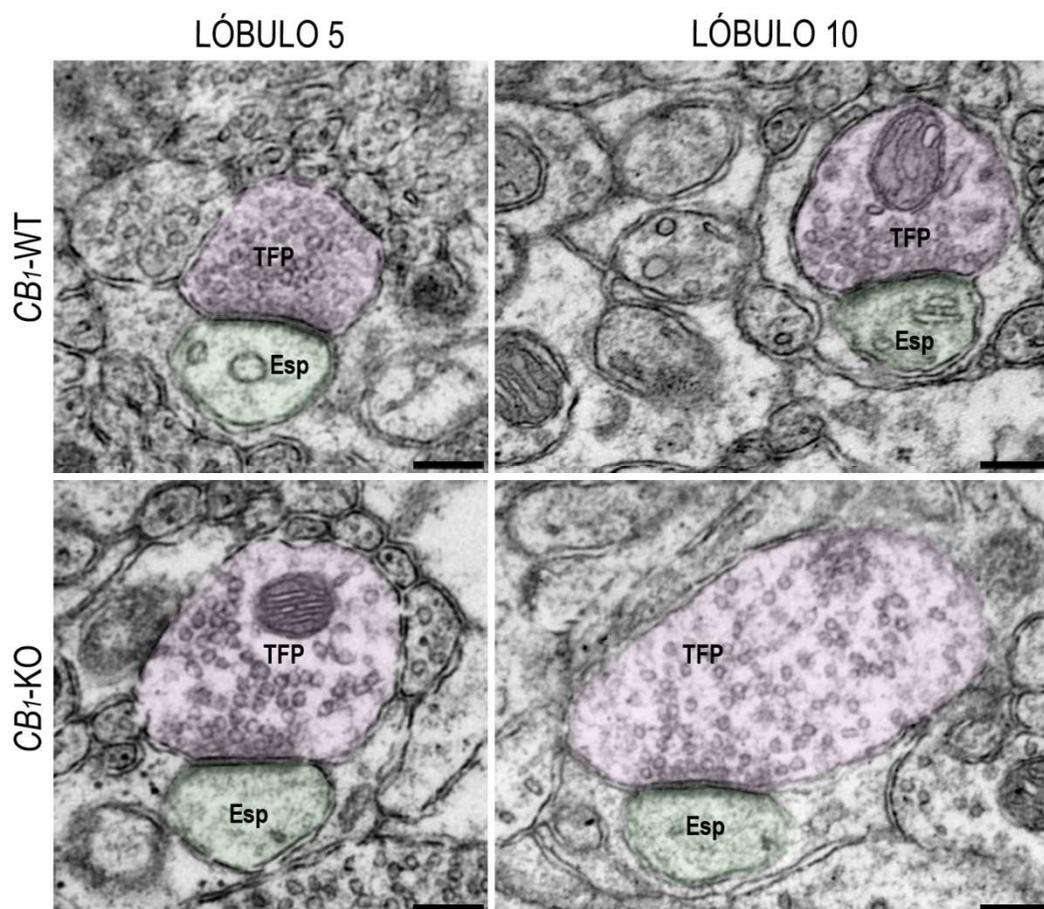


Figura 46: Micrografías electrónicas obtenidas a partir de la corteza cerebelosa del vermis de ratones CB_1 -WT y CB_1 -KO en los lóbulos 5 y 10. Se muestran las TFP que establecen contacto sináptico con la espina dendrítica de la CP. Nótese la similitud en el tamaño de las espinas. Barras de escala: 0,25 μ m. TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina.

Por último, a fin de descartar que los cambios ultraestructurales vistos hasta el momento fueran debidos a un efecto global de la delección del gen para CB_1 , se midió el **área de las espinas de las CP** como elementos postsinápticos directos de las TFP (Fig. 46,47). El análisis de este compartimento indicó que no existían cambios ni tampoco diferencias morfológicas entre CB_1 -WT y CB_1 -KO a nivel postsináptico.

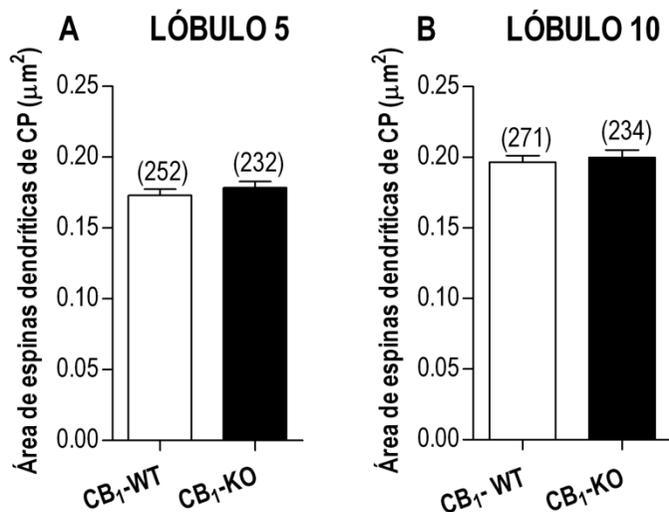


Figura 47: Análisis estadístico del área de las espinas dendríticas de las CP (μm²) como elementos postsinápticos directos de las TFP. En el lóbulo 5 (A), el área media de las espinas de las CP fue de 0,1730±0,004 en CB₁-WT y de 0,1784±0,004 en CB₁-KO. En el lóbulo 10 (B), el área fue de 0,1966±0,0045 en CB₁-WT y de 0,1999±0,005 en CB₁-KO. Test *U de Mann-Whitney*, p=0,2460(ns) en el lóbulo 5; p=0,7624(ns) en el lóbulo 10.

Estos resultados sugieren en su conjunto que la ausencia del receptor de cannabinoides CB₁ de las FP, altera la adquisición de ciertas características ultraestructurales de los botones terminales de estas fibras con relevancia funcional en el procesamiento motor.

6. DISCUSIÓN

Los estudios desarrollados en las últimas dos décadas, han demostrado que las acciones de los eCBs en el cerebro no se limitan a la regulación de la neurotransmisión (*Gaffuri y cols., 2012*), sino que se trata de un sistema modulador de amplio espectro, implicado en múltiples procesos esenciales. En este sentido, un número importante de trabajos de investigación han sentado la base para asegurar que el SEC juega un papel clave en el desarrollo cerebral (*Bisogno y cols., 2003; Begbie y cols., 2004; Mulder y cols., 2008; Keimpema y cols., 2010,2013b; Wu y cols., 2010*).

Nuestro estudio se ha centrado en las etapas tempranas del desarrollo cerebeloso postnatal, en las que tiene lugar la morfogénesis de las CG, que implica todos aquellos procesos del desarrollo neuronal en los que se ha descrito que participa el SEC.

Nuestros resultados han demostrado que el receptor de cannabinoides CB₁ y los enzimas de síntesis (DAGL- α) y degradación (MAGL) del 2-AG, coinciden espacial y temporalmente en el compartimento axónico de las CG en los días 0, 5 y 12 postnatales, pero difieren en su distribución específica dentro de dicho compartimento. Estos tres integrantes del SEC han mostrado un cambio topográfico desde el nacimiento hasta la edad adulta, en paralelo al requerimiento funcional del sistema, al desarrollo neuronal inicial y, finalmente, a la neurotransmisión. Además, hemos evidenciado que en los animales adultos carentes del receptor CB₁, este déficit tiene un impacto en la arquitectura presináptica de las sinapsis FP-CP.

6.1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL RECEPTOR CB₁ Y DE LOS ENZIMAS DAGL- α y MAGL

6.1.1. Localización del receptor cannabinoide CB₁ en los compartimentos axónicos de las células granulares de la corteza cerebelosa postnatal

Nuestros resultados han mostrado que el receptor CB₁ estaba presente en la CGE a P0, P5 y P12 sobre la membrana de los procesos axónicos en polarización (unipolares y bipolares) de las CG inmaduras, que se extienden horizontalmente en la CGE, así como en

el tercer proceso migratorio descendente que extienden las CG para comenzar su migración radial, asistidos por la GB, con objeto de formar la CGI. Los niveles de CB₁ en estos procesos axónicos inmaduros se mantuvieron constantes en las diferentes edades estudiadas. Además, el CB₁ estaba presente en los fascículos axónicos de las FP desde su aparición en la CM a P0. La presencia del receptor sobre la membrana de estas varicosidades y axones de las FP, se hizo más manifiesta a P12 y comenzó a aparecer en su posición presináptica final. Así, el estudio comparado de las diferentes edades puso en evidencia el cambio topográfico que sufre el receptor durante el desarrollo postnatal.

Si bien el patrón de expresión del receptor CB₁ en el adulto era ya conocido, nos pareció interesante extender el análisis de su distribución hasta el final de la tercera semana postnatal, a P21, ya que aunque para ese periodo la CGE ha desaparecido, continúan dándose procesos de maduración de la corteza cerebelosa, y lo comparamos con el animal adulto. Este análisis puso de relieve que el incremento que experimenta el receptor en los axones de las FP a P12 va disminuyendo hasta el adulto. La presencia postnatal temprana del receptor en la CGE en elementos que se encuentran experimentando distintos procesos de morfogénesis sugiere su participación en los distintos programas de diferenciación que ocurren durante las tres primeras semanas postnatales, en relación a la morfogénesis de las CG. Así, el CB₁ estaba presente a P0, edad a la que las CG están en plena fase de proliferación y polarización. Además, los niveles estables de expresión del receptor en estos procesos axónicos parecían indicar que está asociado también al crecimiento de los procesos axónicos inmaduros de las CG de la CGE por lo menos hasta P12.

En cuanto a las primeras fases de la creación de la CM, el receptor estaba presente en las varicosidades y axones de las FP a P0 y a P5, lo que apoya su participación en la elongación axónica que continúa hasta P12. El CB₁ estaba también presente en la migración radial asistida por la GB del tercer proceso a P5 y a P12, como indicó el marcado yuxtapuesto de CB₁ a dicho compartimento glial mediante microscopía de fluorescencia. Por otra parte, el incremento del receptor en los axones y TFP a P12, podría estar asociado a los procesos de sinaptogénesis, ya que pese a que comienzan a P7, el principal periodo

de formación de sinapsis en la rata entre las FP y CP tiene lugar a P10 (*Altman y Bayer, 1997*). Estos procesos ocurren al mismo tiempo que las fases finales de la dendritogénesis en las CP (*De la Torre-Ubieta y Bonni, 2011*).

A partir de P21 la expresión del receptor comienza a disminuir. Este resultado es coherente con el hecho de que la sinaptogénesis continúa tras la tercera semana para finalizar en la edad adulta (*Viltono y cols., 2008*). La localización del receptor CB₁ fue cambiando gradualmente a partir de la segunda semana, desde la región extrasináptica a su ubicación definitiva sobre la membrana de la TFP, en su región perisináptica, lo que coincide con lo descrito por Kawamura y colaboradores (2006).

Al igual que en nuestros resultados, estudios desarrollados en CG en cultivo, han detectado la expresión del receptor CB₁ tanto en los precursores de la CG como en las CG diferenciadas (*Nogueron y cols., 2001; Trazzi y cols., 2010*). Además, han descrito una localización preferente en la membrana plasmática, incluyendo los procesos neuríticos (*Nogueron y cols., 2001; Trazzi y cols., 2010*). Estudios realizados tanto en cultivo como *in vivo* en animales carentes de CB₁, han demostrado que la activación de CB₁ es importante para la proliferación de los precursores de CG (*Trazzi y cols., 2010*). Williams y colaboradores (2003), por su parte, han estudiado los conos de crecimiento donde han demostrado que la activación de CB₁ promueve su crecimiento. De todas formas, existe controversia en relación al papel que juega el CB₁ en el crecimiento de las neuritas; así, mientras algunos autores coinciden con lo visto en el cerebelo por Williams y colaboradores (*Zorina y cols., 2010*) otros han reportado que en otros sistemas, como en el cortical, induce una inhibición de las mismas (*Berghuis y cols., 2005; Vitalis y cols., 2008*). A su vez, existen trabajos que han evidenciado que la activación de CB₁ regula positivamente la longitud axónica, mientras que su inhibición aumenta el número de puntos de arborización (*Mulder y cols., 2008*) y disminuye la longitud de las neuritas principales (*Oudin y cols., 2011*). Estudios más recientes han apoyado este hecho, demostrando que la inhibición de la señalización cannabinoide *in vitro* e *in vivo* produce un acortamiento y ramificación del proceso conductor y afecta con severidad a la eficiencia de la migración (*Zhou y cols., 2015*).

Con respecto al incremento de expresión observado a P12, diferentes estudios han mostrado este tipo de picos, como es el caso de las neuronas corticales, donde los niveles de CB₁ alcanzan una máxima expresión durante todo el período de elongación axónica reduciéndose progresivamente una vez termina la sinaptogénesis (*Bisogno y cols., 2003; Begbie y cols., 2004; Berghuis y cols., 2007; Mulder y cols., 2008; Watson y cols., 2008*). Estudios realizados en otros sistemas, demostraron también niveles crecientes del receptor durante la especificación neuronal y la sinaptogénesis (*Wang y cols., 2003*). De hecho, hay estudios que han reportado que la eliminación de CB₁ de los tractos axónicos en desarrollo coincide con la finalización de la sinaptogénesis y la selección de la diana postsináptica (*Fernandez-Ruiz y cols., 2000; Berghuis y cols., 2005,2007*).

6.1.2. Localización de diacilglicerol lipasa-alfa (DAGL- α)

En segundo lugar, hemos descrito la localización a nivel de microscopía de luz y la localización precisa a nivel subcelular del enzima DAGL- α en la corteza cerebelosa postnatal a P0, P5 y P12. Nuestros resultados desarrollados a nivel de microscopía de luz han demostrado la presencia del enzima en procesos axónicos inmaduros de las CG en la CGE, yuxtapuesto a la GB. Según avanzaba el desarrollo, la presencia del enzima se fue haciendo cada vez más notable en la CM, en la superficie somatodendrítica de las CP, sobre todo a partir de P5.

