



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**Depresión sináptica de largo plazo mediada por receptores mGluR y NMDA  
en ratones haploinsuficientes de SHANK3**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biol. Gerardo Rodrigo Perera Murcia**

Tutora Principal de Tesis

**Dra. Yazmín Ramiro Cortés**

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Comité Tutor

**Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez**

Facultad de Psicología, UNAM.

Comité Tutor

**Dr. José Humberto Nicolini Sánchez**

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad de México, Marzo de 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



OFICIO CPCB/261/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


**M. EN C. IVONNE RAMÍREZ WENCE**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria del día 14 de enero de 2019, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno, **PERERA MURCIA GERARDO RODRIGO** con número de cuenta **307142326** con la tesis "**Depresión sináptica de largo plazo mediada por receptores mGluR y receptores NMDA en ratones haploinsuficientes de SHANK3**", realizada bajo la dirección de la **DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS**:

Presidente: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE  
Vocal: DRA. MARÍA ELVIRA GALARRAGA PALACIO  
Secretario: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ  
Suplente: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY  
Suplente: DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de marzo de 2019

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## **Agradecimientos**

El desarrollo de esta tesis se realizó gracias al apoyo del Posgrado en ciencias Biológicas de la UNAM. Así mismo al la beca brindada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Este trabajo se realizó en el laboratorio de plasticidad sináptica y estructural a cargo de la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, en el departamento de Neurodesarrollo y Fisiología de la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto Ciencia Básica 254878 y por el programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM-IA201915).

Finalmente agradecemos el apoyo y consejo del comité tutorial conformado por Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez y el Dr. Humberto Nicolini Sánchez.

## **Agradecimientos**

A mis Padres por su apoyo incondicional y paciencia. Siempre me han motivado para seguir y alcanzar mis metas.

A mi mejor amiga y amor Beatriz Gutiérrez. Siempre has estado a mi lado y me has apoyado en las buenas y en las malas.

A la Doctora Yazmín Ramiro por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, enseñarme a nivel teórico y experimental y tenerme paciencia durante este proyecto.

A mi compañeros y amigos del laboratorio Carlos y Emiliano por su constante apoyo y tolerancia.

A Dra. Claudia Rivera Cerecedo y al personal del bioterio IFC UNAM.

Al Laboratorio del Dr. Morán por su constante apoyo.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
1.1 El hipocampo .....	3
1.2 Plasticidad sináptica .....	5
1.3 Receptores glutamatérgicos .....	6
1.3.1 Receptores NMDA .....	7
1.3.2 Receptores AMPA .....	9
1.3.3 Receptores metabotrópicos de glutamato .....	10
1.4 Potenciación sináptica de largo plazo en el hipocampo .....	11
1.5 Depresión sináptica de largo plazo en el hipocampo .....	13
1.5.1 Depresión sináptica de largo plazo mediada por receptores NMDA .....	14
1.5.2 Depresión sináptica mediada por receptores metabotrópicos de glutamato .....	15
1.6 Plasticidad estructural .....	16
1.7 Desórdenes del neurodesarrollo asociados al espectro autista .....	19
1.8 SHANK3 .....	21
<b>2. Planeamiento del problema</b> .....	23
<b>3. Hipótesis</b> .....	23
<b>4. Justificación</b> .....	24
<b>5. Objetivo General</b> .....	24
5.1 Objetivos particulares .....	24
<b>6. Metodología</b> .....	25
6.1 Cultivos organotípicos de rebanadas de hipocampo .....	25
6.2 Clasificación y cuantificación de espinas dendríticas .....	26
6.3 Transfección balística .....	26
6.4 Imágenes de espinas dendríticas con microscopio de excitación de dos fotones .....	27
6.5 Foto-activación de glutamato enjaulado con microscopía de excitación de dos fotones .....	29
6.5.1 Inducción de mGluR-LTD con glutamato enjaulado en una sola espina .....	29

6.5.2	Inducción de NMDA-LTD con glutamato enjaulado en una sola espina .....	30
6.6	Inmunofluorescencias .....	31
6.7	Análisis de volumen en espinas dendríticas .....	31
6.8	Estadística .....	31
<b>7.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>33</b>
7.1	Disminución en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratones SHANK3 ....	33
7.2	Expresión de los receptores mGluRS en neuronas de ratones SHANK3	36
7.3	Expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B de los receptores NMDA en neuronas de ratones SHANK3 .....	38
7.4	Inducción de mGluR-LTD en espinas dendríticas individuales mediante foto-activación de glutamato enjaulado .....	40
7.5	Especificidad del protocolo para mGluR-LTD .....	42
7.6	Inducción de NMDA-LTD en espinas dendríticas individuales mediante foto-activación de glutamato enjaulado .....	43
7.7	Especificidad del protocolo para NMDA-LTD .....	44
7.8	Variabilidad del volumen de las espinas control relativo a la distancia de la espina estimulada .....	45
<b>8.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>50</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusión</b> .....	<b>56</b>
<b>10.</b>	<b>Literatura citada</b> .....	<b>58</b>

## Lista de abreviaturas

AMPA	Receptor ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
AP2	Proteína adaptadora 2
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
CA	Cuerno de Amón
CaMKII	Calciocalmodulina cinasa II
DAG	Diacil glicerol
DHPG	3,5 dihidroxifenilglicina
ERK	Cinasa regulada por señal extracelualr
e-LTP/ LTD	Potenciación/ Depresión de largo plazo temprana
GD	Giro dentado
GTP	Guanocil trifosfato
GRIP	Proteína de interacción a receptores glutamatérgicos
GluN1	Subunidad N1 de receptor NMDA
HCP	Calcio hipocalcaina
iGluRs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IP3	Fosfatidil inositol 1,4,5- trifosfato
LFS	Estimulación de baja frecuencia
L-LTP/LTD	Potenciación/ Depresión de largo plazo tardía
LTD	Depresión de largo plazo
LTP	Potenciación de largo plazo
MAP1B	Proteína de asociación a microtúbulos 1B
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
mGluR-LTD	Depresión de largo plazo dependiente de receptores metabotrópicos de glutamato
MnK1	quinasa de serina/treonina 1 de interacción con MAP cinasa
mTOR	Objetivo de mamífero del complejo de rapamicina
NFS	N-etil-malemidina



NMDA-LTD Depresión de largo plazo dependiente de receptores NMDA

NMDAR Receptor N-metil-D-aspartato

PICK1 Proteína de interacción con cinasa 1

PKC Proteína cinasa c

PLC Fosfolipasa C

PP1 Fosfatasa 1

PP2 Fosfatasa 2B

PP-LFS Estimulación de baja frecuencia en pares de pulsos

PSD-95 Proteína de densidad postsináptica 95

SAPAP1 SAP90/PSD95-proteína de asociación 1

STDP Plasticidad dependiente del tiempo de disparo

SHANK3 Proteína con repeticiones de anquirina y dominio SH3

## Resumen

Se propone que el sustrato fisiológico del aprendizaje y la memoria es la propiedad de las neuronas de modificar su eficacia sináptica en respuesta a la actividad. Esto ocurre en los sitios de comunicación entre las neuronas, las sinapsis. Este fenómeno se denomina “plasticidad sináptica”. Los cambios en la eficacia sináptica pueden ser el resultado de una potenciación o depresión de la transmisión sináptica, los cuales pueden alterar físicamente la conectividad entre las neuronas a través de cambios estructurales en las sinapsis lo que se denomina “plasticidad estructural”, es decir, cambios en el número, tamaño y forma de las espinas dendríticas.

Se sabe que existe una correlación entre diversos trastornos neurológicos y alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas. Evidencias experimentales indican que varios de los genes que están mutados en pacientes diagnosticados con desórdenes del espectro autista, son genes involucrados en la expresión de proteínas de vías de señalización dependientes de la actividad que regulan la estructura y la función sináptica. Por ejemplo, el síndrome Phelan-McDermid, es catalogado como un síndrome del espectro autista en humanos, causado por la delección del gen *Shank3* en un alelo. Esta mutación parece ser responsable de las alteraciones cognitivas, pues está presente en todos los pacientes. SHANK3 es una proteína de anclaje en la densidad postsináptica de neuronas glutamatérgicas, que se une directa e indirectamente a los receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA y mGluR.

Se desconoce cómo la ausencia de esta proteína SHANK3 podría inducir las alteraciones cognitivas detectadas. Una posibilidad es a través de la modificación de la plasticidad sináptica y sus correlatos estructurales. Por lo tanto, en este proyecto nos planteamos la siguiente pregunta, *¿existe en el autismo una desregulación de la depresión sináptica y estructural provocada por la haploinsuficiencia de Shank3?*

Para responder esta pregunta utilizamos cultivos organotípicos de hipocampo de ratones haploinsuficientes SHANK3. Los resultados obtenidos muestran una menor densidad de espinas dendríticas en ratones SHANK3 con respecto a los animales silvestres. Además, la expresión de los receptores mGluR1 y mGluR5 no cambia; sin embargo, los niveles de la subunidad GluN2B del receptor NMDA se encuentran incrementados en ratones SHANK3. Por otro lado, mediante foto-activación de glutamato enjaulado a baja frecuencia indujimos depresión sináptica mediada por NMDA o mGluR en espinas dendríticas individuales, utilizando microscopía de excitación de dos fotones. Bajo estas condiciones, encontramos que la haploinsuficiencia de Shank3 inhibe la depresión sináptica mediada por mGluR, por el contrario, se induce una potenciación, opuesto a lo observado en espinas de ratones silvestres. Por otra parte, la depresión mediada por NMDA parece ser de largo plazo, contrario a lo que ocurre en ratones silvestres. Estos datos demuestran por primera vez que la haploinsuficiencia de Shank3 altera la plasticidad sináptica, sus correlatos estructurales y la expresión de los receptores NMDA.

## Abstract

Changes in synaptic weight are thought to be the physiological basis for learning and memory. These changes can result in either potentiated or depressed synaptic transmission at individual synapses this phenomenon is called synaptic plasticity, and may physically alter neuronal connectivity through structural changes at synapses, this is called structural plasticity, specifically refers to changes in number, size or shape of dendritic spines.