Un análisis más exhaustivo de la distribución del DAGL- α a nivel subcelular, corroboró su expresión en la corteza cerebelosa postnatal a P0, P5 y P12. El enzima se observó en los procesos axónicos inmaduros de las CG de la CGE desde el nacimiento (P0) y su presencia fue más notable a P5 y sobre todo a P12. Concretamente, localizamos el DAGL- α en la inmediación de la membrana de los procesos axónicos con morfología monopolar y bipolar que se extienden horizontalmente en la CGE así como en el tercer proceso axónico descendente, orientado verticalmente, que extienden las CG inmaduras premigratorias. Respecto a las varicosidades y axones de las FP inmaduras en la CM, el DAGL- α mostró una presencia mayor en la proximidad de la membrana de dichos perfiles a

P0 y disminuyó drásticamente a P5 y P12. Esta disminución acompañó al incremento del enzima en el elemento postsináptico de las FP, las espinas dendríticas de las CP, mostrando así la localización última que muestra el enzima en el adulto.

Si bien en el trabajo realizado por Yoshida y colaboradores (2006) ya se describió la localización de DAGL- α a P10 en la CM, dicho trabajo no hace alusión a la CGE, donde nuestros resultados evidenciaron la presencia del enzima. En lo que se refiere a la CM, nuestro estudio confirmó lo descrito por el grupo de Watanabe, donde mostraron que el DAGL- α se expresa predominantemente en la membrana de la base del cuello de la espina dendrítica de las CP y por otro lado, demostraron la ausencia del enzima en los procesos de la GB.

Nuestros resultados, en su conjunto, al igual que en caso del CB₁, indican una posible participación de DAGL- α en la morfogénesis de las CG de la CGE. Una vez comienzan los procesos de espinogénesis de las CP y la sinaptogénesis, su localización se restringe al elemento postsináptico. Al igual que en el caso de la corteza cerebelosa, otros sistemas sufren similares aumentos de DAGL a nivel somatodendrítico una vez termina la sinaptogénesis (*Bisogno y cols., 2003; Begbie y cols., 2004; Berghuis y cols., 2007; Mulder y cols., 2008; Watson y cols., 2008*). Bisogno y colaboradores (2003), grupo pionero en la caracterización de los enzimas DAGL- α y β , demostraron en cultivos de neuronas cerebelosas de rata que la expresión de ambos enzimas cambia de tractos axónicos en el embrión a campos dendríticos en el adulto. El cambio durante el desarrollo del requerimiento de síntesis de 2-AG desde el compartimento pre-al postsináptico parece estar indicando un cambio en la función en la que está implicado el enzima. A este respecto, Mulder y colaboradores (2008) en un trabajo desarrollado en el sistema cortical, demostraron que DAGL- α es la principal isoforma del enzima que se concentra en los conos de crecimiento axónicos. Asimismo, observaron que los niveles permanecen elevados en axones en desarrollo y experimentan una redistribución durante la maduración axónica y especificación sináptica.

Así, nuestros resultados han aportado una evidencia anatómica respecto al cambio espacial y temporal que sufre el enzima relativo a las dos funciones claramente distinguibles del DAGL- α , una, respecto de su función en los procesos del desarrollo cerebeloso postnatal y otra, en el adulto, donde se le requiere postsinápticamente a fin de modular la neurotransmisión.

6.1.3. Localización de monoacilglicerol lipasa (MAGL)

Con respecto al MAGL estudios recientes han descrito su expresión en el cerebelo, mostrando a nivel de microscopía de luz su presencia por lo menos en la CM a P12, detallando más precisamente una localización subcelular preferente en el citoplasma de las TFP y débil en la GB (*Tanimura y cols., 2012*). Sin embargo, al igual que en los casos anteriores, existe un vacío con respecto a lo que sucede en etapas más tempranas del desarrollo cerebeloso postnatal, tanto en la CGE así como en la CM.

Nuestros resultados han mostrado una presencia patente en la corteza cerebelosa en los días postnatales 0 (P0), P5 y P12. A nivel ultraestructural el enzima se localizó en distintos compartimentos de las FP dependiendo de la distinta etapa del desarrollo y maduración postnatal en la que nos encontrábamos.

Así, observamos el enzima tanto en la membrana como en el citoplasma de los procesos axónicos inmaduros de las CG en proceso de polarización que se extienden horizontalmente en la CGE, así como en el tercer proceso premigratorio verticalmente orientado hacia la CM, a P0, P5 y P12. Fue a P12 cuando se hizo más notable la presencia del enzima en los procesos axónicos inmaduros de las CG en la CGE. Las varicosidades y axones de las FP inmaduras en la CM también mostraron expresión de MAGL. Dicho enzima, aunque tiene una expresión notable en el nacimiento (a P0), incrementó en la segunda semana postnatal, en particular a P12 en dicha capa.

El análisis de la densidad permitió determinar concretamente la localización predominante en cada edad. Así, MAGL se localizó tanto en las cercanías de la membrana como en el citoplasma de los compartimentos axónicos inmaduros de las CG en la CGE,

así como en las varicosidades y axones de las FP en la CM. Respecto a los botones terminales de las FP que aparecen a P12, el enzima estaba presente tanto en la membrana como en su citoplasma hasta por lo menos P21, edad a partir de la cual MAGL desapareció casi completamente de las varicosidades y axones de las FP y se situó en su posición final, casi con exclusividad dentro de la terminal de la FP, lo que coincide con el cambio en su función.

La presencia de MAGL en los procesos axónicos inmaduros tanto de la CGE como en las varicosidades y axones de la CM a P0, P5 y P12 sugiere que al igual que en los casos anteriores, este enzima también participa en los procesos de diferenciación de las CG anteriormente descritos. El hecho de que el enzima estuviera presente tanto en la membrana como en el citoplasma de estos procesos axónicos inmaduros desde P0 hasta por lo menos P12, sugiere que MAGL podría estar involucrado de alguna manera en una regulación muy fina circunscrita a las inmediaciones de la membrana, que participaría en el crecimiento y migración de estos axones. De hecho, MAGL experimentó una localización dinámica y específica durante estas etapas tempranas del desarrollo postnatal, en relación, muy probablemente, a la necesidad de regular o controlar la extensión temporal de cada evento del desarrollo actuando sobre su sustrato, el 2-AG. Labar y colaboradores (2010) que determinaron la estructura cristalina de MAGL humano, reportaron que esta proteína contiene un acceso amplio e hidrofóbico al sitio catalítico que está cubierto por una hélice apolar que permite a la proteína soluble estar tanto en contacto próximo como anclarse a la membrana a fin de reclutar sustratos lipídicos desde su entorno y conducirlos al sitio activo para frenar su acción.

Además, el incremento de MAGL a P12 en los axones de las FP en la CM y la notable presencia a esta edad en las TFP, con una alta densidad en la membrana como en el citoplasma de los mismos hasta por lo menos P21, parece reforzar la idea de la participación del enzima en el control de la sinaptogénesis y la maduración de las sinapsis, ya que en el animal adulto, MAGL desapareció casi completamente de la membrana y del citoplasma de las varicosidades y axones para situarse en su posición final, prevalentemente dentro de la TFP, lo que es consistente con estudios previos que

demonstraron que el enzima se localiza dentro de las TFP (*Tanimura y cols., 2012*). Por el contrario, en astrocitos y terminales inhibitoras del tercio interno de la CM del giro dentado del animal adulto, MAGL se localiza en la membrana plasmática además de en el citoplasma (*Uchigashima y cols., 2011*), lo que es consistente con estudios previos que reportaron una distribución tanto citoplasmática como asociada a membrana de MAGL en el adulto (*Dinh y cols., 2002; Blankman y cols., 2007*).

6.1.4. Descripción conjunta de los componentes del SEC en el desarrollo de la corteza cerebelosa postnatal

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo, proporcionan una descripción exhaustiva de la localización anatómica precisa del receptor CB₁ y los enzimas DAGL- α y MAGL, dando un sustrato morfológico *in situ* a los diferentes trabajos que han estudiado la implicación del SEC en el desarrollo, estudios mayormente funcionales realizados a nivel de cerebelo, sobre todo en cultivos. Hemos establecido una base morfológica que muestra la importancia del SEC en los procesos implicados en el desarrollo cerebeloso postnatal. El comportamiento de estos tres componentes integrantes del SEC y su relevancia funcional, no se pueden entender, sin embargo, sin su acción conjunta e interacciones con otros sistemas.

Como hemos venido indicando a lo largo de este trabajo, las CG experimentan procesos de proliferación y diferenciación en la CGE durante las tres primeras semanas postnatales. La diferenciación neuronal conduce hacia la adquisición de las características propias del tipo neuronal, donde están implicados diversos procesos como la neuritogénesis, la polarización neuronal y el crecimiento así como la migración de las neuritas con el objetivo de alcanzar la diana postsináptica específica.

El hecho de que el receptor CB₁ y el enzima de síntesis del eCB 2-AG, el DAGL- α , mostraran una misma localización en los procesos axónicos inmaduros de las CG, sugiere que el 2-AG sintetizado por el DAGL- α podría activar el CB₁ presente en el mismo compartimento axónico, lo que es coherente con trabajos previos que han demostrado que

en el cerebelo en cultivo, el DAGL- α dentro del cono de crecimiento, capacita al 2-AG para actuar de manera autocrina sobre los CB₁ a fin de promover el crecimiento y guía axónicos (*Williams y cols., 2003*), algo que ocurre en otros sistemas como los axones corticofugales donde esta señalización autocrina de 2-AG podría ser suficiente para promover su elongación (*Maccarrone y cols., 2014*). De igual modo, en el trabajo desarrollado (*in vitro* e *in situ*) por Keimpema y colaboradores (2011) en el sistema cortical en desarrollo, se reportó que la coincidencia axónica de DAGL y CB₁ apunta a la hipótesis de que la señalización autocrina de 2-AG facilita el brote axónico y limita el viraje del cono de crecimiento, en cuyo segmento móvil esta señalización participaría en la decisión de la dirección a tomar. Por otro lado, Maccarrone y colaboradores (2014) han mostrado que esta señalización eCB autocrina conduce a la proliferación celular de progenitores neurales durante la corticogénesis. Así, mediante una señalización autocrina, tanto el enzima como el receptor, participarían al menos en algunos de los procesos implicados en la morfogénesis de las CG.

MAGL, por su parte, presentó una distribución diferente al del receptor y al del enzima de síntesis de 2-AG aún estando en los mismos compartimentos axónicos de las CG. Además, MAGL mostró una tendencia similar a DAGL- α en la CGE, en cuanto a que sus niveles fueron más elevados hacia P12. Teniendo en cuenta que es el enzima responsable principal de la hidrólisis de 2-AG, este patrón dinámico de distribución que observamos, podría estar relacionado con la necesidad de controlar los niveles de 2-AG y, por lo tanto, estaría ejerciendo un control sobre los efectos de la activación del receptor CB₁ por 2-AG en cada proceso del desarrollo en particular.

Nuestros resultados concuerdan con lo observado en otros sistemas *in vitro*, donde han demostrado que durante la polarización neuronal estos tres componentes del SEC están co-transportados a lo largo del axón recién diferenciado (*Berghuis y cols., 2007; Mulder y cols., 2008; Keimpema y cols., 2010; Wu y cols., 2010*), para permitir un correcto crecimiento (*Keimpema y cols., 2010*) y guía axónicos así como la formación de sinapsis (*Williams y cols., 2003; Berghuis y cols., 2007; Watson y cols., 2008*).

De tal modo, la presencia de MAGL en el citoplasma como en la membrana de los axones inmaduros concuerda tanto con su carácter citoplasmático (*Dinh y cols., 2002; Blankman y cols., 2007; Uchigashima y cols., 2011*), como con ser reclutado a la membrana plasmática para inactivar 2-AG (*Labar y cols., 2010*). De esta manera, MAGL ejercería su acción modulando el crecimiento de los axones controlando los niveles de 2-AG. Estaría presente tanto en la membrana como en el citoplasma a fin de regular la velocidad del crecimiento inducida de manera autocrina por 2-AG sobre CB₁ y haciendo disminuir dicho crecimiento cuando el axón se aproxima a su diana postsináptica (*Keimpema y cols., 2010*). MAGL, además, está excluido de los conos de crecimiento (*Keimpema y cols., 2013b*) hasta que concluye la sinaptogénesis (*Keimpema y cols., 2010*) permitiendo así el avance del crecimiento neurítico mediado por 2-AG. Una vez ocurre la sinaptogénesis (*Keimpema y cols., 2011*) y la maduración de estas sinapsis (*Viltono y cols., 2008*), MAGL se redistribuye en el interior de la TFP (*Dinh y cols., 2002; Gulyas y cols., 2004; Kano y cols., 2009; Keimpema y cols., 2010*) para dar fin (tras la activación de CB₁) a la señalización de 2-AG en relación a la modulación de la neurotransmisión. El 2-AG, tras la unión a los CB₁ presentes en las terminales presinápticas de las FP, se degrada principalmente por MAGL localizada en las FP y la GB (*Tanimura y cols., 2012*).

En la CM, los axones de las FP continúan creciendo hacia su diana, las espinas dendríticas de las CP. Las CP a estas edades están experimentando procesos de dendritogénesis y espinogénesis desencadenados por su interacción con las propias FP así como con las FT y factores liberados desde la GB (*Baptista y cols., 1994; Furuya y cols., 2000; De la Torre-Ubieta y Azad Bonni, 2011*). En los axones de las FP de la CM, los niveles del receptor CB₁ incrementaron drásticamente a P12 coincidiendo con el momento cumbre de la sinaptogénesis, para localizarse a partir de este momento en su posición final sobre la membrana de las TFP. Curiosamente a P12, los niveles de DAGL- α disminuyeron y comenzó a mostrar una localización postsináptica en las CP. Por lo tanto, es a partir de P12 cuando comienza a decaer la señalización autocrina del SEC en relación al neurodesarrollo en favor de una función neuromoduladora, donde 2-AG sintetizado

postsinápticamente por DAGL- α activaría el receptor CB₁ presináptico de forma retrógrada o paracrina.

Respecto a MAGL, mostró sus niveles más elevados a P12 al igual que el receptor, donde se localizó en el citoplasma y en la membrana de los axones de las FP donde presumiblemente inactivaría 2-AG permitiendo así el establecimiento de la sinapsis. De hecho, la presencia de MAGL tanto en la membrana como en el citoplasma de las TFP apoyaría este hecho, ya que a partir de P21 una vez establecida y madurada la sinapsis, comenzó a mostrar su posición característica final en el citoplasma de las TFP. De este modo, MAGL a nivel presináptico estaría regulando los niveles de 2-AG relativo a su papel en la modulación de la neurotransmisión. Nuestros resultados a este respecto apoyan lo observado previamente por otros autores que han demostrado que la expresión de CB₁ en las neuronas corticales se reduce una vez termina la sinaptogénesis (*Bisogno y cols., 2003; Begbie y cols., 2004; Berghuis y cols., 2007; Mulder y cols., 2008; Watson y cols., 2008*).

6.1.4.1. Esquema final de la localización de los componentes del SEC en el desarrollo postnatal de la corteza cerebelosa

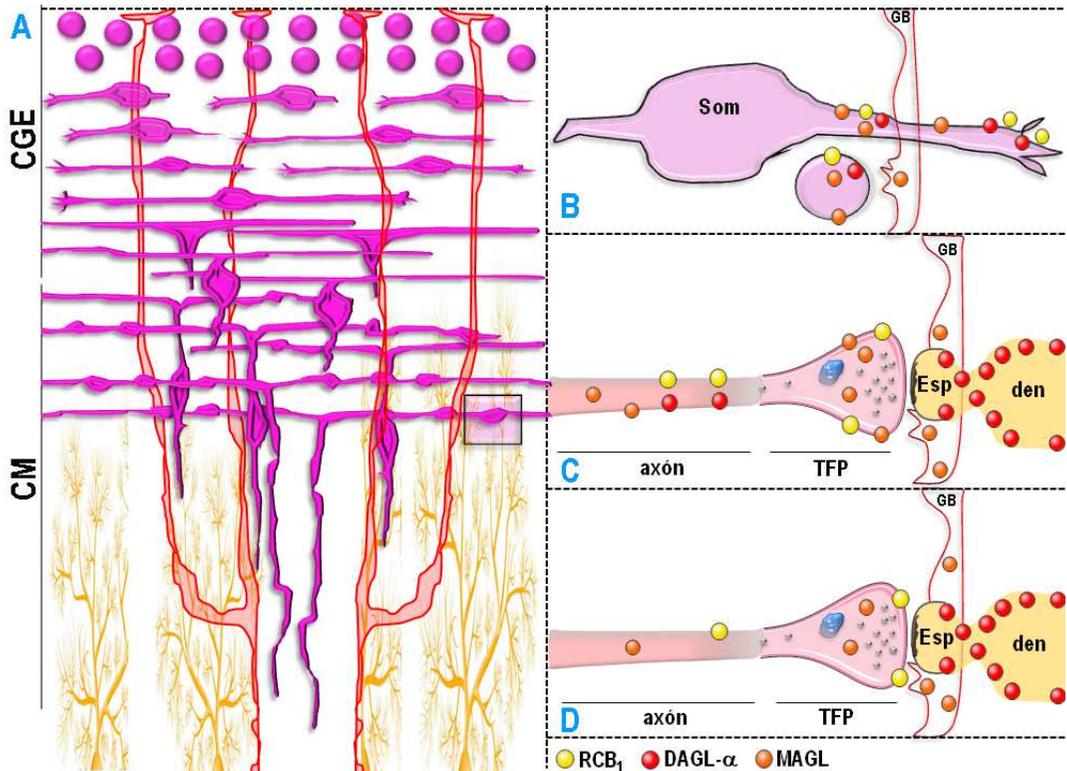


Figura 48: El esquema A, ilustra las distintas etapas de la morfogénesis de las células granulares (en morado) que acontecen postnatalmente en la corteza cerebelosa. El esquema B muestra la CG en polarización con sus característicos procesos axónicos inmaduros en navegación y crecimiento que junto con la GB, constituyen la CGE. Las imágenes en C y D son la representación ampliada del recuadro en A, en las que se recogen los distintos componentes celulares presentes en la CM de la corteza cerebelosa. En las imágenes B, C y D se muestra la localización subcelular específica que muestran el receptor de cannabinoides CB₁ (círculo amarillo), y los enzimas de síntesis y degradación del eCB 2-AG, DAGL- α (círculo rojo) y MAGL (círculo naranja), respectivamente, durante el desarrollo postnatal a P0 (B), P5 (B), P12 (B,C), P21 (D) y en el animal adulto (D) en base a los resultados obtenidos. CGE, capa granular externa; CM, capa molecular; GB, glía de Bergmann; TFP, terminal de la fibra paralela; Esp, espina; den, dendrita; Som, soma.

6.1.5. Interacción del SEC con otros sistemas durante el desarrollo cerebeloso postnatal

Los acontecimientos que se dan en el desarrollo del SNC, son procesos complejos que interrelacionan y coordinan diferentes vías de señalización, muchas de las cuales interaccionan con el SEC. En este sentido, los componentes eCB presentes en la corteza cerebelosa en desarrollo postnatal descritos en este trabajo están con toda seguridad interactuando con esos otros sistemas a fin de orquestar cada uno de los procesos que acontecen con objetivo de alcanzar una morfología adulta específica.

En relación a los procesos de proliferación, como se ha mencionado en el apartado anterior, observamos la presencia de diferentes componentes del SEC en las células premitóticas que se encuentran en proliferación desde P0 en la región más externa de la CGE. Al igual que nosotros, Trazzi y colaboradores (2010) han demostrado la presencia del receptor CB₁ en las células precursoras de las células granulares (PCG) durante el desarrollo cerebeloso temprano *in vitro* y reportan que agonistas CB₁ promueven la proliferación de estos precursores. Esta proliferación, sin embargo, se vió levemente afectada en los ratones carentes de CB₁, lo que sugirió que si bien el SEC está implicado en este proceso, existen redundancias en las vías proliferativas y que posibles mecanismos de compensación normalizan la ausencia del receptor CB₁. En este sentido, Minichiello y Klein (1996), demostraron que se requieren neurotrofinas y factores de crecimiento para la supervivencia de las CG del cerebelo al igual que ocurre con las neuronas del giro dentado del hipocampo. Concretamente, los receptores tropomiosina quinasa TrkB y TrkC, que están co-expresados en las CG del cerebelo son esenciales para su supervivencia. Estas neuronas pueden sobrevivir *in vivo* en presencia de ligandos del TrkB (BDNF; del inglés, *Brain-derived neurotrophic factor* y NT4/5; del inglés *Neurotrophin-4/5*) o del TrkC (NT3; del inglés *Neurotrophin-3*) sin otra fuente de factores de supervivencia (Klein y cols., 1990; Bengzon y cols., 1993; Tessarollo y cols., 1993; Lamballe y cols., 1994; Lindvall y cols., 1994; Segal y cols., 1995).

El SEC, junto con los factores liberados desde las propias PCG como son el NT3 o el BDNF trabajarían en conjunto, para que esta proliferación sea un proceso controlado, coordinado y frenado en el momento que las CG alcanzan su fenotipo diferenciado postmitótico (*Gaffuri y cols., 2012*).

Tras la proliferación y, una vez alcanzado el fenotipo postmitótico, las CG comienzan a sufrir procesos de diferenciación. Como se ha venido describiendo en apartados anteriores, los componentes del SEC están presentes tanto en los procesos horizontales como en los radiales que se han generado en las CG postmitóticas diferenciadas. Al igual que en la fase de proliferación, en la fase de diferenciación la interacción entre el SEC y factores de crecimiento parece ser importante. En ese sentido parece que el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (RFGF; del inglés, *fibroblast growth factor receptors*) es fundamental en la regulación del crecimiento neurítico (*Williams y cols., 2003*). El grupo de Doherty (2003) ha demostrado que la activación del RFGF por las moléculas de adhesión (CAMs; del inglés, *Cell adhesion molecules*) induce el brote neurítico en las CG *in vitro*, de manera dependiente de CB₁. Por ejemplo, la activación del RFGF por la N-cadherina y el FGF2 induciría el crecimiento neurítico mediante el acoplamiento de la hidrólisis de DAG por DAGL a la cascada de señalización dependiente de calcio a través de canales de calcio (*Doherty y cols., 1991a, 1995; Williams y cols., 1994b, 1994c; Lom y cols., 1998*). Por otro lado, la inhibición de CB₁ y DAGL- α abole el brote neurítico inducido por neurotrofinas (*Brittis y cols., 1996; Williams y cols., 2003; Keimpema y cols., 2013a*) en las CG cerebelosas y neuronas subcorticales (*in vitro, in vivo, in situ*), lo que apoya la hipótesis de que la señalización por neurotrofinas que interacciona con eCBs para regular el crecimiento neurítico, podría estar dándose también en nuestro sistema.

Parece ser que para la diferenciación los niveles de Ca²⁺ en el interior de los axones en crecimiento podrían estar en la base de la activación de una cascada de señalización intracelular que resulta en la hidrólisis de DAG por DAGL- α anclada a la membrana, generándose 2-AG. Estos niveles estarían regulados por los canales de calcio presentes en las CG, junto con la activación de los receptores NMDA (*Komuro y cols., 2015*). Este 2-AG actuaría probablemente de manera autocrina sobre los CB₁ localizados en la membrana

de estos axones en desarrollo como se ha mencionado anteriormente. MAGL presente en estos axones, podría actuar como detector de los niveles de 2-AG, como sucede en otros sistemas, por ejemplo en el sistema cortical, regulando así el proceso de crecimiento. La localización en el interior del axón o en yuxtaposición a la membrana podría estar indicando el estado en reposo o funcional, respectivamente, de MAGL con respecto a la degradación de 2-AG. El anclaje de MAGL a la membrana plasmática, inactivaría 2-AG y controlaría el efecto en la respuesta del crecimiento axónico. El RFGF activado por las CAMs converge en la misma señalización intracelular que el SEC donde se genera DAG y a través de DAGL- α , contribuiría a la síntesis de 2-AG. Este hecho podría refinar o potenciar la acción del SEC en relación al crecimiento neurítico. El BDNF, sin embargo, parece participar en el crecimiento neurítico vía el receptor TrkB a través de una vía de señalización intracelular distinta a la de RFGF y CB₁ que funciona de manera independiente de DAG (*Lom y cols., 1998*).

El crecimiento y la retracción de los procesos en crecimiento pueden depender de la presencia o no de factores externos, así como de señales químicas o eléctricas que pudieran darse. El crecimiento axónico conlleva diversos aspectos como el de mantener una adecuada velocidad de crecimiento, así como una correcta trayectoria axónica, con el fin de alcanzar en fascículos organizados la diana postsináptica específica y su llegada a la CGI en la fase apropiada. Las CG cambian la dirección, la modalidad y velocidad de su migración cuando atraviesan las distintas capas de la corteza cerebelosa (*Komuro y cols., 2015*). Estos cambios en la velocidad, están gobernados y orquestados por neuropéptidos, neurotransmisores, neurotrofinas y componentes de la matriz extracelular como las CAMs (*Bénard y cols., 2015*) y, presumiblemente, por el SEC.

Nuestros resultados han mostrado a nivel ultraestructural la presencia del SEC en los procesos de las CG en migración radial seguido de su soma y ayudado por el andamiaje ofrecido por la GB y presumiblemente por otros factores del entorno, para alcanzar su destino definitivo en la CGI. Podría ser que el 2-AG producido por los propios axones inmaduros a su paso por la CM, activaran el receptor CB₁ de manera autocrina a fin de

promover la migración controlada de este proceso conductor. Dicha migración estaría controlada, una vez más, por MAGL.

Cabe destacar que, a P12, algunas de las FP han establecido en la CM sinapsis con las espinas dendríticas de las CP. Estas FP que han alcanzado su posición final son una fuente de glutamato extracelular para la CM del cerebelo en desarrollo (*Levi y cols., 1991*). Se conoce que las CG no establecen sinapsis durante su migración (*Rakic y Sidman, 1973*) y por lo tanto, el glutamato liberado desde estas sinapsis recién formadas podría activar de manera paracrina los receptores NMDA de las CG en migración (*Komuro y Rakic, 1993*) contribuyendo de este modo a la señalización eCB autocrina de aquellas FP en proceso de crecimiento hacia la diana postsináptica. De hecho, la activación de los receptores NMDA en las CG en cultivo afecta al brote neurítico, la morfología y al citoesqueleto a través del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo que sugiere que *in vivo* la migración de las CG podría darse a través de un mecanismo similar (*Rashid y Cambrey-Deakin, 1992*).

La convergencia en las vías de señalización de las CAMs a través de las neurotrofinas y de la interacción de éstas con el SEC durante los procesos del desarrollo de la corteza cerebelosa postnatal observada en diferentes estudios, nos lleva a pensar que durante el proceso de migración radial, estos dos sistemas podrían intercomunicarse y modularse entre sí, potenciándose o inhibiéndose a fin de conseguir una migración espacio-temporal apropiada. En esta línea, existen trabajos previos que han demostrado la participación de neurotrofinas y factores de crecimiento en la migración de las CG. El grupo de Segal (2002) demostró que el BDNF ejerce acciones de motilidad (presumiblemente a través de la activación del TrkB) y quimiotácticas a través de la producción de señales de dirección, promoviendo de manera autocrina o paracrina el inicio de la migración radial de las CG a lo largo de las fibras gliales. Así, las CG *in vivo* migran desde la CGE pobre en niveles proteicos de BDNF hacia la CGI, con altos niveles del mismo. En consonancia, Liliana Minichiello y Riidiger Klein (1996) demostraron que las CG requieren de la señalización mediada por ambos receptores TrkB y TrKC antes de migrar desde la CGE a

la CGI. Sin embargo, no se ha estudiado si existe interacción entre estas vías de señalización y el SEC en concreto en la migración radial de las CG.