It has been reported a correlation between neurological disorders and morphological alterations of dendritic spines. Reports indicate that autism spectrum disorders (ASD) are associated with mutations in a host of genes that are critical regulators of synaptic structure and function. For instance, the Phelan-McDermid syndrome (PMS) is considered as ASD. This syndrome is caused by loss of one copy of Shank3 gene in the telomeric portion of chromosome 22. This deletion is likely responsible for some of the neurological features of the Phelan-McDermid syndrome. SHANK3 is a scaffold protein of the postsynaptic density of glutamatergic neurons, it interacts indirectly with glutamatergic receptors AMPA, NMDA, and mGluR. It is unknown how the haploinsufficiency of Shank3 can lead to the clinical features of PMS. We hypothesized that misregulation of synaptic plasticity and its structural correlates may lead to cognitive impairments of PMS. Therefore, we want to know whether the haploinsufficiency of Shank3 promotes a dysregulation of synaptic long-term depression and its structural correlates.

In order to address this, we used two-photon imaging and glutamate uncaging in organotypic hippocampal slice cultures, to examine the structural correlates synaptic depression at individual inputs in neurons from SHANK3 mice. Our results show a density reduction of dendritic spines in SHANK3 mice in comparison with wild type mice. We examined the expression of mGlu receptors and NMDA subunits. Regarding to this, we found that the expression of mGluR1 and mGluR5 was not altered. However, the expression of GluN2B subunit of NMDA receptors was increased in SHANK3 mice.

In addition, we performed some experiments to induce the synaptic depression mediated by mGluR or NMDA at single spines by two-photon uncaging glutamate. Here we found that the haploinsufficiency of Shank3 inhibits the long-term depression mediated by mGluR by contrast seems to promote a potentiation. On the other hand, the long-term depression mediated by NMDA was long lasting while in wild type was short term. These data show for the first time that the haploinsufficiency of Shank3 disrupts the synaptic plasticity response, specifically synaptic depression and its structural correlates.

## 1. Introducción

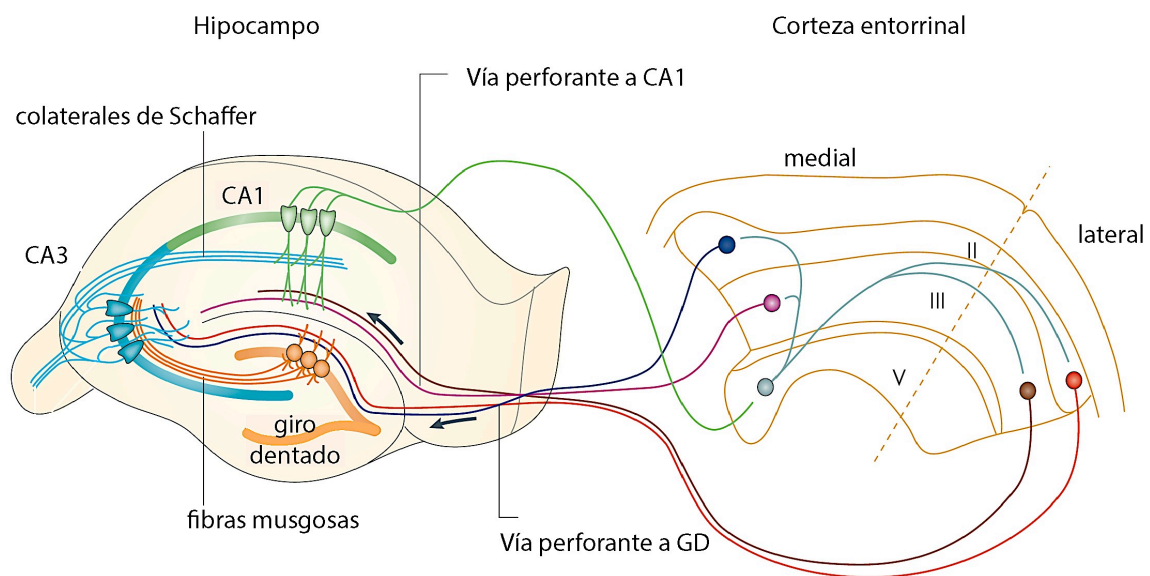
### 1.1. El hipocampo

El hipocampo es una estructura que pertenece al sistema límbico, que involucra el control de emociones, aspectos de memoria y aprendizaje (Cowan et al., 2003, Hammond, 2015). En esta estructura se han descrito las células de lugar y las células de dirección (O'Keefe and Dostrovsky, 1971, O'Keefe, 1976, Moita et al., 2003). Al respecto, se ha demostrado que el hipocampo juega un papel crítico en la formación de memoria como un elemento de almacenamiento de información, que con el tiempo, esta memoria se va almacenando permanentemente en la neocorteza (Nadel and Moscovitch, 1997, Tse et al., 2007, Kitamura et al., 2017).

En roedores, el hipocampo es una estructura rostro-caudal, mientras que en primates está estrictamente localizado en el lóbulo temporal. Está compuesto por dos regiones interconectadas, el Cuerno de Amón (CA) y el Giro Dentado (GD). El cuerno de Amón se divide en tres regiones: CA1, CA2 y CA3. Cabe mencionar que en primates se cuenta con una división extra denominada CA4. Ambas regiones se subdividen en los estratos: *Alveus*, *Oriens*, *Pyramidale radiatum* y *Lacunosum moleculare* (Andersen, 2007, Hammond, 2015).

El hipocampo está compuesto principalmente por células de proyección denominadas neuronas piramidales, las cuales se encuentran ubicadas en la capa piramidal y granular. Estas células utilizan el glutamato como principal neurotransmisor. De manera específica las neuronas piramidales cuentan con su soma alineado al *stratum pyramidale* y cuentan con un árbol dendrítico que se divide en tres secciones, cada uno de estos segmentos proyecta a diferentes estratos, *Stratum oriens* y *Stratum pyramidale* (dendritas basales), *Stratum radiatum* (dendritas apicales) y *Stratum lacunosum moleculare* (dendritas del "tuft"). Estas neuronas piramidales son moduladas por aferencias glutamatérgicas y también por actividad local de interneuronas inhibitorias (Kandel, 2013).

Canónicamente el diagrama de conexiones del hipocampo se representa como circuito trisináptico. La principal aferente proviene de la capa II de la corteza entorrinal, que proyecta a la capa molecular del giro dentado a través de la vía perforante. Los axones (fibras musgosas) del giro dentado proyectan a la región apical de las dendritas piramidales de la región CA3, las cuales proyectan ipsilateralmente, a las neuronas piramidales de la región CA1 a través de las colaterales de Schaffer, y contra lateralmente a CA3 y CA1 a través de las conexiones comisurales. Las dendritas de la región apical distal de CA1 reciben aferentes directas de la capa III de la corteza entorrinal (Fig. 1) (Neves et al., 2008). Gracias a su conectividad y estructura el hipocampo ha sido una de las principales preparaciones para estudiar la plasticidad sináptica.

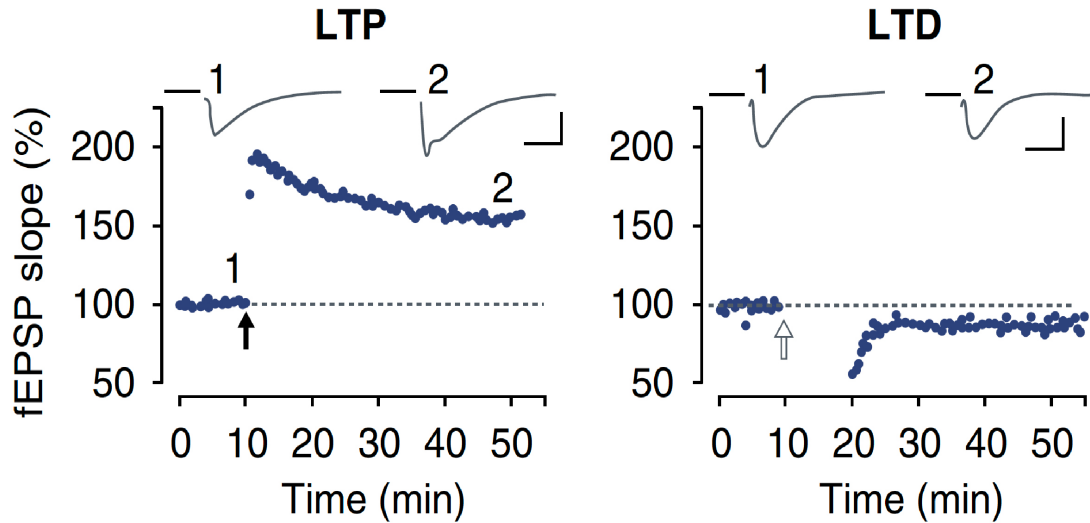


**Figura 1. Diagrama de conectividad del hipocampo.** Presentado como un circuito trisináptico entre la corteza entorrinal, el giro dentado, la región CA3 y CA1. Modificado de Neves, et al., 2008.

## 1.2. Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica se define como la propiedad de las neuronas de incrementar o disminuir su eficacia sináptica en respuesta a la actividad, donde estas alteraciones que duran milisegundos pueden inducir modificaciones que persisten por días, semanas o incluso periodos más largos (Cowan et al., 2003). Se propone que estos cambios son la base fisiológica del aprendizaje y la memoria (Caroni et al., 2012, Mayford et al., 2012), pues los eventos externos son representados en el cerebro como patrones espacio-temporales de actividad neuronal, que modifican la respuesta sináptica (Bliss and Collingridge, 1993), así se propone que el sistema nervioso puede almacenar y procesar información de una manera dependiente de la experiencia (Nabavi et al., 2014). La formación y eliminación de sinapsis está mediada por la plasticidad estructural, es decir, cambios en el número, tamaño y forma de las conexiones sinápticas (Holtmaat and Svoboda, 2009). Así, los circuitos neuronales modifican sus conexiones para incrementar la capacidad de almacenamiento y formar nuevas memorias, además de mantener la homeostasis sináptica, es decir, el balance en la excitabilidad de las neuronas dentro de un circuito (Poirazi and Mel, 2001, Turrigiano, 2012).

Se han descrito dos formas de plasticidad sináptica: una de corto plazo, con duración de minutos, y una de largo plazo, con duración de horas hasta días (Citri and Malenka, 2008). La plasticidad de largo plazo tiene dos expresiones básicas: potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés: “long-term potentiation”) que se refiere a un incremento en la eficacia de la transmisión sináptica, y la depresión de largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés: “long-term depression”), la cual se define como un decremento en la eficacia de la transmisión sináptica (Fig. 2). Ambos, LTP y LTD se subdividen en dos fases, una fase temprana (e-LTD o e-LTP, por sus siglas en inglés: “early-LTD o early-LTP”) con una duración aproximada de 90 minutos, y una fase tardía (L-LTD o L-LTP, por sus siglas en inglés: “late-LTD o late-LTP”) con una duración de más de 90 minutos, semanas o días. Además estos procesos de largo plazo son dependientes de la síntesis de proteínas (Bliss and Lomo, 1973, Kelleher et al., 2004a, Govindarajan et al., 2006).