Otro hito en la creación de la corteza cerebelosa madura, como hemos venido describiendo, es la formación de la CM en la que se establecen las sinapsis entre FP y espinas dendríticas de las CP. En paralelo a la migración radial de la CGE hacia la CGI, tienen lugar procesos de espinogénesis y dendritogénesis de las CP en la CM (*Furuya y cols., 2000; De la Torre-Ubieta y Azad Bonni, 2011*). De hecho, la CGI y la CM se forman simultáneamente. Por un lado, se continúa dando la elongación del tercer proceso hasta alcanzar la CGI y, por otro lado, los procesos horizontales que forman las FP se van elongando junto a las arborizaciones de las CP de la CM. Así, en la CM, se darán cruces de señalizaciones muy específicas y ajustadas que darán origen al tremendo circuito que se establece en la CM de la corteza cerebelosa. Por un lado, tenemos la liberación de glutamato de las propias FP que podría activar receptores NMDA localizados en el proceso radial, pero también en las FP contiguas que continúan desarrollándose. Por otro lado, comenzamos a tener dos fuentes de 2-AG, una producida por los propios axones inmaduros, proceso radial y FP en desarrollo de la CM, y una nueva, originada en las dendritas de las CP, que da comienzo a P7.

Nuestros resultados han mostrado que a P12, periodo en el que la sinaptogénesis en la CM alcanza su máximo, existen cambios muy llamativos en relación a los niveles de los tres componentes del SEC estudiados en las FP en desarrollo. El receptor CB₁ y MAGL, mostraron su expresión máxima mientras que los niveles de DAGL- α disminuyeron dejándose de expresar en los axones de las FP para situarse en las espinas y región somatodendrítica de las CP. Además, a P12 comenzamos a observar CB₁ en su localización adulta final en la membrana de los botones terminales de las FP. Respecto a MAGL, a P12 y por lo menos hasta P21, aparece en las TFP donde se localizó no sólo en el citoplasma sino también en la membrana de estos botones terminales, para finalmente en el adulto localizarse casi exclusivamente en su citoplasma. Estos resultados sugieren que el crecimiento axónico mediado por la activación autocrina de CB₁ por el 2-AG sintetizado en el mismo axón, se vería afectado por el cambio de expresión a P12 de DAGL- α desde el

axón de las FP al elemento postsináptico y por el aumento de MAGL en estos axones, en relación con los cambios en los requerimientos funcionales.

Durante el crecimiento axónico, ocurre una constante remodelación de la actina en el cono de crecimiento donde, entre otros agentes, el receptor CB₁ participa actuando sobre las pequeñas GTPasas (*Berghuis y cols., 2007*). Cuando el cono de crecimiento se acerca a la espina dendrítica de las CP, la disminución de la activación autocrina de CB₁ y la entrada de MAGL en el cono de crecimiento eliminando cualquier indicio de 2-AG frenaría el crecimiento y permitiría, a su vez, el establecimiento de contactos sinápticos como se ha observado en el sistema cortical en desarrollo (en axones corticofugales de las células piramidales) (*Keimpema y cols., 2011*). El SEC está presente en la sinaptogénesis y modifica su disposición en el transcurso de la misma para, una vez finalizada, comenzar a funcionar en el *modus operandi* adulto, modulando la liberación del neurotransmisor.

6.2. CAMBIOS MORFOLÓGICOS ULTRAESTRUCTURALES EN AUSENCIA DEL RECEPTOR CB₁

Diversos estudios morfológicos llevados a cabo en animales *knockout* para el receptor CB₁ y los enzimas de síntesis y degradación de 2-AG, DAGLs y MAGL, respectivamente, coinciden en la existencia en los KOs de una anatomía topográfica normal, así como un fenotipo similar al de los animales silvestres para dichos componentes (*Mulder y cols., 2008; Chanda y cols., 2010; Tanimura y cols., 2010*), lo que sugiere que han de existir mecanismos adaptativos que suplan la carencia de dichos componentes durante el desarrollo.

Estudios electrofisiológicos desarrollados en el cerebelo de ratones han mostrado, sin embargo, cambios destacados en la plasticidad sináptica. En estos animales, la DSE y DSI mediadas por eCBs desaparecen; este hecho viene acompañado de un déficit en el incremento de 2-AG inducido por estimulación, lo cual no impide que presenten una transmisión sináptica basal normal (*Tanimura y cols., 2010*). En el cerebelo de los

ratones *MAGL-KO*, la falta de *MAGL* prolonga la DSE mediada por *mGluR1* y causa una supresión tónica de la transmisión excitadora basal y una desensibilización de *CB₁* (Zhong y cols., 2011). No obstante, exhiben una actividad motora normal (Chanda y cols., 2010). En el cerebelo de ratones *CB₁-KO*, desaparecen la DSE, DSI y la SSE expresadas presinápticamente (Safo y Regehr, 2005; Kawamura y cols., 2006), así como la LTD postsináptica (Safo y Regehr, 2005). Cabe destacar que en los ratones que carecen selectivamente de *CB₁* desde P18 en las células granulares del cerebelo, (ratones *CB₁α6⁻*), la DSE y la SSE presinápticas así como la LTD postsináptica desaparecen, mientras que la LTP presináptica se mantiene en las sinapsis de las FP-CP (Carey y cols., 2011).

Como hemos mencionado anteriormente, en ningún modelo de ratones *CB₁-KO* se evidencian defectos marcados en el desarrollo del SNC ni tampoco un fenotipo de comportamiento alterado. En el sistema cortical de ratones *CB₁-KO*, Mulder y colaboradores (2008) observaron que el desarrollo axónico alterado observado en el embrión estaba compensado ya en momento del nacimiento; sin embargo, los axones fallaban en alcanzar su diana natural y la elongación axónica estaba perturbada debido a la ausencia de señalización de *CB₁* durante el periodo embrionario, periodo crítico para la especificación morfológica y funcional de las células piramidales. La solidez o resistencia presente en el desarrollo del SNC observado en los animales *knockout* podría explicarse por la existencia de vías redundantes a distintos niveles; en este sentido, las vías de señalización corriente arriba que convergen en los mismos efectores que los *CB₁*, podrían mostrar una regulación compensatoria (Gaffuri y cols., 2012).

Existen algunos estudios, sin embargo, que han puesto de relieve déficits que presentan estos animales respecto al animal no modificado genéticamente, por ejemplo, en cuanto a la coordinación motora (Zimmer y cols., 1999; Kishimoto y Kano, 2006; Cutando y cols., 2013) y los mecanismos electrofisiológicos relacionados con éstos (Safo y Regehr, 2005; Kawamura y cols., 2006; Carey y cols., 2011). Por ejemplo, los receptores *CB₁* regulan los procesos de plasticidad a corto y a largo plazo en las sinapsis glutamatérgicas FP-CP (Kreitzer y Regehr, 2001a; Maejima y cols., 2001b, 2005; Brown y cols., 2003; Brenowitz y Regehr, 2005; Carey y cols., 2011), de entre las

cuales la LTD postsináptica es predominante en el aprendizaje condicionado dependiente del cerebelo, en concreto, en el condicionamiento retardado del parpadeo (*Thompson y Kim, 1996*). Los ratones que son CB_1 -KO de forma constitutiva, muestran un déficit completo en la adquisición del condicionamiento retardado de parpadeo (*Kishimoto y Kano, 2006*). Otro ejemplo, es un reciente estudio que ha demostrado que los animales CB_1 -KO y ratones carentes de CB_1 específicamente en las FP ($CB_1\alpha6^-$) presentan un fenotipo neuroinflamatorio en el cerebelo derivado de la activación microglial, que se correlaciona con los déficits en el aprendizaje cerebeloso condicionado y la coordinación motora (*Cutando y cols., 2013*).

En el presente trabajo, nos hemos preguntado el impacto que tiene la ausencia del receptor CB_1 en el desarrollo directo de las FP, habida cuenta de la importancia que el SEC tiene en su desarrollo, y si los mecanismos compensatorios podrían ser capaces de suplir en cierta forma esta ausencia. Debido a la falta de estudios anatómicos exhaustivos al respecto y con el fin de dar respuesta a alguna de estas cuestiones, hemos analizado detalladamente la ultraestructura de las TFP en los animales adultos que carecen del gen para el receptor CB_1 .

Hemos centrado nuestro estudio en dos regiones funcionalmente diferenciadas de la corteza cerebelosa: el vermis de los lóbulos 5 y 10 que corresponden a dos divisiones funcionales cerebelosas distintas, el espinocerebelo y el vestibulocerebelo, respectivamente. Ambos lóbulos, muestran una distinta sensibilidad al daño en situaciones patológicas (*Clark y cols., 2000; Tolbert y Clark, 2000; Orvis y cols., 2012*) y, por lo tanto, la ausencia de CB_1 podría tener consecuencias diferentes. Nos preguntamos en esta Tesis Doctoral si la distinta sensibilidad que tienen ambas divisiones pudiera tener una base anatómica. Por ello, hemos centrado el estudio en las características ultraestructurales atendiendo a diversos parámetros de las sinapsis que establecen las TFP sobre las espinas dendríticas de las CP en ambos lóbulos.

Nuestros resultados mostraron que hay diferencias entre ambos lóbulos en los animales CB_1 -WT: en el lóbulo 10 hubo un menor número de contactos sinápticos TFP-CP pero tienen sinapsis más largas. Por otro lado, el tamaño de las TFP del lóbulo 10 fue

mayor que el de las del lóbulo 5; no obstante, el número de vesículas sinápticas no varió. Por último, estudiamos la dispersión de las vesículas en la TFP; nuestros resultados indicaron que están más dispersas en el lóbulo 10. De hecho, en el lóbulo 5 hubo un mayor número de vesículas por TFP y más concentradas en la zona activa, mientras que su número decayó según nos alejamos de la sinapsis, más drásticamente que en el lóbulo 10. Estos resultados, pusieron de manifiesto las diferencias existentes en la arquitectura anatómica presináptica de las TFP correspondientes a los lóbulos 5 y 10 del ratón silvestre para CB_1 .

Una vez conocidas las diferencias existentes entre los lóbulos en el WT, analizamos las características fenotípicas de las TFP de los animales CB_1 -KO. Nuestros resultados han demostrado que existen diferencias evidentes, centradas principalmente en la sinapsis y el elemento presináptico. De tal manera, el lóbulo 5 de los CB_1 -KO presentó un número de sinapsis significativamente menor y más largas que el correspondiente al animal WT. Esta diferencia, sin embargo, no existía en el lóbulo 10. Las TFP de los animales KO presentaron un mayor tamaño en comparación a las del WT, siendo más notable la diferencia en el lóbulo 10. Otra característica distintiva fue que las terminales del lóbulo 5 del CB_1 -KO contienen un menor número de vesículas que los del WT. Nuestros resultados indicaron que el número total de vesículas por terminal del lóbulo 5 difería moderadamente entre ambos tipos de animales; no obstante, el análisis de la densidad por terminal hizo destacar esas diferencias. La densidad de vesículas en las TFP fue llamativamente menor en el lóbulo 5 y no difirió en el lóbulo 10; sin embargo, el análisis de las inmediaciones de la sinapsis puso de manifiesto las diferencias existentes entre los animales WT y KO, habiendo densidades significativamente menores en ambos lóbulos. Nuestros resultados también han mostrado que la dispersión de vesículas es diferente en el animal WT y KO. Mientras que en el lóbulo 10 el menor número de vesículas se hizo evidente desde las inmediaciones de la sinapsis, éste mantuvo el mismo patrón lineal que en el WT. En el lóbulo 5, no obstante, el número de vesículas, aunque presentes también en las inmediaciones de la zona activa, disminuyó drásticamente a partir de los 30nm de distancia desde la sinapsis.

Estos resultados en su conjunto sugieren que la ausencia del receptor CB₁ modifica, de alguna manera, la adquisición de diversas características ultraestructurales que presentan los botones terminales de las FP. Asimismo, medimos el área del elemento postsináptico directo de las TFP, es decir, las espinas de las CP; éstas permanecieron sin cambios en todos los casos estudiados. Pensamos que el sistema intenta compensar la carencia de CB₁ sobre todo en el lóbulo 5, ampliando el área de la terminal y disminuyendo la densidad vesicular en las inmediaciones de la sinapsis. Curiosamente, las características de este lóbulo 5 en el CB₁-KO fueron similares a aquellas de las del lóbulo 10 del animal silvestre. Creemos que estos cambios morfológicos que se han observado en el circuito cerebeloso, ponen de relieve mecanismos adaptativos que adquiere el circuito cerebeloso a fin de mantener un sistema funcionalmente eficiente. Estas observaciones son congruentes con estudios previos que han demostrado que el lóbulo 5 muestra una mayor sensibilidad a insultos que causan un daño cerebeloso (*Clark y cols., 2000; Tolbert y Clark, 2000; Orvis y cols., 2012*), por lo que la ausencia de CB₁ parece repercutir de forma más crítica en el lóbulo 5 que en el lóbulo 10. En ratas atáxicas como resultado de una degeneración hereditaria de las CP, Clark y colaboradores (2000) demostraron que la degeneración temporal progresiva de las CP presenta una segregación espacialmente restringida al lóbulo anterior y áreas limitadas del lóbulo posterior. Curiosamente, las CP de los lóbulos del vestibulocerebelo (9 y 10) y las partes contiguas de los lóbulos 6 y 7 no degeneran. En esta línea, Tolbert y Clark (2000) observaron que el insulto excitotóxico producido por la degeneración de las CP se corresponde con los lóbulos más sensibles, como el lóbulo anterior y determinadas áreas del lóbulo posterior, al igual que acontece en el modelo animal anteriormente indicado. Además, evidenciaron que la mayoría de las CP degeneran antes y más rápidamente en el vermis que las CP de los hemisferios. La mayoría de las CP en el área de degeneración anterior (lóbulos 1-5 y lobulillos a, b, d del lóbulo 6) mueren prematuramente durante la primera semana tras el insulto, mientras que la mayoría de las CP en el área de degeneración posterior (7b, 8 y 9 a,b,c) mueren durante la segunda semana tras el mismo. Los lóbulos menos sensibles al insulto excitotóxico son los lóbulos anteriores 6c y 7 y lóbulos posteriores 9d y 10, lo cual concuerda con lo observado en el

mismo año por Clark y colaboradores (2000). La mayor sensibilidad del lóbulo 5 podría estar en la base de lo que hemos observado en el *CB₁-KO*, pues la ausencia de *CB₁* en el lóbulo 5 tiene más impacto sobre la morfología ultraestructural de las TFP. Podría ser que al adquirir una anatomía sináptica similar a la de las TFP del lóbulo 10 del WT, ofrecieran una mayor resistencia a la actividad neuronal anormal o una mayor robustez frente a la ausencia del gen, adaptando en consecuencia el circuito cerebeloso a la situación fisiológicamente alterada a fin de conseguir una funcionalidad compensada lo más eficiente posible.