**Figura 2. Potenciación y depresión sináptica de largo plazo en la región CA1 del hipocampo. a)** Experimento ilustrativo de potenciación sináptica inducido por protocolo de estimulación eléctrica de alta frecuencia (100 Hz por un segundo; flecha negra). **b)** Experimento ilustrativo de depresión sináptica inducido por protocolo de estimulación eléctrica de baja frecuencia (5 Hz por tres minutos; flecha abierta). Modificado de Citri y Malenka, 2008.

La plasticidad sináptica está mediada principalmente por los receptores a glutamato, mGluR (por sus siglas en inglés: metabotropic glutamate receptors), NMDA (por sus siglas en inglés: “N-methyl-D-aspartate”) y AMPA (por sus siglas en inglés:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor), debido a que la mayoría de las sinapsis excitatorias utilizan glutamato como neurotransmisor (Citri and Malenka, 2008, Collingridge et al., 2010).

### 1.3. Receptores glutamatérgicos

En el cerebro de los mamíferos el principal neurotransmisor excitador es el glutamato, el cual actúa a través de receptores de membrana, que incluye a los receptores ionotrópicos de glutamato iGluRs (por sus siglas en inglés: ionotropic glutamate receptors) los cuales son de tipo: AMPA, NMDA y receptores a kainato. El otro grupo son los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR, los cuales están acoplados a proteínas G que

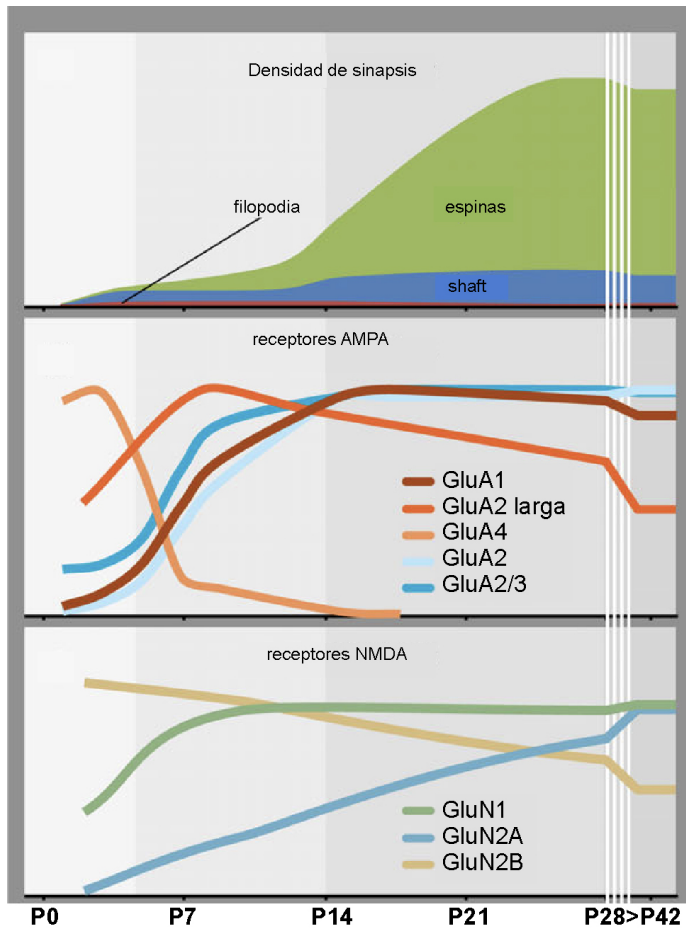
modulan la transmisión a través de segundos mensajeros (Collingridge et al., 2010, Lisman, 2017).

### **1.3.1 Receptores NMDA**

Los receptores NMDA forman un canal iónico que está sujeto a un tapón de magnesio dependiente de voltaje. Son altamente permeables al calcio y presentan una cinética de separación a ligando lenta. La activación de estos receptores requiere de un co-agonista que puede ser glicina o D-serina. Cuenta con un sitio de unión a zinc que es capaz de inhibir las corrientes de estos receptores de manera no competitiva (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004, Paoletti et al., 2013).

Los receptores NMDA se ensamblan como heterotetrámeros que difieren en la composición de las subunidades. Hasta ahora se han identificado siete subunidades, distribuidas en tres subfamilias de acuerdo a la secuencia de homología: GluN1, GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D) y GluN3 (GluN3A y GluN3B). Canónicamente los receptores NMDA se componen por dos subunidades GluN1 unidas a dos subunidades GluN2 ó una combinación de GluN2 y GluN3. En el cerebro embrionario sólo se expresan las subunidades GluN2B y 2D, mientras que la expresión de GluN2A inicia poco después del nacimiento y aumenta gradualmente (Paoletti et al., 2013). La composición de los receptores NMDAR no es estática cambia durante el desarrollo, además se ha demostrado que este cambio es sensible a la actividad sináptica en sinapsis neonatales (Bellone and Nicoll, 2007, Lohmann and Kessels, 2014) (Fig. 3).





**Figura 3. Curso temporal de la formación de estructuras sinápticas y expresión de subunidades de los receptores NMDA y AMPA en cerebro de roedores.** Panel superior: Formación de espinas dendríticas y “shaft” a lo largo del desarrollo. Paneles inferiores: Expresión de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA durante el desarrollo en hipocampo y corteza. Modificado de Lohmann y Kessels, 2014.

La subunidad GluN2 es crucial para determinar las propiedades de entrada de iones en el receptor. Esto incluye la probabilidad de apertura del canal, la sensibilidad al agonista y cinética de desactivación del receptor (Monyer et al., 1994, Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004, Rodenas-Ruano et al., 2012). Los receptores que en su composición contienen GluN1/GluN2A presentan una mayor probabilidad de apertura del canal, así como una cinética de desactivación de glutamato mayor en comparación a los receptores formados por GluN1/GluN2B (Erreger et al., 2005); Esta segunda composición permite un mayor influjo de calcio en comparación a los receptores conformados por la subunidad GluN2A (Sobczyk et al., 2005). Estas propiedades sugieren que los receptores NMDA son los responsables de la respuesta bidireccional de la plasticidad sináptica, y el

cambio en el balance de las subunidades es un mecanismo importante para la determinación de la fuerza sináptica (Shipton and Paulsen, 2014).

### **1.3.2 Receptores AMPA**

Los receptores AMPA son canales catiónicos tetraméricos que median la transmisión excitatoria rápida en el sistema nervioso central. Se ensamblan como homo o heterotetrámeros de las subunidades GluA1-A4 (Jacobi and von Engelhardt, 2018). Todas las subunidades de los receptores AMPA consisten de una región amino terminal extracelular, un dominio de unión a ligando, tres dominios transmembranales, un loop de re-entrada citoplásmico y una región carboxilo terminal intracelular (Bassani et al., 2013).

La afinidad de los receptores AMPA por glutamato es relativamente baja y el número de moléculas de glutamato determina la probabilidad de apertura del receptor (Rosenmund et al., 1998). Al respecto, se pensaba que la activación del receptor necesitaba por lo menos dos moléculas de glutamato, sin embargo trabajos recientes han propuesto que en presencia de subunidades auxiliares la unión de una sola molécula de glutamato es suficiente para la activación del receptor (Coombs et al., 2017). Este grupo de subunidades auxiliares son proteínas que actúan directamente con los receptores AMPA en la superficie celular. Esto determina características básicas del receptor como apertura, conductancia, farmacología y expresión en las sinapsis (Haering et al., 2014, Henley and Wilkinson, 2016, Greger et al., 2017). Los receptores AMPA están altamente enriquecidos en la densidad postsináptica de neuronas excitadoras (Scheefhals and MacGillavry, 2018).

La expresión de las subunidades del receptor AMPA cambia durante el desarrollo. Por ejemplo, en etapas tempranas del desarrollo muchas sinapsis contienen la subunidad GluA2 permeable a calcio, posterior a la segunda semana postnatal es cambiada por la subunidad GluA2 impermeable a calcio. La subunidad GluA1 es

altamente expresada en etapas tempranas del desarrollo, y a partir del día postnatal 14 casi todas las sinapsis expresan GluA2 (Fig. 3) (Lohmann and Kessels, 2014)

### **1.3.3 Receptores metabotrópicos de glutamato**

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) pertenecen al grupo de receptores acoplados a proteínas G, se expresan principalmente en el sistema nervioso central (Ferraguti and Shigemoto, 2006). Estos receptores cuentan con siete dominios transmembranales, en la región amino terminal cuentan con un dominio denominado VFD (Venus Flytrap Domain; por sus siglas en inglés). Este es el sitio de unión al ligando que produce un cambio conformacional que favorece el intercambio de GDP por GTP de la proteína G, un complejo heterotrimérico compuesto por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , lo cual desencadena la activación en cascada de segundos mensajeros (Bjarnadottir et al., 2006).

La familia de los receptores mGlu comprende ocho diferentes subtipos divididos en tres grupos basados en su secuencia, mecanismos de señalización y farmacología (Conn and Pin, 1997). El grupo I incluye mGluR1 y mGluR5, que están acoplados a una proteína Gq, la cual activa a la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y al diacilglicerol (DAG), activando una vía que conlleva la liberación de calcio intracelular de retículo endoplásmico y la fosforilación de la proteína cinasa C (PKC). El grupo I de los mGluR son postsinápticos y están localizados en la región perisináptica de la membrana postsináptica de neuronas excitadoras (Ferraguti and Shigemoto, 2006).

El grupo II incluye a los subtipos mGluR2 y mGluR3, y el grupo III comprende mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. El grupo II y III de los receptores mGlu están acoplados a proteínas Gi, que se encargan de inhibir la adenilato ciclasa, lo cual inhibe la formación de AMPc estimulado por la forskolina, activando la vía de ERK (Conn and Pin, 1997, Suh et al., 2018). Aunque estos grupos de receptores comparten vías de

señalización comunes, difieren en su patrón de expresión y su distribución subcelular. Por ejemplo, mGlu2 y mGlu3 son extensamente expresados en el cerebro, y detectados en las porciones pre-terminales de axones no mielinizados (Ferraguti and Shigemoto, 2006). Respecto al grupo III, todos los receptores se expresan en sistema nervioso central y se localizan en la postsinapsis y presinapsis (Ferraguti and Shigemoto, 2006), excepto el receptor mGlu6 el cual es exclusivo de retina, y se localiza en la postsinapsis de los bastones (Nakajima et al., 1993, Nomura et al., 1994).

#### **1.4. Potenciación sináptica de largo plazo en el hipocampo**

El primer fenómeno de plasticidad sináptica que se describió fue la potenciación de largo plazo, descrita en 1973 por Bliss y Lomo que reportaron que la activación repetitiva de sinapsis excitadoras en el hipocampo causaba un aumento rápido y persistente de la fuerza sináptica (Bliss and Gardner-Medwin, 1973, Bliss and Lomo, 1973). La potenciación de largo plazo se define como el incremento en la fuerza sináptica en respuesta a la actividad (Bliss and Collingridge, 2013). Se caracteriza por presentar cooperatividad, asociatividad y especificidad de entradas. La cooperatividad se refiere a que la LTP puede ser inducida por la activación simultánea de un número crítico de sinapsis. La asociatividad es la capacidad de potenciar una entrada débil (un pequeño número de sinapsis); cuando son activadas en asociación con una entrada fuerte (un número grande de sinapsis), a esta propiedad se le denomina plasticidad Hebbiana. Finalmente, la especificidad de entrada indica que la LTP es inducida sólo en las sinapsis activadas y no en sinapsis inactivas adyacentes en la misma célula (Nicoll et al., 1988). Se sugiere que estas características se sugiere promueven la capacidad de almacenamiento de información en neuronas individuales, pues diferentes sinapsis en una misma neurona pueden estar involucradas en diferentes circuitos codificando diferentes entradas (Citri and Malenka, 2008).

Para que esta información sea almacenada y codificada en las sinapsis, se propone que estos procesos de largo plazo requieren para su mantenimiento de la síntesis de proteínas local (Krug et al., 1984, Frey et al., 1988), que contribuyen a la facilitación de la plasticidad entre sinapsis. Este fenómeno fue propuesto como la hipótesis de etiquetado y captura sináptica (Frey and Morris, 1997). Esta hipótesis propone que la estimulación fuerte de una sinapsis activa la síntesis de proteínas, y que estas proteínas contribuyen a la expresión de la plasticidad de largo plazo de una sinapsis cercana estimulada débilmente. Es decir, que la sinapsis estimulada débilmente captura las proteínas que fueron sintetizadas por la sinapsis que recibió estimulación fuerte previamente. Esta hipótesis abrió las puertas para el estudio de las proteínas relacionadas con la plasticidad. Actualmente se sabe que en los procesos plásticos de largo plazo, la síntesis de proteínas es local (Kang and Schuman, 1996, Huber et al., 2000, Fonseca et al., 2006), es decir, se deriva de ARNm pre-existentes en las dendritas, las cuales se sabe cuentan con la maquinaria suficiente para esta síntesis proteica (Steward and Levy, 1982, Zhong et al., 2006). Esto sugiere que el tráfico y traducción de los mRNA está regulado por la actividad (Engert and Bonhoeffer, 1999, Toni et al., 1999, Citri and Malenka, 2008).

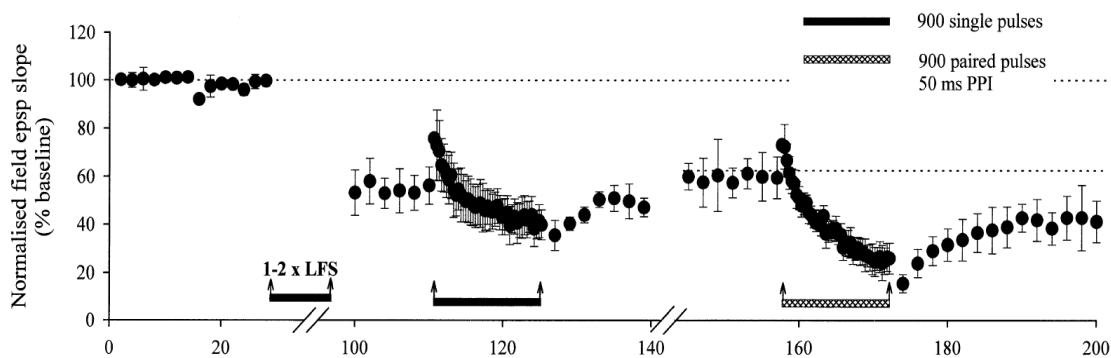
La inducción de LTP requiere la activación de los receptores NMDA durante una despolarización postsináptica fuerte que permita el incremento de calcio en la postsinapsis, además de la activación de los receptores AMPA, para activar las vías de señalización que permiten el LTP. Por lo tanto, la activación de los receptores NMDA permite la entrada de calcio que activa a la calcio calmodulina, está a su vez activa a la proteína cinasa II dependiente de calcio calmodulina (CAMKII), una vez activa se transloca del citosol a la densidad postsináptica (Lisman et al., 2012). En la sinapsis la CAMKII se une a la subunidad GluN2B de los receptores NMDA y fosforila a la subunidad 1 de receptor AMPA (Leonard et al., 1999), esto favorece el incremento en la densidad de receptores AMPA y NMDA en la densidad postsináptica y a permite el mantenimiento de la potenciación sináptica.

Experimentalmente, existen diversos protocolos para la inducción de la LTP, uno de los más comunes es la estimulación tetánica a alta frecuencia (Collingridge et al., 2010), siendo este tipo de potenciación mediado por receptores NMDA (Magee and Johnston, 1997, Markram et al., 1997). Actualmente y gracias al desarrollo de compuestos enjaulados (Matsuzaki et al., 2001, Kwon and Sabatini, 2011), y de la microscopía de excitación de dos fotones (Denk et al., 1990) se han desarrollado protocolos para inducir LTP en espinas sinápticas individuales (ver metodología). Esto ha permitido estudiar los cambios estructurales de las espinas dendríticas en respuesta a la potenciación sináptica, estableciendo una correlación entre el cambio en el volumen de las espinas y la actividad sináptica. Por ejemplo, las espinas que son potenciadas incrementan su volumen en respuesta a la LTP (Matsuzaki et al., 2004, Harvey and Svoboda, 2007). Además, se demostró que estos cambios estructurales de largo plazo requieren de la síntesis proteica que se lleva a cabo en los dominios dendríticos, lo que permite las interacciones entre espinas dendríticas cercanas dentro de las dendritas (Govindarajan et al., 2006). Sin embargo, las sinapsis no sólo se potencian, existe una bidireccionalidad de la respuesta sináptica, permitiendo un equilibrio en la respuesta de las neuronas.

### **1.5. Depresión sináptica de largo plazo en el hipocampo**

En búsqueda del fenómeno contrario a la potenciación se demostró que una estimulación de baja frecuencia era capaz de invertir una potenciación sináptica previamente inducida, a dicho proceso se le denominó depotenciación (Lynch et al., 1977). Sin embargo, no fue hasta 1992 cuando se demuestra por primera vez la inducción de LTD sin el protocolo previo de LTP (Dudek and Bear, 1992). Actualmente, se define a la depresión de largo plazo (LTD) como la disminución en la fuerza sináptica (Bear and Abraham, 1996). Una de las principales estructuras en las que se ha estudiado la LTD es el hipocampo (Bear and Abraham, 1996, Bear, 1999), donde se han identificado dos mecanismos que modulan este proceso; el primer mecanismo está mediado por receptores NMDA y el segundo es mediado por receptores mGlu. Ambos mecanismos

son completamente independientes y pueden coexistir en las mismas sinapsis (Oliet et al., 1997, Kemp et al., 2000) (Fig.4).



**Figura 4. Depresión sináptica de largo plazo mediada por receptores NMDA y mGluR.** En rebanadas de ratones jóvenes la saturación de LTD mediada por receptores NMDA (900 pulsos a baja frecuencia) no ocluye a la depresión mediada por receptores mGluR (900 pares de pulsos con 50 ms entre estímulo). Kemp, et al., 2000.

### 1.5.1 Depresión sináptica de largo plazo mediada por receptores NMDA

Como se mencionó anteriormente, en el hipocampo coexisten dos tipos de LTD, uno de ellos está mediado por receptores NMDA (LTD-NMDA). Para la inducción de este tipo de LTD se utilizan protocolos como la estimulación prolongada con pulsos eléctricos de baja frecuencia (LFS) en la postsinapsis, o el protocolo de STDP, donde se estimula primero la postsinapsis (despolarizándola) y milisegundos (50ms) después se estimula la presinapsis (Collingridge et al., 2010). Como ocurrió con los protocolos de inducción de LTP, los avances tecnológicos han hecho posible inducir la LTD en sinapsis individuales con liberación de glutamato enjaulado a través de microscopía de dos fotones utilizando pulsos de luz infrarroja a baja frecuencia (Holbro et al., 2009, Oh et al., 2013).

Respecto a la inducción de LTD mediado por NMDA, existe controversia pues algunos reportes han demostrado que este tipo de respuesta sináptica es fácilmente inducible en neuronas de animales neonatos o juveniles (Oliet et al., 1997). Sin embargo, en neuronas de ratones adultos o *in vivo* es muy difícil inducir este tipo de LTD. De

manera muy interesante se ha demostrado que la inducción de LTD puede ser facilitada si se da el protocolo de LFS mientras los animales exploran un ambiente nuevo o enriquecido (Manahan-Vaughan and Braunewell, 1999), o bien son expuestos a estrés previo al protocolo de LFS (Xu et al., 1997, Artola et al., 2006).

El mecanismo molecular de NMDA-LTD comienza con la entrada de calcio extracelular, el cual, se une a la calmodulina que activa a la fosfatasa 2B (PP2 o calcineurina). La PP2 defosforila al inhibidor-1 permitiendo la activación de la proteína fosfatasa 1 (PP1), ésta a su vez defosforila a la serina 845 de los receptores AMPA favoreciendo su internalización (Zhou et al., 2004, Nabavi et al., 2013). Por otro lado, cuando la proteína sensora de calcio hipocalcaina (HCP) detecta un aumento en los niveles de calcio intracelular, se transloca a la membrana plasmática donde forma un complejo con la proteína adaptadora dos (AP2) y remueve al factor sensitivo N-etilmaleimidina (NSF) favoreciendo la endocitosis de los receptores AMPA (Palmer et al., 2005).