Respecto a las vesículas sinápticas (VS), se ha descrito que en las terminales sinápticas existen tres grupos clasificados en condiciones fisiológicas: grupo de reserva, grupo de reciclaje y grupo inmediatamente liberable (*Rizzoli y Betz, 2005; Denker y Rizzoli, 2010*). Los grupos de vesículas de reserva y de reciclaje están morfológicamente mezclados y por lo tanto, se diferencian principalmente por su movilidad en estudios funcionales. Las VS del grupo inmediatamente liberable pueden estar atadas a la membrana de la zona activa mediante filamentos cortos o en contacto directo con la membrana de la zona activa. En dicha zona, estas VS están muy próximas a los grupos de canales de calcio activados por voltaje, y representan la subpoblación que se libera tras la entrada de Ca^{2+} durante una actividad fisiológica normal (*Rosenmund y Stevens, 1996*). La proximidad de estas VS a los canales de Ca^{2+} es un aspecto crítico en el amarre a la zona activa y la preparación de las VS, que es la clave para la cinética y probabilidad de liberación de las VS (*Bruckner y cols., 2015*) que implica cambios en el citoesqueleto de actina (*Moreno-Lopez y cols., 2011*). Tras la fusión de las VS y la exocitosis del neurotransmisor, éstas sufren una endocitosis a fin de ser recuperadas (*Bruckner y cols., 2015*).

Se conoce que las especializaciones presinápticas son plásticas en respuesta a cambios en la actividad del sistema; cambios homeostáticos en la composición molecular y en la actividad, pueden alterar la liberación del neurotransmisor en escalas cortas de tiempo. Las bases estructurales de la plasticidad sináptica están mediadas, al menos en parte, por la naturaleza dinámica de la arquitectura presináptica (*Bruckner y cols., 2015*).

En este sentido y en relación al efecto del SEC en la plasticidad sináptica, los cambios en la fuerza sináptica inducidos por agonistas cannabinoideos, podría reflejar una disminución del pool de las vesículas inmediatamente liberables, dado que las depresiones sinápticas a corto plazo son habitualmente atribuidas a la depleción de algunas de estas vesículas (*Schneggenburger y cols., 2002; Zucker y Regerh, 2002*). Así, un reciente estudio de Franco y colaboradores (2014) desarrollado en las CG disociadas del cerebelo, ha demostrado mediante microscopía electrónica que el silenciamiento sináptico está asociado con una redistribución de las VS dentro de la terminal nerviosa, disminuyendo el número de vesículas próximo a la zona activa de la membrana plasmática (*Moulder y cols., 2004; Jiang y cols., 2010*). Los agonistas sintéticos de CB₁ y 2-AG incrementan el número de sinapsis silentes, por tanto, reduciendo significativamente el número de vesículas muy próximas a la membrana presináptica, pero sin alterar el número de VS por botón (*Franco y cols., 2014*). Los agonistas de CB₁ tienen el mismo efecto en la reducción de las VS próximas a la membrana presináptica de las sinaptosomas cerebrocorticales (*Franco y cols., 2014*). Curiosamente, este cambio en la distribución de las vesículas no lo observaron en sinaptosomas obtenidas en ratones CB₁-KO (*crn1^{-/-}*) (*Franco y cols., 2014*).

Al igual que lo observado por Franco y colaboradores (2014) en el cerebelo, estudios electrofisiológicos y de microscopía electrónica llevados a cabo en motoneuronas del hipogloso por Morales y colaboradores (2015), han demostrado que agonistas de CB₁ reducen el tamaño de las vesículas inmediatamente liberables en botones excitadores cerca de la zona activa. De tal manera, los eCBs vía CB₁ inducen una DSE mediante la reducción del grupo de vesículas capaces de liberarse inmediatamente en las sinapsis excitadoras, atenuando la actividad de la motoneurona y por lo tanto, reduciendo la probabilidad de liberación vesicular. Sin embargo, no observaron cambios en la longitud de la zona activa, ni en el número de zonas activas por botón, ni tampoco en el número promedio de botones excitadores por motoneurona y área del botón.

En los CB₁-KO desaparecen las plasticidades a corto y a largo plazo (*Safo y Regehr, 2005; Kawamura y cols., 2006*), como hemos mencionado anteriormente.

Franco y colaboradores (2014) no detectaron cambios en la distribución vesicular en sinaptosomas de CB_1 -KO; nuestros resultados *in situ*, sin embargo, han demostrado que en ausencia de CB_1 las TFP contienen un menor número de vesículas por botón en el lóbulo 5 y, además, en ambos lóbulos del KO hay un menor número de vesículas en la zona activa, como ocurre por el efecto que producen los agonistas CB_1 (Franco y cols., 2014).

Cabe pensar que ante la falta de CB_1 , podría haber una actividad sináptica excesiva de las TFP y, por esta razón, la terminal quedaría sin tiempo para la recaptación y recarga de las vesículas de neurotransmisor. Podría ser que a fin de evitar una excitotoxicidad por glutamato y mantener una transmisión sináptica eficiente, cambie la arquitectura presináptica de las TFP. Esta adaptación podría darse junto con otras modificaciones, como la expresión de receptores neuromoduladores.

Los cambios morfológicos atribuidos a la plasticidad sináptica no se limitan al elemento presináptico. En ese sentido, existen diferentes trabajos que indican la existencia de cambios postsinápticos a nivel ultraestructural, como por ejemplo, en el caso de las neuronas piramidales donde la LTP va acompañada de una modificación de la densidad de espinas y arborización dendrítica (Monory y cols., 2015). Estos cambios postsinápticos se han observado también en otras regiones como la corteza prefrontal y amígdala basolateral (Hill y cols., 2011), o en la corteza motora (Ballesteros-Yáñez y cols., 2007). Sin embargo, nuestros resultados indican que las espinas dendríticas de las CP de los animales CB_1 -KO poseen un área similar al animal silvestre, por lo que en nuestro sistema parece que los cambios se restringen al elemento presináptico.

En conjunto, las FP en ausencia del receptor CB_1 sufren modificaciones estructurales que podrían ser la base para que estos animales no presenten una marcada disfuncionalidad. De hecho, el lóbulo 5, que es uno de los lóbulos más vulnerables del cerebelo, sufre las modificaciones más pronunciadas en ausencia del receptor CB_1 . Estas modificaciones ultraestructurales semejan a las derivadas de la activación del receptor CB_1 por agonistas que conlleva una disposición vesicular más segura, disminuyendo por tanto la probabilidad de liberación en respuesta a diferentes niveles de estimulación. Este

mecanismo adaptativo podría ser crucial para paliar los posibles efectos neurotóxicos derivados de la falta de modulación presináptica ejercida por el receptor CB₁.

Este estudio muestra la inmensa capacidad de reinventarse que poseen los sistemas biológicos a fin de lograr sistemas funcionales que comprometan lo menos posible la vida del animal.

7. CONCLUSIONES

1. El receptor CB₁ y los enzimas DAGL- α y MAGL de síntesis y degradación del 2-AG, respectivamente, están presentes en la capa granular externa de la corteza cerebelosa en los días postnatales 0 (P0), P5, P12.
2. Asimismo, las tres proteínas están en los procesos axónicos de las células granulares en diferentes fases de maduración a P0, P5, P12, P21 y en el animal adulto.
3. A nivel subcelular, el receptor CB₁ se localiza uniformemente en la membrana de los procesos axónicos de las células granulares en la capa granular externa a P0, P5 y a P12.
4. Asimismo, CB₁ se sitúa en la membrana de los axones granulares inmaduros durante este periodo postnatal.
5. El pico de expresión de CB₁ en las varicosidades, axones y botones terminales de las fibras paralelas tiene lugar a P12, reduciéndose en edades posteriores.
6. DAGL- α se localiza en la capa granular externa en las inmediaciones de la membrana de los procesos axónicos inmaduros de las células granulares a P0, P5 y a P12, aumentando progresivamente a partir de este momento.
7. En la capa molecular, DAGL- α se localiza cerca de la membrana de los procesos axónicos en formación de las células granulares a P0, P5 y a P12, a partir del cual decae progresivamente para comenzar a expresarse a nivel postsináptico en la base del cuello de las espinas dendríticas de las células de Purkinje.
8. La expresión de MAGL incrementa de P0 a P12 en la proximidad de la membrana y en el citoplasma de los procesos axónicos granulares distribuidos en las capas granular externa y molecular.
9. El pico de expresión de MAGL en las fibras paralelas inmaduras tiene lugar a P12 localizándose en la membrana y el citoplasma de sus botones terminales hasta P21 y alcanzando su disposición citoplasmática definitiva en la edad adulta.
10. La arquitectura subcelular de las terminales sinápticas de las fibras paralelas de los lóbulos 5 y 10 del cerebelo del ratón silvestre para CB₁ (CB₁-WT) muestra diferencias significativas.

11. Las terminales de las fibras paralelas del lóbulo 10 son mayores, hacen menos sinapsis pero más largas y contienen vesículas sinápticas más dispersas que las terminales del lóbulo 5.
12. Las diferencias del ratón CB_1 -KO respecto a CB_1 -WT son más pronunciadas en el lóbulo 5. Las zonas activas de CB_1 -KO contienen una menor densidad de vesículas en ambos lóbulos, pero su dispersión difiere sobre todo en el lóbulo 10.
13. Las terminales paralelas en el lóbulo 5 del ratón CB_1 -KO, hacen sinapsis más largas y menos numerosas, a la vez que contienen un menor número total y más baja densidad de vesículas que en CB_1 -WT.
14. Las terminales en el lóbulo 10 de CB_1 -KO son mayores que las del CB_1 -WT.
15. El efecto de la ausencia del receptor CB_1 sobre la ultraestructura sináptica se restringe al elemento presináptico, ya que el área de las espinas dendríticas de las células de Purkinje permanece sin cambios en todos los casos.

8. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2005) The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *The FASEB journal*, 19(12):1704-6.
- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006) The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci*, 26(5):1551-61.
- Aguado T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G, Lutz B, Guzmán M, Galve-Roperh I (2007) The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J Biol Chem*, 282(33):23892-8.
- Aiba A, Kano M, Chen C, Stanton ME, Fox GD, Herrup K, Zwingman TA, Tonegawa S (1994) Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell*, 79(2):377-88.
- Airaksinen MS, Eilers J, Garaschuk O, Thoenen H, Konnerth A, Meyer M (1997) Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(4):1488-93.
- Alger BE, Kim J (2011) Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci*, 34(6):304-15.
- Alonso-Espinaco V, Elezgarai I, Díez-García J, Puente N, Knöpfel T, Grandes P (2008) Subcellular localization of the voltage-gated potassium channels Kv3.1b and Kv3.3 in the cerebellar dentate nucleus of glutamic acid decarboxylase 67-green fluorescent protein transgenic mice. *Neuroscience*, 155(4):1059-69.
- Altman J, Bayer SA (1997) Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure, and functions. *Boca Raton: CRC Press*.
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*, 58: 315-48.
- Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell*, 119:257-72.
- Archer FR, Doherty P, Collins D, Bolsover SR (1999) CAMs and FGF cause a local submembrane calcium signal promoting axon outgrowth without a rise in bulk calcium concentration. *Eur J Neurosci*, 11(10):3565-73.
- Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ (2006) Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *Eur J Pharmacol*, 539(3):177-83.
- Arévalo-Martín A, García-Ovejero D, Rubio-Araiz A, Gómez O, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E (2007) Cannabinoids modulate Olig2 and polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the subventricular zone of post-natal rats through cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. *Eur J Neurosci*, 26(6):1548-59.
- Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cecyre B, Chaine N, Cherif H, Tea N, Lutz B, Ptito M, Bouchard JF (2011) Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance. *J Neurosci*, 31(4):1489-99.
- Arimura N, Kaibuchi K (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8(3):194-205.
- Ayakannu T, Taylor AH, Marczylo TH, Willets JM, Konje JC (2013) The endocannabinoid system and sex steroid hormone-dependent cancers. *Int J Endocrinol*, 259676.
- Ballesteros-Yáñez I, Valverde O, Ledent C, Maldonado R, DeFelipe J (2007) Chronic cocaine treatment alters dendritic arborization in the adult motor cortex through a CB1 cannabinoid receptor-dependent mechanism. *Neuroscience*, 146(4):1536-45.
- Baptista CA, Hatten ME, Blazeski R, Mason CA (1994) Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. *Neuron*, 12(2):243-60.
- Barcia C, Sanderson NS, Barrett RJ, Wawrowsky K, Kroeger KM, Puntel M, Liu C, Castro MG, Lowenstein PR (2008) T cells' immunological synapses induce polarization of brain astrocytes in vivo and in vitro: a novel astrocyte response mechanism to cellular injury. *PLoS One*, 3(8): e2977.
- Barnes AP, Solecki D, Polleux F (2008) New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo. *Curr Opin Neurobiol*, 18(1):44-52.
- Basavarajappa BS (2007) Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*, 14(3):237-46.

- Bastian AJ (2006) Learning to predict the future: the cerebellum adapts feedforward movement control. *Curr Opin Neurobiol*, 16(6):645-9.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JDB, Mulvihill E, McIlhinney RJ, Somogyi P (1993) The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron*, 11(4):771-87.
- Begbie J, Doherty P, Graham A (2004) Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo. *J Anat*, 205(3):213-8.
- Bénard M, Lebon A, Komuro H, Vaudry D, Galas L (2015) Ex vivo imaging of postnatal cerebellar granule cell migration using confocal macroscopy. *J Vis Exp*, (99), e52810.
- Bengzon J, Kokaia Z, Ernfors P, Kokaia M, Leanza G, Nilsson OG, Persson H, Lindvall O (1993) Regulation of neurotrophin and trka, trkb and trkc tyrosine kinase receptor messenger RNA expression in kindling. *Neuroscience*, 53(2):433-46.
- Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T (2005) Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52):19115-20.
- Berghuis P, Rajniecek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T (2007) Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science*, 316(5828):1212-6.
- Berrendero F, GarciaGil L, Hernandez ML, Romero J, Cebeira M, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez Ruiz JJ (1998) Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development*, 125(16):3179-88
- Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz JJ (1999) Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse*, 33(3):181-91.
- Bilimoria PM, Bonni A (2008) Cultures of cerebellar granule neurons. *Cold Spring Harbor Protocols*, (12) pdb-prot5107.
- Bilkei-Gorzo A, Racz I, Valverde O, Otto M, Michel K, Sastre M, Zimmer A (2005) Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43):15670-5.
- Biran V, Verney C, Ferriero DM (2012) Perinatal cerebellar injury in human and animal models. *Neurology research international*, 2012:858929.
- Bisogno T (2008) Endogenous cannabinoids: structure and metabolism. *J Neuroendocrinol*, 20(s1):1-9.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*, 163(3):463-8.
- Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V (2005) The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav*, 81(2):224-38.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V (2000) N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J*, 351(3):817-24.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, 14: 1347-56.
- Bodor AL, Katona I, Nyiri G, Mackie K, Ledent C, Hájos N, Freund TF (2005) Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J Neurosci*, 25(29):6845-56.
- BorghesaniPR, Peyrin JM, Klein R, Rubin J, Carter AR, Schwartz PM, Luster A, Gabriel C, Segal, RA (2002) BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development*, 129(6):1435-42.
- Bosman LW, Takechi H, Hartmann J, Eilers J, Konnerth A (2008) Homosynaptic long-term synaptic potentiation of the "winner" climbing fiber synapse in developing Purkinje cells. *J Neurosci*, 28(4):798-807.
- Boyden ES, Katoh A, Raymond JL (2004) Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Annu Rev Neurosci*, 27:581-609.

- Brenowitz SD, Regehr WG (2003) Calcium dependence of retrograde inhibition by endocannabinoids at synapses onto Purkinje cells. *J Neurosci*, 23(15):6373-84.
- Brenowitz SD, Regehr WG (2005) Associative short-term synaptic plasticity mediated by endocannabinoids. *Neuron*, 45(3):419-31.
- Brittis PA, Silver J, Walsh FS, Doherty P (1996) Fibroblast Growth Factor Receptor Function Is Required for the Orderly Projection of Ganglion Cell Axons in the Developing Mammalian Retina. *Mol Cell Neurosci*, 8(2/3):120-8.
- Brown SP, Brenowitz SD, Regehr WG (2003) Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nat Neurosci*, 6(10):1048-57.
- Bruckner JJ, Zhan H, O'Connor-Giles KM (2015) Advances in imaging ultrastructure yield new insights into presynaptic biology. *Front Cell Neurosci*, 9:196.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E (1998) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience*, 82(4):1131-49.
- Cady RJ, Hirst JJ, Durham PL (2010) Dietary grape seed polyphenols repress neuron and glia activation in trigeminal ganglion and trigeminal nucleus caudalis. *Mol Pain*, 6:91.
- Carey MR, Myoga MH, McDaniels KR, Marsicano G, Lutz B, Mackie K, Regehr WG (2011) Presynaptic CB1 receptors regulate synaptic plasticity at cerebellar parallel fiber synapses. *J Neurophysiol*, 105(2):958-63.
- Celio MR, Baier W, Schäfer L, Gregersen HJ, de Viragh PA, Norman AW (1990) Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein Calbindin D-28k. *Cell Calcium*. 11(9):599-602.
- Chadborn N, Eickholt B, Doherty P, Bolsover S (2002) Direct measurement of local raised subplasmalemmal calcium concentrations in growth cones advancing on an N-cadherin substrate. *Eur J Neurosci*, 15(12):1891-8.
- Chanda PK, Gao Y, Mark L, Btsh J, Strassle BW, Lu P, Piesla MJ, Zhang MY, Bingham B, Uveges A, Kowal D, Garbe D, Kouranova EV, Ring RH, Bates B, Pangalos MN, Kennedy JD, Whiteside GT, Samad TA (2010) Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. *Mol Pharmacol*, 78(6):996-1003.
- Chedotal A, Sotelo C (1992) Early Development of Olivocerebellar Projections in the Fetal Rat Using CGRP Immunocytochemistry. *Eur J Neurosci*, 4(11):1159-79.
- Chen C, Kano M, Abeliovich A, Chen L, Bao S, Kim JJ, Hashimoto K, Thompson RF, Tonegawa S (1995) Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC gamma mutant mice. *Cell*, 83(7):1233-42.
- Chen L, Bao S, Lockard JM, Kim JK, Thompson RF (1996) Impaired classical eyeblink conditioning in cerebellar-lesioned and Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *J Neurosci*, 16(8):2829-38.
- Chen L, Bao S, Thompson RF (1999) Bilateral lesions of the interpositus nucleus completely prevent eyeblink conditioning in Purkinje cell-degeneration mutant mice. *Behav Neurosci*, 113(1):204-10.
- Chevalyere V, Castillo PE (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron*, 38(3):461-72.
- Chevalyere V, Takahashi KA, Castillo PE (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 29:37-76.
- Clark BR, LaReginaM, Tolbert DL (2000) X-linked transmission of the shaker mutation in rats with hereditary Purkinje cell degeneration and ataxia. *Brain research*, 858(2), 264-73.
- Coemans M, Weber JT, De Zeeuw CI, Hansel C (2004) Bidirectional parallel fiber plasticity in the cerebellum under climbing fiber control. *Neuron*, 44(4):691-700.
- Corrales JD, Blaess S, Mahoney EM, Joyner AL (2006) The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development*, 133(9):1811-21.
- Correa F, Mestre L, Molina-Holgado E, Arévalo-Martín A, Docagne F, Romero E, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2005) The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini Rev Med Chem*, 5(7): 671-5.
- Cota D, Woods S (2005) The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 12(5): 338-51.

- Coutts AA, Anavi-Goffer S, Ross RA, MacEwan DJ, Mackie K, Pertwee RG, Irving AJ (2001) Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 21(7):2425-33.
- Cutando L, Busquets-García A, Puighermanal E, Gomis-González M, Delgado-García JM, Gruart A, Maldonado R, Ozaita A (2013) Microglial activation underlies cerebellar deficits produced by repeated cannabis exposure. *J Clin Invest*, 123(7):2816-31.
- de la Torre-Ubieta L, Bonni A (2011) Transcriptional regulation of neuronal polarity and morphogenesis in the mammalian brain. *Neuron*, 72(1):22-40.
- de Oliveira Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedroso MF, Da Costa JC, Quilfeldt JA (2006) AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res*, 1075(1):60-7.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol*, 141(5):765-74.
- de Salas-Quiroga A, Díaz-Alonso J, García-Rincón D, Remmers F, Vega D, Gómez-Cañas M, Lutz B, Guzmán M, Galve-Roperh I (2015) Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(44):13693-8.
- Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci*, 78(6):549-63.
- Denker A, Rizzoli SO (2010) Synaptic vesicle pools: an update. *Front Synaptic Neurosci*, 2:135.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090):1946-49.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*, 21:521-28.
- Díaz-Alonso J, Guzmán M, Galve-Roperh I (2012) Endocannabinoids via CB1 receptors act as neurogenic niche cues during cortical development. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 367(1607):3229-41.
- Díaz-Laviada I (2009) Sistema cannabinoide endógeno: aspectos bioquímicos e implicación fisiológica. En: Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoide. Coordinadores: Ramos JA, Fernández J, Guzmán M. *Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoide*, 9-27.
- Dijkhuizen PA, Ghosh A (2005b) Regulation of dendritic growth by calcium and neurotrophin signaling. *Prog Brain Res*, 147:17-27.
- Dinh TP, Freund TF, Piomelli D (2002) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids*, 121(1-2):149-58.
- Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D (2004) RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol*, 66(5):1260-4.
- Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS (1991c) Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels. *Cell*, 67:21-33.
- Doherty P, Williams E, Walsh FS (1995) A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron*, 14:57-66.
- Doherty P, Williams G, Williams EJ (2000) CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol Cell Neurosci*, 16(4):283-95.
- Edwards DA, Kim J, Alger BE (2006) Multiple mechanisms of endocannabinoid response initiation in hippocampus. *J Neurophysiol*, 95(1):67-75.
- Elezgarai I, Díez J, Puente N, Azkue JJ, Benítez R, Bilbao A, Knöpfel T, Doñate-Oliver F, Grandes P (2003) Subcellular localization of the voltage-dependent potassium channel Kv3.1b in postnatal and adult rat medial nucleus of the trapezoid body. *Neuroscience*, 118(4):889-98.
- Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR (2000) Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci*, 15(6):510-21.
- Fernández-Ruiz J, Berrendero F, Hernández ML, Ramos JA (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci*, 23(1):14-20.
- Fishell G, Hanashima C (2008) Pyramidal neurons grow up and change their mind. *Neuron*, 57(3):333-8.

- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, 83(3):1017-66.
- Fride E (2005) Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disor*, 4(6):633-42.
- Fride E, Gobshtis N, Dahan H, Weller A, Giuffrida A, Ben-Shabat S (2009) The endocannabinoid system during development: emphasis on perinatal events and delayed effects. *Vitam Horm*, 81:139-58.
- Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Taketo M, Watanabe M, Manabe M, Kano M (2004) Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signaling. *Eur. J. Neurosci*, 19(10):2682-92.
- Furuya S, Tabata T, Mitoma J, Yamada K, Yamasaki M, Makino A, Yamamoto T, Watanabe M, Kano M, Hirabayashi Y (2000) L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21):11528-33.
- Gaffuri AL, Ladarre D, Lenkei Z (2012) Type-1 cannabinoid receptor signaling in neuronal development. *Pharmacology*, 90(1-2):19-39.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carriere D, Carayon S, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232:54-61.
- Galve-roperh I, Aguado T, Rueda D, Velasco G, Guzmán M (2006) Endocannabinoids: A New Family of Lipid Mediators Involved in the Regulation of Neural Cell Development. *Current pharmaceutical design*, 12(18): 2319-25.
- Galve-Roperh I, Palazuelos J, Aguado T, Guzmán M (2009) The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 259(7):371-82.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active component of hashish. *Journal of the American chemical society*, 86(8):1646-7.
- García-Morales V, Montero F, Moreno-López B (2015) Cannabinoid agonists rearrange synaptic vesicles at excitatory synapses and depress motoneuron activity in vivo. *Neuropharmacology*, 92:69-79.
- Goda Y, Davis GW (2003) Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron*, 40(2):243-64.
- Gosselin RD, Meylan P, Decosterd I (2013) Extracellular microvesicles from astrocytes contain functional glutamate transporters: regulation by protein kinase C and cell activation. *Front Cell Neurosci*, 7:251.
- Guindon J, De Lean A, Beaulieu P (2006) Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain*, 121(1-2):85-93.
- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*, 20(2):441-58.
- Gutiérrez-Rodríguez A, Puente N, Elezgarai I, Ruehle S, Lutz B, Reguero L, Gerrikagoitia I, Marsicano G, Grandes P (2016) Anatomical characterization of the cannabinoid CB1 receptor in cell type-specific mutant mouse rescue models. *J Comp Neurol*, doi: 10.1002/cne.24066.
- Hájos N, Katona I, Naiem SS, Mackie K, Ledent C, Mody I, Freund TF (2000) Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*, 12(9):3239-49.
- Hájos N, Ledent C, Freund TF (2001) Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience*, 106(1):1-4.
- Hansel C, de Jeu M, Belmeguenai A, Houtman SH, Buitendijk GH, Andreev D, De Zeeuw CI, Elgersma Y (2006) alphaCaMKII Is essential for cerebellar LTD and motor learning. *Neuron*, 51(6):835-43.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Frider E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(7):3662-65.
- Harkany T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K (2007) The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci*, 28(2):83-92.
- Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J (2008a) Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2 Suppl 1): S84-90.