### **1.5.2 Depresión sináptica mediada por receptores metabotrópicos de glutamato**

El segundo tipo de LTD que coexiste en la región CA1 del hipocampo esta mediado por receptores metabotrópicos de glutamato. Este tipo de LTD puede ser inducido a través de un protocolo de pares de pulsos a baja frecuencia (PP-LFS), también denominado LTD inducido sinápticamente, o con la administración del agonista de grupo I de receptores mGlu (DHPG). El primer protocolo presumiblemente activa el grupo I de receptores extrasinápticos de mGlu (Citri and Malenka, 2008). Este tipo de LTD puede ser inducido en neuronas de animales neonatales, jóvenes y adultos (Kemp et al., 2000, Nosyreva and Huber, 2005), es independiente de la activación de NMDA (Huber et al., 2000), induce la endocitosis de receptores AMPA (Snyder et al., 2001, Nosyreva and Huber, 2005), y lo más interesante, induce la síntesis de proteína localmente (Huber et al., 2000).



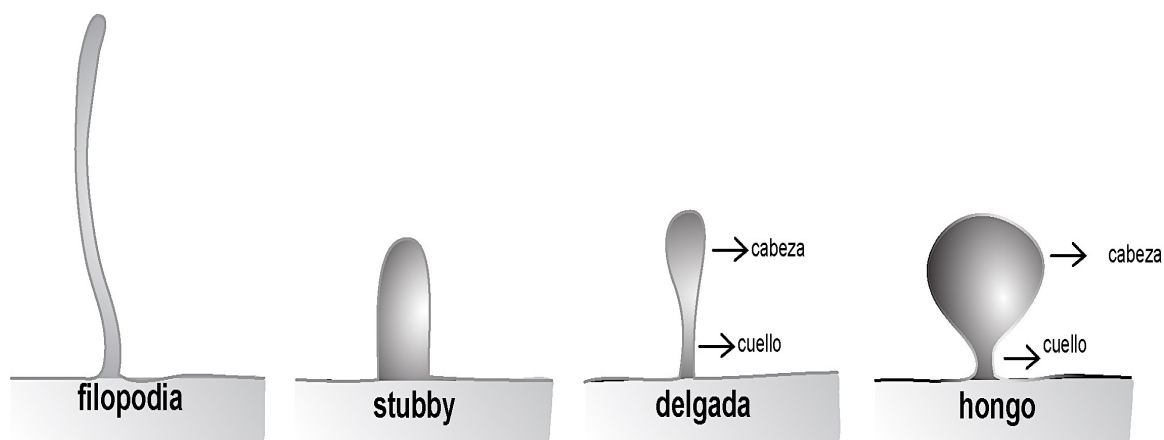
La estimulación de los receptores mGlu conlleva a la activación de la proteína Gq, como se describió previamente. Ésta activa la vía de señalización de PKC. En algunos casos, PICK1 facilita la interacción de PKC con la subunidad GluA2, PKC fosforila la serina 880 y esto permite remover el complejo ABP-GRIP favoreciendo la remoción de los receptores AMPA de la sinapsis (Jo et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, la mGluR-LTD promueve la síntesis de proteínas, presumiblemente a través de la vía ERK1/2 (Choe and Wang, 2001a, b, Gallagher et al., 2004). Esta vía está involucrada con la fosforilación de Mnk1, y factores que regulan la traducción de proteínas involucradas en la internalización de receptores AMPA, como lo es Arc/Arg3.1, MAP1B, y OPHN1 (McCoy et al., 2005, Chrestensen et al., 2007). Por otro lado, existe evidencia donde se observa que la vía PI3K-Akt conlleva la activación mTOR, el cual, podría ser uno de los principales moduladores de la traducción en la depresión mediada por los receptores mGlu (Banko et al., 2006, Antion et al., 2008).

### **1.6. Plasticidad estructural**

Los circuitos neuronales se definen por la estructura de axones y dendritas, y la sinapsis entre ellos. La formación y eliminación de sinapsis es mediada por la plasticidad estructural, es decir, cambios en el número, tamaño y forma de las conexiones sinápticas (Holtmaat and Svoboda, 2009). En el sistema nervioso cerca del 90% de las sinapsis excitadoras ocurren en las espinas dendríticas (Nimchinsky et al., 2002). Canónicamente las espinas dendríticas están compuestas de una cabeza ( $\sim 1 \mu\text{m}$  en diámetro) conectada a la dendrita a través de un "cuello" ( $\sim 0.2 \mu\text{m}$  en diámetro) (Fig. 5), y pueden alcanzar de 0.5 a varias micras de largo (Yuste and Bonhoeffer, 2001).

Durante el desarrollo, las dendritas son las primeras en formarse, seguidas de protrusiones alargadas denominadas filopodios, los cuales durante la sinaptogénesis forman sinapsis con axones aledaños (Ziv and Smith, 1996). Los filopodios son altamente flexibles se extienden y se contraen formando sinapsis en el "shaft" (termino que hace referencia a una región dendrítica de mayor volumen sin llegar a formar una protrusión y con la capacidad de tener una sinapsis) de las dendritas o convirtiéndose en protrusiones

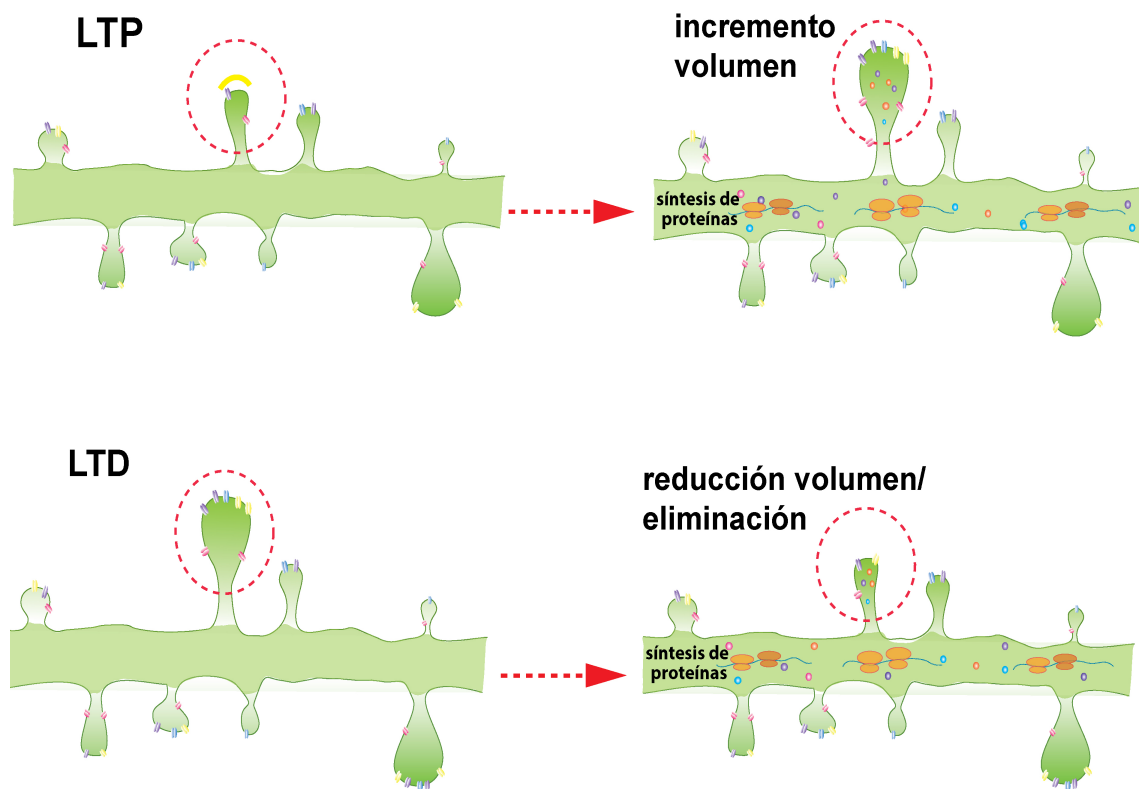
tipo espinas que pueden desarrollarse en espinas funcionales (Dailey and Smith, 1996, Fiala et al., 1998). Durante la etapa postnatal ocurre el fenómeno de la poda de espinas, el cual elimina hasta 50% de las espinas formadas durante el neurodesarrollo (De Felipe et al., 1997). Con el uso de técnicas de microscopía las espinas se han clasificado de acuerdo a su morfología en espinas tipo “stubby”, aquellas sin un cuello bien definido; tipo hongo, aquellas con una cabeza grande y definida con un cuello delgado; espinas delgadas, con cabezas pequeñas conectadas a la dendrita con un cuello delgado y tipo filopodia, espinas alargadas sin cabeza definida (Fig. 5) (Phillips and Pozzo-Miller, 2015).



**Figura 5. Morfología de las espinas dendríticas.** Esquema de clasificación basado en la morfología de las espinas dendríticas. Donde se representan cuello y cabeza. Modificado de Rochefort y Konnerth, 2012.

Actualmente se sabe que existe una correlación entre la respuesta sináptica y la estructura de las espinas dendríticas, específicamente el cambio en el volumen. Cuando espinas individuales son potenciadas o deprimidas a través de la fotólisis de glutamato enjaulado y monitoreadas *in vitro* con microscopio de excitación de dos fotones, se ha reportado que existe una correlación lineal, es decir, un incremento en el volumen de la espinas responde a una potenciación, mientras que una depresión promueve el encogimiento de las espinas (Fig. 6) (Matsuzaki et al., 2004, Zhou et al., 2004, Harvey and Svoboda, 2007, Ramiro-Cortes and Israely, 2013).

Por otra parte, el sistema nervioso puede almacenar y procesar información potenciando o deprimiendo las conexiones sinápticas entre neuronas de una manera dependiente de la experiencia (Nabavi et al., 2014). La formación y eliminación de sinapsis está mediada por la plasticidad estructural (Holtmaat and Svoboda, 2009), así los circuitos neuronales modifican sus conexiones para incrementar la capacidad de almacenamiento y formar nuevas memorias, además de mantener la homeostasis sináptica, es decir, el balance en la excitabilidad de las neuronas dentro de un circuito (Poirazi and Mel, 2001, Turrigiano, 2012).