- Harkany T, Mackie K, Doherty P (2008b) Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Curr Opin Neurobiol*, 18(3):338-45.
- Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Kano M (2007) Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci*, 27(5):1211-9.
- Hebert-Chatelain E, Reguero L, Puente N, Lutz B, Chaouloff F, Rossignol R, Piazza PV, Benard G, Grandes P, Marsicano G (2014a) Studying mitochondrial CB1 receptors: Yes we can. *Mol Metab*, 3(4):339.
- Hebert-Chatelain E, Reguero L, Puente N, Lutz B, Chaouloff F, Rossignol R, Piazza PV, Benard G, Grandes P, Marsicano G (2014b) Cannabinoid control of brain bioenergetics: Exploring the subcellular localization of the CB1 receptor. *Mol Metab*, 3(4):495-504.
- Hebert-Chatelain E, Reguero L, Puente N, Lutz B, Chaouloff F, Rossignol R, Piazza PV, Benard G, Grandes P, Marsicano G (2014) Cannabinoid control of brain bioenergetics: Exploring the subcellular localization of the CB1 receptor. *Mol Metab*, 3(4):495-504.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:1932-36.
- Hill NL, Kolanowski AM, Gill DJ (2011) Plasticity in Early Alzheimer's Disease: An Opportunity for Intervention. *Top Geriatr Rehabil*, 27(4):257-67.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54:161-202.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:8400-05.
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF (2003) Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci*, 26:509-63.
- Ibáñez CF, Ernfors P (2007) Hierarchical control of sensory neuron development by neurotrophic factors. *Neuron*, 54(5):673-5.
- Ichise T, Kano M, Hashimoto K, Yanagihara D, Nakao K, Shigemoto R, Katsuki M, Aiba A (2000) mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science*, 288(5472):1832-5.
- Idris AI, van't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, Ralston SH (2005) Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med*, 11(7):774-9.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunus G (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol*, 118:2023-28.
- Ito M (2000) Mechanisms of motor learning in the cerebellum. *Brain Res*, 886(1-2):237-45.
- Ito M (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev*, 81(3):1143-95.
- Ito M (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci*, 9(4):304-13.
- Ito M, Kano M (1982) Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex. *Neurosci Lett*, 33(3):253-8.
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X (2005) Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest*, 115(11):3104-16.
- Jiang X, Litkowski PE, Taylor AA, Lin Y, Snider BJ, Moulder KL (2010) A role for the ubiquitin-proteasome system in activity-dependent presynaptic silencing. *J Neurosci*, 30(5):1798-809.
- Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA (2004) Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*, 66(2):204-8.

- Jin XH, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2007) Discovery and characterization of a Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *J Biol Chem*, 282(6):3614-23.
- Juan-Picó P, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ, Javier Díaz-Molina F, Ripoll C, Rodríguez de Fonseca F, Nadal A (2006) Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*, 39:155-62.
- Kano M (2013) Synapse elimination and functional neural circuit formation in the cerebellum. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi = Japanese journal of psychopharmacology*, 33(3):137-40.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, 89(1):309-80.
- Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF (2001) Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci*, 21(23):9506-18.
- Katona I, Sperlách B, Sik A, Káfalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 19(11):4544-58.
- Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 26(21):5628-37.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, 274(5290):1133-8.
- Kavalali ET, Klingauf J, Tsien RW (1999) Activity-dependent regulation of synaptic clustering in a hippocampal culture system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22):12893-900.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci*, 26(11):2991-3001.
- Keimpema E, Alpár A, Howell F, Malenczyk K, Hobbs C, Hurd YL, Watanabe M, Sakimura K, Kano M, Doherty P, Harkany T (2013b) Diacylglycerol lipase α manipulation reveals developmental roles for intercellular endocannabinoid signaling. *Sci Rep*, 3:2093.
- Keimpema E, Barabas K, Morozov YM, Tortoriello G, Torii M, Cameron G, Yanagawa Y, Watanabe M, Mackie K, Harkany T (2010) Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding. *J Neurosci*, 30(42):13992-4007.
- Keimpema E, Mackie K, Harkany T (2011) Molecular model of cannabis sensitivity in developing neuronal circuits. *Trends Pharmacol Sci*, 32(9):551-61.
- Keimpema E, Tortoriello G, Alpár A, Capsoni S, Arisi I, Calvigioni D, Hu SS, Cattaneo A, Doherty P, Mackie K, Harkany T (2013a) Nerve growth factor scales endocannabinoid signaling by regulating monoacylglycerol lipase turnover in developing cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(5):1935-40.
- Kim D, Thayer SA (2001) Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 21(10):RC146-RC146.
- Kim J, Alger BE (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci*, 7(7):697-8.
- Kishimoto Y, Fujimichi R, Araishi K, Kawahara S, Kano M, Aiba A, Kirino Y (2002) mGluR1 in cerebellar Purkinje cells is required for normal association of temporally contiguous stimuli in classical conditioning. *Eur J Neurosci*, 16(12):2416-24.
- Kishimoto Y, Hirono M, Sugiyama T, Kawahara S, Nakao K, Kishio M, Katsuki M, Yoshioka T, Kirino Y (2001a) Impaired delay but normal trace eyeblink conditioning in PLCbeta4 mutant mice. *Neuroreport*, 12(13):2919-22.
- Kishimoto Y, Kano M (2006) Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. *J Neurosci*, 26(34):8829-37.
- Kishimoto Y, Kawahara S, Fujimichi R, Mori H, Mishina M, Kirino Y (2001c) Impairment of eyeblink conditioning in GluRdelta2-mutant mice depends on the temporal overlap between conditioned and unconditioned stimuli. *Eur J Neurosci*, 14(9):1515-21.
- Kishimoto Y, Nakazawa K, Tonegawa S, Kirino Y, Kano M (2006) Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for adaptive timing of trace eyeblink conditioned response. *J Neurosci*, 26(5):1562-70.

- Kishimoto Y, Suzuki M, Kawahara S, Kirino Y (2001b) Age-dependent impairment of delay and trace eyeblink conditioning in mice. *Neuroreport*, 12(15):3349-52.
- Klein R, Martin-Zanca D, Barbacid M, Parada LF (1990) Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development*, 109(4):845-50.
- Klein TW, Friedman H, Specter S (1998) Marijuana, immunity and infection. *J Neuroimmunol*, 83(1-2):102-15.
- Köfalvi A, Rodrigues RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA, Sperlách B (2005) Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci*, 25(11):2874-84.
- Komuro H, Rakic P (1992) Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science*, 257(5071):806-9.
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260(5104):95-7.
- Komuro H, Rakic P (1998a) Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci*, 18(4):1478-90.
- Komuro H, Rakic P (1998b) Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *J Neurobiol*, 37(1):110-30.
- Komuro H, Yacubova E, Yacubova E, Rakic P (2001) Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci*, 21(2):527-40.
- Komuro Y, Galas L, Lebon A, Raoult E, Fahrion JK, Tilot A, Kumada T, Ohno N, Vaudry D, Komuro H (2015) The role of calcium and cyclic nucleotide signaling in cerebellar granule cell migration under normal and pathological conditions. *Dev neurobiol*, 75(4):369-87.
- Krakauer JW, Shadmehr R (2006) Consolidation of motor memory. *Trends Neurosci*, 29(1):58-64.
- Kreitzer AC, Regehr WG (2001a) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, 29(3):717-27.
- Kreitzer AC, Regehr WG (2001b) Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci*, 21(20):RC174.
- Kretsinger RH (1981) Mechanisms of selective signaling by calcium. *Neurosciences Research Program Bulletin*, 19(3):213-328.
- Labar G, Wouters J, Lambert DM (2010) A review on the monoacylglycerol lipase: at the interface between fat and endocannabinoid signalling. *Curr Med Chem*, 17(24):2588-607.
- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ (2007) Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One*, 2(8):e709.
- Lamballe F, Smeyne RJ, Barbacid M (1994) Developmental expression of *trkC*, the neurotrophin-3 receptor, in the mammalian nervous system. *The Journal of neuroscience*, 14(1):14-28.
- Lau PM, Zucker RS, Bentley D (1999) Induction of filopodia by direct local elevation of intracellular calcium ion concentration. *J Cell Biol*, 145(6):1265-75.
- Leterrier C, Lainé J, Darmon M, Boudin H, Rossier J, Lenkei Z (2006) Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J Neurosci*, 26(12):3141-53.
- Levi G, Patrizio M, Gallo V (1991) Release of endogenous and newly synthesized glutamate and of other amino acids induced by non-N-methyl-D-aspartate receptor activation in cerebellar granule cell cultures. *J Neurochem*, 56(1):199-206.
- Lev-Ram V, Wong ST, Storm DR, Tsien RY (2002) A new form of cerebellar long-term potentiation is postsynaptic and depends on nitric oxide but not cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(12):8389-93.
- Lichtman JW, Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron*, 25:269-78.
- Linden DJ, Connor JA (1991) Participation of postsynaptic PKC in cerebellar long-term depression in culture. *Science*, 254(5038):1656-9.
- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmér E, Kokaia M (1994) Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci*, 17(11):490-6.
- Llano I, Marty A, Armstrong CM, Konnerth A (1991) Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J Physiol*, 434(1):183-213.
- Lom B, Höpker V, McFarlane S, Bixby JL, Holt CE (1998) Fibroblast growth factor receptor signaling in *Xenopus* retinal axon extension. *J Neurobiol*, 37(4):633-41.

- López-Bendito G, Shigemoto R, Luján R, Juiz JM (2001) Developmental changes in the localisation of the mGluR1alpha subtype of metabotropic glutamate receptors in Purkinje cells. *Neuroscience*, 105(2):413-29.
- Lujan R, Albasanz JL, Shigemoto R, Juiz JM (2005) Preferential localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel subunit HCN1 in basket cell terminals of the rat cerebellum. *Eur J Neurosci*, 21:2073–82.
- Luján R, Roberts JDB, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P (1997) Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 α , mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *Journal of chemical neuroanatomy*, 13(4), 219-41.
- Maccarrone M, Guzmán M, Mackie, K., Doherty, P, Harkany T (2014) Programming of neural cells by (endo) cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(12):786-801.
- Maejima T, Ohno-Shosaku T, Kano M (2001b) Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neurosci Res*, 40(3):205-10.
- Maejima T, Oka S, Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Aiba A, Wu D, Waku K, Sugiura T, Kano M (2005) Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca²⁺-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C β 4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci*, 25(29):6826-35.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 48(3):655-68.
- Maison P, Walker DJ, Walsh FS, Williams G, Doherty P (2009) BDNF regulates neuronal sensitivity to endocannabinoids. *Neurosci Lett*, 467(2):90-4.
- Marín O, Plump AS, Flames N, Sánchez-Camacho C, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2003) Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development*, 130(9):1889-901.
- Markus A, Zhong J, Snider WD (2002a) Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron*, 35(1):65-76.
- Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C (2002) Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *Journal of neurochemistry*, 80(3):448-56.
- Mateos JM, Elezgarai I, Benítez R, Osorio A, Bilbao A, Azkue JJ, Kuhn R, Knöpfel T, Grandes P (1999) Clustering of the group III metabotropic glutamate receptor 4a at parallel fiber synaptic terminals in the rat cerebellar molecular layer. *Neurosci Res*, 35(1):71-4.
- Matias I, Bisogno T, Di Marzo V (2006) Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obesity*, 30:S7-S12.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346:561-4.
- McAllister AK (2002) Neurotrophins and cortical development. *Results Probl Cell Differ*, 39:89-112.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50(1):83-90.
- Mechoulam R, Parker LA (2013) The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol*, 64:21-47.
- Melis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, Lutz B, Marsicano G, Di Marzo V, Gessa GL, Pistis M (2004) Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci*, 24(47):10707-15.
- Miale IL, Sidman RL (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol*, 277-96.
- Mikics E, Dombi T, Barsvári B, Varga B, Ledent C, Freund TF, Haller J (2006) The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. *Behav Pharmacol*, 17(3):223-30.
- Minichiello L, Klein R (1996) TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons. *Genes Dev*, 10(22):2849-58.

- Miura E, Fukaya M, Sato T, Sugihara K, Asano M, Yoshioka K, Watanabe M (2006) Expression and distribution of JNK/SAPK-associated scaffold protein JSAP1 in developing and adult mouse brain. *J Neurochem*, 97(5):1431-46.
- Miyata M, Kim HT, Hashimoto K, Lee TK, Cho SY, Jiang H, Wu Y, Jun K, Wu D, Kano M, Shin HS (2001) Deficient long-term synaptic depression in the rostral cerebellum correlated with impaired motor learning in phospholipase C beta4 mutant mice. *Eur J Neurosci*, 13(10):1945-54.
- Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, Watanabe M (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci*, 17(12):2563-72.
- Monory K, Polack M, Remus A, Lutz B, Korte M (2015) Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. *J Neurosci*, 35(9):3842-50.
- Moreno-López B, Sunico CR, González-Forero D (2011) NO orchestrates the loss of synaptic boutons from adult "sick" motoneurons: modeling a molecular mechanism. *Mol Neurobiol*, 43(1):41-66.
- Moulder KL, Meeks JP, Shute AA, Hamilton CK, de Erausquin G, Mennerick S (2004) Plastic elimination of functional glutamate release sites by depolarization. *Neuron*, 42(3):423-35.
- Muccioli GG, Xu C, Odah E, Cudaback E, Cisneros JA, Lambert DM, Lopez Rodriguez ML, Bajjalieh S, Stella N (2007) Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J Neurosci*, 27(11):2883-9.
- Mugnaini E, Forstron PF (1967) Ultrastructural studies on the cerebellar histogenesis. I. Differentiation of granule cells and development of glomeruli in the chick embryo. *Zellforsch Mikrosk Anat*, 77(1):115-43.
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabás K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzmán M, Lu HC, Galve-Roperh I, Harkany T (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(25):8760-5.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365:61-5.
- Nogueron MI, Porgilsson B, Schneider WE, Stucky CL, Hillard CJ (2001) Cannabinoid receptor agonists inhibit depolarization-induced calcium influx in cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 79(2):371-81.
- O'Donoghue DL, Martin GF, King JS (1987) The timing of granule cell differentiation and mossy fiber morphogenesis in the opossum. *Anat Embryol (Berl)*, 175(3):341-54.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*, 279(7):5298-305.
- Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N (2007) Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers*, 4(8):1842-57.
- Ono K, Shokunbi T, Nagata I, Tokunaga A, Yasui Y, Nakatsuji N (1997) Filopodia and growth cones in the vertically migrating granule cells of the postnatal mouse cerebellum. *Exp Brain Res*, 117(1):17-29.
- Orvis GD, Hartzell AL, Smith JB, Barraza LH, Wilson SL, Szulc KU, Turnbull DH, Joyner AL (2012) The engrailed homeobox genes are required in multiple cell lineages to coordinate sequential formation of fissures and growth of the cerebellum. *Developmental biology*, 367(1):25-39.
- Oudin MJ, Hobbs C, Doherty P (2011) DAGL-dependent endocannabinoid signalling: roles in axonal pathfinding, synaptic plasticity and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 34(10):1634-46.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*, 27(1):73-100.
- Pan B, Wang W, Long JZ, Sun D, Hillard CJ, Cravatt BF, Liu QS (2009) Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl)piperidine-1-carboxylate(JZL184) Enhances retrograde endocannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 331(2):591-7.
- Patel S, Hillard CJ (2001) Cannabinoid CB(1) receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(2):629-37
- Pertwee, RG (2015). Endocannabinoids and their pharmacological actions. *Handb Exp Pharmacol*, 231:1-37.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(3):1020-4.