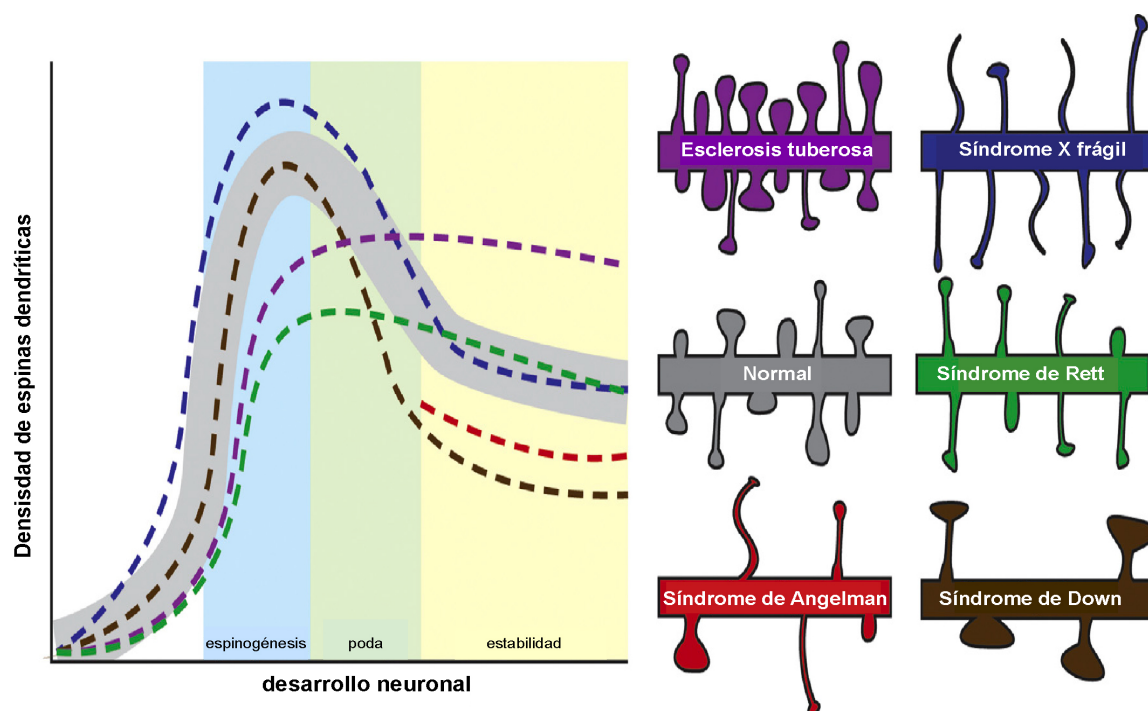
**Figura 6. Potenciación y depresión sináptica y sus correlatos estructurales.** El panel superior ejemplifica una espina dendrítica individual que recibe un protocolo de LTP lo que promueve un aumento del volumen. En el panel inferior se ejemplifica una espina dendrítica individual que recibe un protocolo de LTD lo que induce una disminución en el volumen de la espina. En ambos casos se ejemplifican procesos de largo plazo dependientes de síntesis proteica (Zhou et al., 2004, Govindarajan et al., 2011).

### 1.7. Desórdenes del neurodesarrollo asociados al espectro autista

Es de particular importancia el estudio de los cambios estructurales en las espinas dendríticas en respuesta a la actividad sináptica, debido a que en diversos trastornos neurológicos las deficiencias cognitivas están asociadas con alteraciones sustanciales en la morfología de las espinas dendríticas y la respuesta sináptica (Fig. 7) (Kaufmann and Moser, 2000, Penzes et al., 2011, Phillips and Pozzo-Miller, 2015). Por ejemplo, estudios *post mórtem* en pacientes con síndrome X frágil, la forma más común de retraso mental heredada en humanos, muestran que las espinas dendríticas presentan una morfología anormal con aspecto inmaduro y alta densidad (Irwin et al., 2001). En el modelo murino de este síndrome (*Fmr1-KO*) se reportó un incremento en la sensibilidad a LTD mediado por receptores metabotrópicos (mGluR) y espinas con morfología anormal, además de un incremento en la síntesis proteica.

Dentro de otros desórdenes del neurodesarrollo donde se han reportado alteraciones en las espinas dendríticas están el síndrome de Down, síndrome de Angelman, el síndrome de Rett, entre otros (Fig. 7). Por ejemplo, en el síndrome de Down, causado por la presencia de una copia extra del cromosoma 21, se presenta número de espinas normal en fetos de humano, sin embargo, a los cuatro meses de edad este número disminuye en la neocorteza (Takashima et al., 1981, Takashima et al., 1989), lo cual sugiere que la disminución de espinas puede ser el resultado de una maduración alterada donde la poda sináptica es excesiva (Benavides-Piccione et al., 2004). El síndrome de Angelman es causado por una delección del cromosoma 15, específicamente del gen *UBE3a*, el cual está involucrado en la regulación epigenética de neuronas (Rougeulle et al., 1998, Runte et al., 2001, Landers et al., 2004). En modelos animales genéticos de este síndrome se observan deficiencias en LTP y un aumento de LTD mediado por mGluR (Weeber et al., 2003, van Woerden et al., 2007). Lo que correlaciona con una menor densidad de espinas así como espinas más cortas.

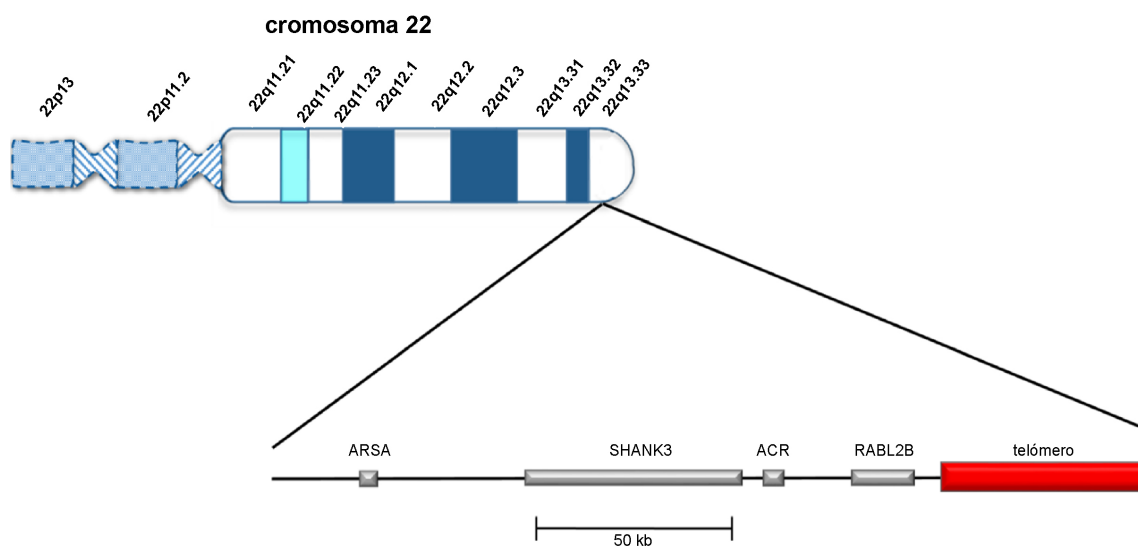
Estos reportes han llevado a acuñar el término “sinaptopatías”, refiriéndose a desórdenes causados predominantemente por mutaciones en genes asociados con la estructura y función sináptica (Zoghbi and Bear, 2012).



**Figura 7. Caracterización de espinas dendríticas en desórdenes del neurodesarrollo.** Densidad de espinas dendríticas durante las etapas del desarrollo. En gris se observa la curva de desarrollo de un individuo normal, en donde hay un aumento en el número de espinas y sinapsis al inicio, que posteriormente disminuye durante el proceso de la poda sináptica y posteriormente se mantiene constante. A su vez presentan una disminución de espinas tipo filopodia en la etapa de mantenimiento y la presencia de espinas tipo hongo, delgadas y “stubby”. En colores observamos los distintos síndromes que presentan alteraciones en el neurodesarrollo así como en la morfología de las espinas. Modificado de Phillips y Pozzo-Miller, 2015.

Un ejemplo de sinaptopatía es el síndrome de espectro autista Phelan-McDermid, caracterizado por severa hipotonía en neonatos (disminución del tono muscular), retraso o no desarrollo del habla, deficiencias en el aprendizaje, y las características del espectro autista, que son contacto visual pobre, movimientos estereotipados y problemas de socialización (Phelan and McDermid, 2012). Este síndrome es causado la deleción del gen Shank3 en el cromosoma 22, en el brazo q13 (Wilson et al., 2003). El tamaño de las deleciones en este síndrome es muy variable, puede ir de 0.1 a 10 Mb (Wilson et al.,

2003, Dhar et al., 2010). La deleción puede incluir los genes ARSA, que codifica una proteína que hidroliza al sulfato de cerebrósido. También incluye a ACR, que codifica para una proteasa de serina en el cromosoma del espermatozoide, y RABL2B, un miembro de las RAS GTPasas que cuenta con un gen parálogo en el cromosoma 2q13 (Wong et al., 1999, Costales and Kolevzon, 2015). Sin embargo, el común denominador en todos los casos reportados es la haploinsuficiencia del gen Shank3 (Fig. 8).

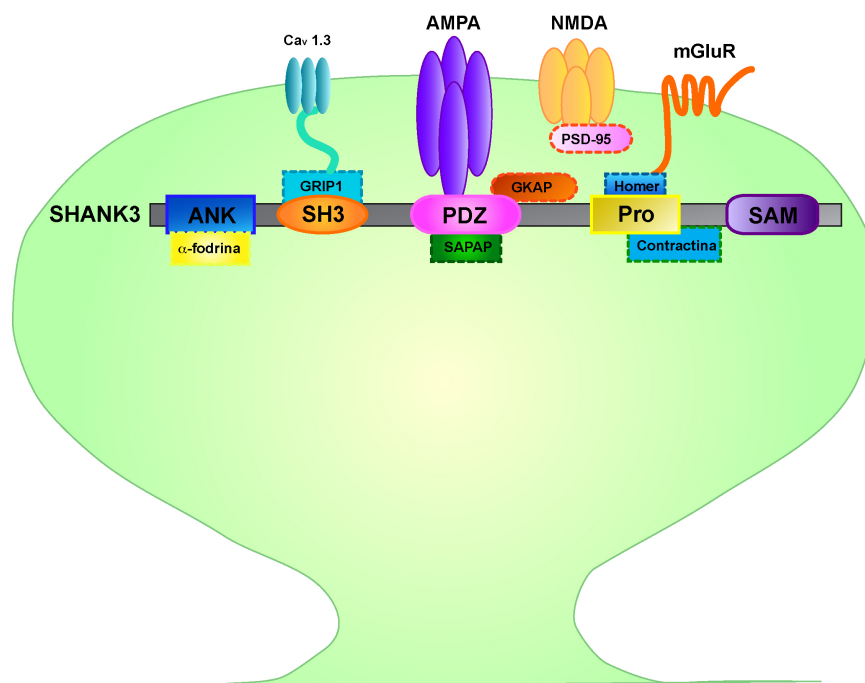


**Figura 8. Esquema del cromosoma 22 y deleción de Shank3.** La deleción puede incluir los genes ARSA, ACR, RABL2B SHANK3 y el telómero. Modificado de Costales y Kolevzon, 2015.

### 1.8. SHANK3

SHANK3 es una proteína de anclaje de la densidad postsináptica de neuronas glutamatérgicas (Lim et al., 1999, Jiang and Ehlers, 2013). Estructuralmente cuenta con cinco dominios de interacción a proteínas, el primer dominio es una región de seis repeticiones de anquirina, motivo proteico de 33 residuos de aminoácidos en alfa hélices, la cual interactúa con la proteína de densidad postsináptica SHARPIN y con el citoesqueleto a través de la proteína  $\alpha$ -fodrina. El segundo dominio es la región SH3 (por sus siglas en inglés: Src homology 3) que interactúa con la proteína GRIP y con canales de calcio dependientes de voltaje. El dominio PDZ, que interactúa de manera

directa con los receptores AMPA y con las proteínas SAPAP1 (por sus siglas en inglés: SAP90/PSD95- associated protein 1”), que a su vez interactúan con los receptores NMDA. El cuarto dominio es una región rica en prolina, donde se une la contractina y la proteína Homer, la cual interactúa con los receptores mGlu. Finalmente se encuentra el dominio SAM, el cual es requerido para la localización de SHANK3 a la densidad postsináptica (Fig. 9) (Tu et al., 1999, Jiang and Ehlers, 2013, Monteiro and Feng, 2017).



**Figura 9. Esquema de la proteína SHANK3.** El esquema ilustra a la proteína SHANK3 (gris) con sus respectivos dominios de unión a proteínas, repeticiones de anquirina (ANK), SH3, PDZ, región rica en Prolina (Pro) y SAM, y su expresión en la postsinapsis. Además muestra los sitios de unión a proteínas para los receptores glutamatérgicos y el canal de calcio Cav 1.3. Modificado de Jiang y Elhers, 2013.

Se ha demostrado en modelos genéticos que la delección total de Shank3 desencadena una disminución de la actividad espontánea, reducción en la potenciación sináptica de largo plazo, menor número de sinapsis glutamatérgicas y disminución de densidad de espinas. A nivel molecular se ha reportado una disminución de la expresión de los receptores NMDA y receptores AMPA, disminución en las proteínas de densidad postsináptica como Homer, PSD-93, PSD-95 y SAPAP3 (Bozdagi et al., 2010, Peca et al., 2011, Wang et al., 2011, Kouser et al., 2013, Wang et al., 2016, Zhou et al., 2016).

A partir de estudios en pacientes, se han desarrollado modelos animales del síndrome Phelan-McDermid, replicando condiciones similares a las detectadas en humanos, ratones deficientes en la proteína SHANK3 (heterocigotos) presentan alteraciones en el tamaño de la densidad postsináptica, alteraciones conductuales, como deficiencias en interacción social, vocalizaciones anormales, comportamientos repetitivos (Bozdagi et al., 2010, Peca et al., 2011).

## **2. Planteamiento del problema**

Sabemos que la proteína SHANK3 se une directa e indirectamente a los receptores glutamatérgicos (mGluR y NMDA) involucrados en la plasticidad sináptica. Sin embargo, aún se desconoce como la disminución de la proteína SHANK3, provocada por la haploinsuficiencia del gen Shank3, modifica la plasticidad sináptica y estructural en el autismo. Lo cual podría explicar las alteraciones en la actividad neuronal observadas en pacientes autistas, donde se ha reportado un incremento en la actividad neuronal o ausencia de actividad en ciertas áreas corticales (Samson et al., 2012, Hahamy et al., 2015). Por lo tanto, en este proyecto nos planteamos evaluar la plasticidad sináptica y sus cambios morfológicos en espinas dendríticas individuales en nuestro modelo de autismo, en respuesta a la depresión sináptica mediada por receptores mGlu o NMDA.

## **3. Hipótesis**

Si la proteína SHANK3 interactúa con los receptores glutamatérgicos, en nuestro modelo de autismo (ratones SHANK3<sup>+/-</sup>), la haploinsuficiencia de Shank3 promoverá una alteración de la respuesta sináptica, específicamente la depresión sináptica y sus correlatos estructurales mediados por los receptores NMDA y mGlu.



#### **4. Justificación**

Cuando ocurre una desregulación de la expresión de proteínas implicadas en la respuesta sináptica, como la mutación de la proteína SHANK3, se promueve un desequilibrio tanto en la respuesta sináptica como en la estructura de los circuitos neuronales, lo cual se sugiere puede ser la causa de los fenotipos neurológicos en los síndromes de espectro autista o de retraso mental. En este modelo de autismo donde sabemos que la proteína SHANK3 regula indirectamente a los dos principales receptores a glutamato activados durante la respuesta sináptica (mGluR y NMDA), podremos dilucidar y disectar el papel de cada uno de los receptores en la plasticidad sináptica. En condiciones fisiológicas las neuronas reciben entradas que potencian o deprimen su actividad sináptica, y estas entradas a su vez activan receptores tipo mGluR y/o NMDA en una misma región dendrítica en la misma ventana de tiempo. De aquí la importancia de dilucidar el papel y la interacción de este tipo de receptores durante la respuesta sináptica y sus correlatos estructurales, para conocer de qué manera afectan la plasticidad sináptica en condiciones normales y en una condición neurológica.

#### **5. Objetivo General**

Determinar si en el modelo genético de autismo (ratones SHANK3<sup>+/-</sup>) se altera la depresión sináptica mediada por receptores NMDA o mGluR, y si esta alteración en la respuesta sináptica promueve alteraciones moleculares y morfológicas de las espinas dendríticas en neuronas del hipocampo.

##### **5.1. Objetivos particulares**

1. Evaluar si hay alteraciones morfológicas en las espinas dendríticas de la región CA1 del hipocampo de ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>).
2. Determinar los niveles de expresión de los receptores mGluR y de las subunidades GluN2A y GluN2B en neuronas de ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>) y silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>).

3. Evaluar la depresión sináptica (LTD) en espinas dendríticas individuales mediada por receptores NMDA y mGluR en ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>) y silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>) a través de la foto-activación de glutamato enjaulado con microscopía de excitación de dos fotones.

4. Evaluar los cambios estructurales en respuesta a la LTD inducida por mGluR y NMDA en espinas dendríticas estimuladas y espinas dendríticas vecinas en ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>) y silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>).

## 6. Metodología

Para desarrollar los objetivos planteados en este proyecto se utilizó como modelo de estudio cultivos organotípicos de hipocampo de ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>) y ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>), estos últimos como modelo genético de autismo. En esta preparación se realizaron todos los experimentos planteados (Fig. 12).

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (protocolo no. YRC20-14).

**6.1 Cultivos organotípicos de rebanadas de hipocampo.** Se obtuvieron rebanadas transversales de hipocampo de ratones postnatales de 7 a 10 días de ambos genotipos Shank3<sup>+/+</sup> y SHANK3<sup>+/-</sup> de 350  $\mu$ m de grosor. Se mantuvieron en medio de cultivo MEM 1X (Invitrogen) suplementado con suero de caballo inactivado 20%, GlutaMAX 1mM (Invitrogen), D-glucosa 27 mM, HEPES 30 mM, NaHCO<sub>3</sub> 6 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, ácido ascórbico 25% e insulina 10 mg/ml, pH 7.3 y una osmolaridad de 300-310 mOsm (Govindarajan et al., 2011). Los cultivos se mantuvieron a 37° C a una atmósfera saturada de vapor de agua con O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5% de 8 a 12 días, cambiando el medio cada dos días.

**6.2. Clasificación y cuantificación de espinas dendríticas.** Derivados de cultivos organotípicos, se adquirieron mapas de neuronas piramidales positivas a GFP con microscopía de excitación de dos fotones. Se tomaron regiones de interés (ROIs) de 30x30  $\mu\text{m}$  con proyecciones en Z con intervalos de 0.5  $\mu\text{m}$ . Se utilizó un objetivo W-Apochromat 63x, de inmersión de agua, 1.0 AN, 2.4 mm distancia de trabajo, 910 nm para excitar GFP, filtro de 500-550 para la emisión, a una resolución de 1024 x 1204 pixeles. Se tomaron tres ROIs en cada región del árbol dendrítico (dendritas basales, apicales y del “tuft”).

Las espinas se clasificaron morfológicamente en cuatro tipos de acuerdo a la literatura (Rocheffort and Konnerth, 2012), tipo hongo, espinas con cabeza ancha y un cuello bien definido; tipo stubby, espinas sin cuello anchas y de poca longitud; tipo delgadas, espinas alargadas con cuello definido y cabeza definida; tipo filopodia, espinas alargadas y sin cabeza definida (Fig. 5). Finalmente, de las imágenes obtenidas se cuantificaron de una a tres dendritas con una longitud de 20 a 30  $\mu\text{m}$  cada una. A través del programa Neuronstudio (software gratuito) se realizó la clasificación y cuantificación de espinas manualmente.