- Puente N, Elezgarai I, Lafourcade M, Reguero L, Marsicano G, Georges F, Manzoni OJ, Grandes P (2010a) Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PLoS One*, 5(1):e8869.
- Puente N, Mendizabal-Zubiaga J, Elezgarai I, Reguero L, Buceta I, Grandes P (2010b) Precise localization of the voltage-gated potassium channel subunits Kv3.1b and Kv3.3 revealed in the molecular layer of the rat cerebellar cortex by a pre-embedding immunogold method. *Histochem Cell Biol*, 134(4):403-9.
- Purves D, Lichtman JW (1980) Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science*, 210:153-57.
- Qiu DL, Knöpfel T (2007) An NMDA receptor/nitric oxide cascade in presynaptic parallel fiber-Purkinje neuron long-term potentiation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(13):3408-15.
- Qiu DL, Knöpfel T (2009) Presynaptically expressed long-term depression at cerebellar parallel fiber synapses. *Pflugers Arch*, 457(4):865-75.
- Quesada A, Genis-Galvez JM (1983) Early development of the granule cell in the cerebellum of the chick embryo. *J Morphol*, 178(3):323-34.
- Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol*, 141(3):283-312.
- Rakic P (1981) Neuronal-glia interaction during brain development. *Trends in Neurosciences*, 4:184-187.
- Rakic P (1985a) DNA synthesis and cell division in the adult primate brain. *Ann N Y Acad Sci*, 457:193-211.
- Rakic P (1985b) Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 227(4690):1054-6.
- Rakic P, Sidman RL (1973) Weaver mutant mouse cerebellum: defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(1):240-4.
- Ramírez-Franco J, Bartolomé-Martín D, Alonso B, Torres M, Sánchez-Prieto J (2014) Cannabinoid type 1 receptors transiently silence glutamatergic nerve terminals of cultured cerebellar granule cells. *PLoS One*, 9(2):e88594.
- Ramón y Cajal, S (1911) *Histology of the nervous system*, Vol II.
- Rashid NA, Cambrey-Deakin MA (1992) N-methyl-D-aspartate effects on the growth, morphology and cytoskeleton of individual neurons in vitro. *Dev Brain Res*, 67(2):301-8.
- Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV (2013) New roles for the cerebellum in health and disease. *Front Syst Neurosci*, 7:83.
- Reguero L, Puente N, Elezgarai I, Mendizabal-Zubiaga J, Canduela MJ, Buceta I, Ramos A, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Marsicano G, Grandes P (2011) GABAergic and cortical and subcortical glutamatergic axon terminals contain CB1 cannabinoid receptors in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *PLoS One*, 6(10):e26167.
- Reguero L, Puente N, Elezgarai I, Ramos-Uriarte A, Gerrickagoitia I, Bueno-López JL, Doñate F, Grandes P (2014) Subcellular localization of NAPE-PLD and DAGL- α in the ventromedial nucleus of the hypothalamus by a preembedding immunogold method. *Histochem Cell Biol*, 141(5):543-50.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, 6(1):57-69.
- Roloff AM, Anderson GR, Martemyanov KA, Thayer SA (2010) Homer 1a gates the induction mechanism for endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *J Neurosci*, 30(8):3072-81.
- Romero J, Garcia-Palomero E, Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernandez ML, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ (1997) Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. *Synapse*, 26(3):317-23.
- Rosenmund C, Stevens CF (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, 16(6):1197-207.
- Rosina A, Morara S, Provini L (1999) GAT-1 developmental expression in the rat cerebellar cortex: basket and pinceau formation. *Neuroreport*, 10(7):1613-8.
- Rossi DJ, Slater NT (1993) The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology*, 32(11):1239-48.
- Rueda D, Navarro B, Martínez-Serrano A, Guzman M, Galve-Roperh I (2002) The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J Biol Chem*, 277(48):46645-50.

- Saario SM, Laitinen JT (2007) Monoglyceride lipase as an enzyme hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biodivers*, 4(8):1903-13.
- Saario SM, Savinainen JR, Laitinen JT, Jarvinen T, Niemi R (2004) Monoglyceride lipase-like enzymatic activity is responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes. *Biochem Pharmacol*, 67(7):1381-87.
- Sacchetti B, Scelfo B, Strata P (2009) Cerebellum and emotional behavior. *Neuroscience*, 162(3):756-62
- Safo PK, Regehr WG (2005) Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron*, 48(4):647-59.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski EN (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylyl cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol*, 142(2): 278-87.
- Schmahmann JD (2004) Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 16(3):367-78.
- Schneggenburger R, Sakaba T, Neher E (2002) Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci*, 25(4):206-12.
- Schwenk F, Baron U, Rajewsky K (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic acids research*, 23(24):5080.
- Segal RA, Pomeroy SL, Stiles CD (1995) Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT3 receptors in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci*, 15(7):4970-81.
- Shibuki K, Gomi H, Chen L, Bao S, Kim JJ, Wakatsuki H, Fujisaki T, Fujimoto K, Katoh A, Ikeda T, Chen C, Thompson RF, Itohara S (1996) Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron*, 16(3):587-99.
- Sideris A, Bekker T, Chan WS, Montoya-Gacharna JV, Blanck TJ, Recio-Pinto E (2012) A Role for the Cannabinoid 1 Receptor in Neuronal Differentiation of Adult Spinal Cord Progenitors in vitro is Revealed through Pharmacological Inhibition and Genetic Deletion. *Front Neurosci*, 6:4.
- Sidman RL, Rakic P (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Research*, 62(1):1-35.
- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A (1996) The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9):3984-9.
- Skaper SD, Facci L, Giusti P (2013) Glia and mast cells as targets for palmitoylethanolamide, an anti-inflammatory and neuroprotective lipid mediator. *Mol Neurobiol*, 48(2):340-52.
- Soler-Llavina GJ, Sabatini BL (2006) Synapse-specific plasticity and compartmentalized signaling in cerebellar stellate cells. *Nat Neurosci*, 9(6):798-806.
- Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D (2008) The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol*, 154(2):369-83.
- Soltys J, Yushak M, Mao-Draayer Y (2010) Regulation of neural progenitor cell fate by anandamide. *Biochem Biophys Res Commun*, 400(1):21-6.
- Sotelo C (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol*, 72(5):295-339.
- Sotelo C (2008) Development of "Pinceaux" formations and dendritic translocation of climbing fibers during the acquisition of the balance between glutamatergic and gamma-aminobutyric acidergic inputs in developing Purkinje cells. *J Comp Neurol*, 506(2):240-62.
- Straiker A, Hu SS, Long JZ, Arnold A, Wager-Miller J, Cravatt BF, Mackie K (2009) Monoacylglycerol lipase limits the duration of endocannabinoid-mediated depolarization-induced suppression of excitation in autaptic hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*, 76(6):1220-7.
- Strata P, Scelfo B, Sacchetti B (2011) Involvement of cerebellum in emotional behavior. *Physiol Res*, 60 Suppl 1:S39-48.
- Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt BF, de Fonseca FR (2008) Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol*, 509(4):400-21.

- Suárez J, Rivera P, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2010) Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. *Brain Res*, 1349:162-73.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*, 45(5):405-46.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215(1):89-97.
- Swinny JD, van der Want JJ, Gramsbergen A (2005) Cerebellar development and plasticity: perspectives for motor coordination strategies, for motor skills, and for therapy. *Neural Plast*, 12(2-3):153-60; discussion 263-72.
- Szabo B, Urbanski MJ, Bisogno T, Di Marzo V, Mendiguren A, Baer WU, Freiman I (2006) Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol*, 577(1):263-80.
- Takayama C e Inoue Y (2005) Developmental expression of GABA transporter-1 and -3 during formation of the GABAergic synapses in the mouse cerebellar cortex. *Brain Res*, 158(1-2):41-9.
- Tanimura A, Uchigashima M, Yamazaki M, Uesaka N, Mikuni T, Abe M, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kano M (2012) Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(30):12195-200.
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimoto Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron*, 65(3):320-7.
- Terrazas, R (Cajal) (1897) Notas sobre la neuroglia del cerebelo y el crecimiento de los elementos nerviosos.
- Tessarollo L, Tsoulfas P, Martin-Zanca D, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF (1993) trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development*, 118(2):463-75.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science*, 274(5290):1123-33.
- Thach WT, Goodkin HP, Keating JG (1992) The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annu Rev Neurosci*, 15:403-42.
- Thompson RF, Kim JJ (1996) Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):13438-44.
- Timmann D, Daum I (2007) Cerebellar contributions to cognitive functions: a progress report after two decades of research. *Cerebellum*, 6(3):159-62.
- Timmann D, Drepper J, Frings M, Maschke M, Richter S, Gerwig M, Kolb FP (2010) The human cerebellum contributes to motor, emotional and cognitive associative learning. A review. *Cortex*, 46(7):845-57.
- Tolbert DL, Clark B R (2000) Olivocerebellar projections modify hereditary Purkinje cell degeneration. *Neuroscience*, 101(2):417-33.
- Trazzi S, Steger M, Mitrugno VM, Bartesaghi R, Ciani E (2010) CB1 cannabinoid receptors increase neuronal precursor proliferation through AKT/glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, 285(13):10098-109.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83(2):393-411.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci*, 27(14):3663-76.
- Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M (2011) Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 31(21):7700-14.
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T (1995) Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem*, 270(40):23823-7.

- Urbanski MJ, Kovacs FE, Szabo B (2009) Depolarizing GABAergic synaptic input triggers endocannabinoid-mediated retrograde synaptic signaling. *Synapse*, 63(8):643-52.
- Uzman LL (1960) The histogenesis of the mouse cerebellum as studied by its tritiated thymidine uptake. *J Comp Neurol*, 114:137-59.
- van Beugen BJ, Nagaraja RY, Hansel C (2006) Climbing fiber-evoked endocannabinoid signaling heterosynaptically suppresses presynaptic cerebellar long-term potentiation. *J Neurosci*, 26(32):8289-94.
- van der Stelt M, Di Marzo V (2005b) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*, 7(1-2):37-50.
- Vandevoorde S, Lambert DM (2007) The multiple pathways of endocannabinoid metabolism: a zoom out. *Chem Biodivers*, 4(8):1858-81.
- Viltono L, Patrizi A, Fritschy JM, Sassoè-Pognetto M (2008) Synaptogenesis in the cerebellar cortex: differential regulation of gephyrin and GABA_A receptors at somatic and dendritic synapses of Purkinje cells. *J Comp Neurol*, 508(4):579-91.
- Vitalis T, Lainé J, Simon A, Roland A, Leterrier C, Lenkei Z (2008) The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro. *Eur J Neurosci*, 28(9):1705-18.
- Walker DJ, Suetterlin P, Reisenberg M, Williams G, Doherty P (2010) Down-regulation of diacylglycerol lipase-alpha during neural stem cell differentiation: identification of elements that regulate transcription. *J Neurosci Res*, 88(4):735-45.
- Wang J, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Miyatake A, Ueda N (2006b) Functional analysis of the purified anandamide-generating phospholipase D as a member of the metallo-beta-lactamase family. *J Biol Chem*, 281(18):12325-35.
- Wang X, Dow-Edwards D, Keller E, Hurd YL (2003) Preferential limbic expression of the cannabinoid receptor mRNA in the human fetal brain. *Neuroscience*, 118(3):681-94.
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A (2008) The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci*, 38(1):89-97.
- Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P (1994b) Characterisation of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGF. *Development*, 120:1685-93.
- Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P (1994c) Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron*, 13(3):583-94.
- Williams EJ, Walsh FS, Doherty P (1994a) Tyrosine kinase inhibitors can differentially inhibit integrin-dependent and CAM-stimulated neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 124(6):1029-37.
- Williams EJ, Walsh FS, Doherty P (2003) The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol*, 160(4):481-6.
- Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410(6828):588-92.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296(5568):678-82.
- Wu CS, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O'Leary D, Monory K, Lutz B, Mackie K, Lu HC (2010) Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci*, 32(5):693-706.
- y Cajal SR (1995) Histology of the nervous system of man and vertebrates (Vol. 1). *Oxford University Press, USA*.
- Yan XX, Ribak CE (1998) Developmental expression of gamma-aminobutyric acid transporters (GAT-1 and GAT-3) in the rat cerebellum: evidence for a transient presence of GAT-1 in Purkinje cells. *Brain Res*, 111(2):253-69.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M (2006) Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci*, 26(18):4740-51.
- Yoshida T, Hashimoto K, Zimmer A, Maejima T, Araishi K, Kano M (2002) The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, 22(5):1690-7.

- Zheng JQ (2000) Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions. *Nature*, 403(6765):89-93.
- Zhong P, Pan B, Gao XP, Blankman JL, Cravatt BF, Liu QS (2011) Genetic deletion of monoacylglycerol lipase alters endocannabinoid-mediated retrograde synaptic depression in the cerebellum. *J Physiol*, 589(20):4847-55.
- Zhou Y, Oudin MJ, Gajendra S, Sonogo M, Falenta K, Williams G, Lalli G, Doherty P (2015) Regional effects of endocannabinoid, BDNF and FGF receptor signalling on neuroblast motility and guidance along the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci*, 64:32-43.
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10):5780-5.
- Zorina Y, Iyengar R, Bromberg KD (2010) Cannabinoid 1 receptor and interleukin-6 receptor together induce integration of protein kinase and transcription factor signaling to trigger neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 285(2):1358-70.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64:355-405.