**6.3 Transfección balística.** Los cultivos organotípicos se transfectaron usando el método balístico *Helios gene gun* (Bio-Rad). El principio básico de esta técnica es cubrir partículas de oro de 1.6  $\mu\text{m}$  diámetro (Bio-Rad) con ADN [100  $\mu\text{g}$ ], en este caso, de reporteros fluorescentes como la proteína verde fluorescente (GFP) (Momose et al., 1999). Estas partículas de oro cubiertas de ADN (denominadas *bullets*) son introducidas directamente a la rebanada utilizando helio a una presión de 180-200 psi. La transfección se realizó después de 3-5 días *in vitro*, los experimentos son realizados de 2-4 días posteriores. La transfección es aleatoria, por lo tanto se transfectan neuronas piramidales, interneuronas o astrocitos. La tasa de transfección óptima es alrededor de 20 células positivas por rebanada, esta tasa baja es óptima para nuestros experimentos, puesto que es necesario tener pocas y separadas células positivas para ubicar el árbol

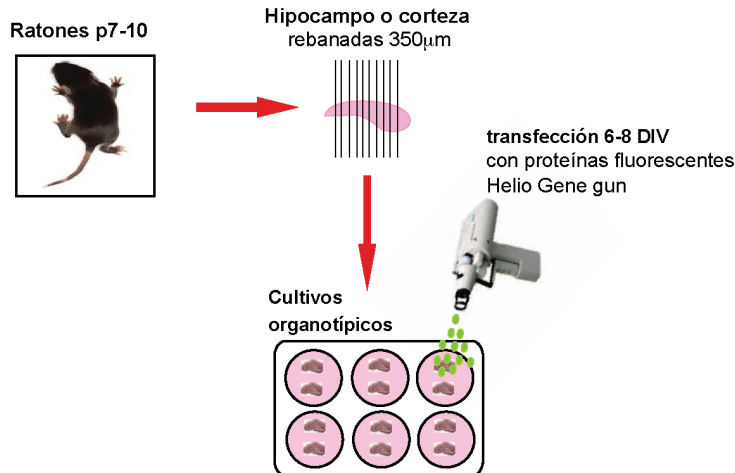
dendrítico y obtener imágenes de las espinas dendríticas sin interferencia de fondo inespecífico u otras células (Fig. 10).

*Protocolo para preparar los cartuchos con ADN acoplado a partículas de oro:* Se usaron volúmenes iguales de espermidina, ADN y  $\text{CaCl}_2$ . Se mezcló la espermidina (poliamina que une y precipita ADN) con las partículas de oro (10 mg), posteriormente se adicionaron y mezclaron el ADN (100  $\mu\text{g}$ ) y finalmente para precipitar el complejo del oro, ADN y espermidina se adicionó  $\text{CaCl}_2$  1 mM y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Cuando precipitó el complejo, se lavó tres veces con EtOH 100%. Después se centrifugó y desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en una solución de polivinilpirrolidona 1X (PVP), esta solución se inyectó en un tubo Tefzel, que está colocado en la estación de preparación de tubo (Bio-Rad), el cual ha sido secado previamente con nitrógeno 0.2-0.3 psi, posteriormente se esperó un minuto a que el complejo ADN-oro precipite en la base del tubo y se extrae el sobrenadante. Finalmente el tubo se roto 360° continuamente pasando nitrógeno a 0.2-0.3 psi a través del tubo para secar el complejo ADN-oro. Se removió el tubo de la estación y se cortaron en pequeños cartuchos, se almacenaron con un desecador a 4 °C. De esta forma estuvieron listos para introducirse en el Gene gun y ser disparados a las células utilizando la presión del helio.

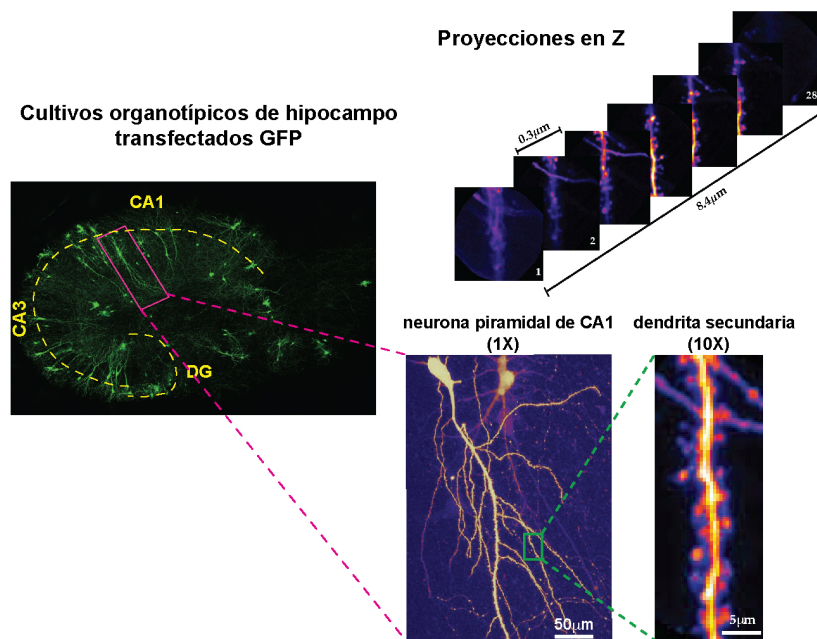
**6.4 Imágenes de espinas dendríticas con microscopía de excitación de dos fotones.** Se obtuvieron imágenes de espinas dendríticas con microscopio de excitación de dos fotones utilizando un sistema de escaneo basado en galvanómetros (Zeiss LSM-710 multi-fotón), usando un láser Ti:Sapphire, Coherent Ultrall controlado por el software de Zen black (Zeiss). Las rebanadas se perfundieron con ACSF oxigenado que contenía NaCl 127 mM, KCl 2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25 mM, D-glucosa 25 mM,  $\text{CaCl}_2$  2mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM (equilibrada con  $\text{O}_2$  95% y  $\text{CO}_2$  5%) a temperatura ambiente a un rango de perfusión de 1.5 ml/min. Las imágenes de dendritas secundarias o terciarias de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo se obtuvieron usando un objetivo de inmersión en agua (W-Apochromat 63x, 1.0 NA, Zeiss), a una magnificación de 6.5x.

Las proyecciones en Z de las dendritas ( $0.3 \mu\text{m}$  por sección) fueron colectadas cada 5 min por alrededor de 4 h a una resolución de  $1024 \times 1024$  pixeles, excitación de  $910\text{nm}$  para GFP, y emisión con un filtro  $500\text{-}550 \text{ nm}$  (Fig. 10).

### a Cultivos organotípicos de hipocampo



### b Microscopia de dos fotones



**Figura 10. Cultivos organotípicos y microscopía de dos fotones.** a) Cultivos organotípicos de rebanadas de hipocampo transfectados a los 3-5 días *in vitro* con GFP con el sistema "Gene gun" (ver metodología). b) Micrografía de neurona piramidal de la región CA1 transfectada con GFP. Imágenes de microscopía de excitación de dos fotones de neuronas piramidales y de una dendrita secundaria, para visualizar y analizar el volumen de las espinas, se colectan proyecciones en Z de las dendritas por un período de  $\sim 3\text{h}$ , con intervalos de 5 min.

**6.5 Foto-activación de glutamato enjaulado con microscopía de excitación de dos fotones.** Los compuestos enjaulados son elementos sensibles a la luz, constan de una biomolécula de interés unida a un grupo protector foto removible, esta interacción mantiene una conformación inactiva de la biomolécula (Fig. 11). Cuando el compuesto es iluminado el enlace entre ambos elementos se rompe, esto permite la liberación de la biomolécula, y por ende la posibilidad de que esta interactúe y participe en un proceso biológico (Pettit et al., 1997).

Un compuesto que nos permite estudiar la respuesta sináptica a través de la activación de receptores glutamatérgicos a nivel de una sola espina dendrítica, es el glutamato enjaulado (MNI (4-4-metoxi-7-nitroindolinil)-glutamato). El glutamato es liberado a través de pulsos de luz de 720 nm mediante microscopía de excitación de dos fotones a una resolución espacio-temporal similar a la activación de terminales presinápticas ( $\sim 0.4 \mu\text{m}$  y  $\sim 0.1 \text{ms}$ ). Con este compuesto se puede inducir corrientes mediadas por receptores AMPA con amplitudes que oscilan en el rango de las corrientes excitatorias postsinápticas miniatura (Matsuzaki et al., 2001, Matsuzaki et al., 2004). De esta manera, con el uso de compuestos enjaulados y la microscopía de excitación de dos fotones, se han diseñado protocolos de pulsos de luz infrarroja para inducir potenciación o depresión sináptica en espinas dendríticas individuales y registrar la respuesta eléctrica y los cambios estructurales (Fig. 11) (Matsuzaki et al., 2004, Harvey and Svoboda, 2007).

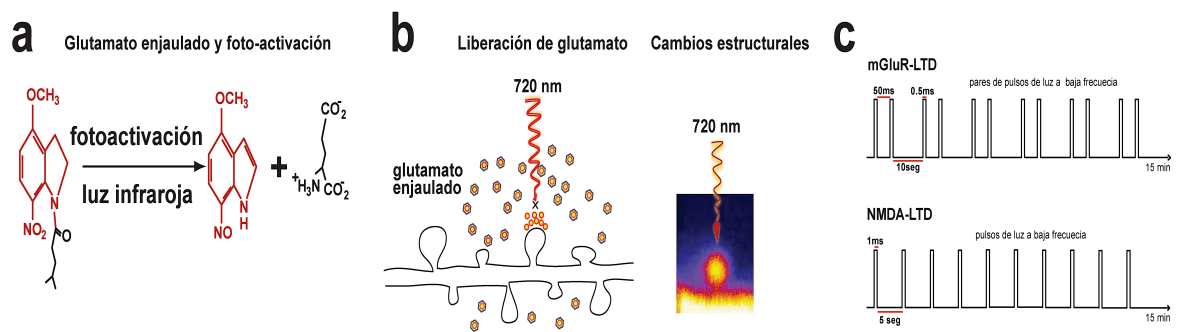
**6.5.1 Inducción de mGluR-LTD con glutamato enjaulado en una sola espina.** La inducción de mGluR-LTD en una sola espina, mimetiza el protocolo convencional de pulsos-pareados a baja frecuencia (PP-LFS: 900 pulsos pareados, 15 min, 1Hz), se ajustó el protocolo para la foto-activación de glutamato enjaulado en una sola espina a través de microscopía de excitación de dos fotones. El protocolo de estimulación consiste en pulsos-pareados a baja frecuencia (uPP-LFS): 90 pulsos (intervalos 50 ms entre pulsos), 0.1 Hz, durante 15 min,  $\sim 15 \text{mW}$  poder de láser (720 nm), MNI-caged-L-glutamate 2.5

mM (Tocris, 1490). La liberación de glutamato se realizó a  $\sim 0.5 \mu\text{m}$  del centro de la espinas, en dirección contraria a la dendrita (Fig. 11).

Para los experimentos en presencia de antagonistas del grupo I de mGluR, las rebanadas se perfundieron con ACSF (previamente descrito) en presencia de MPEP ( $10\mu\text{M}$ ) (Tocris, 1212) y LY 367385 ( $100\mu\text{M}$ ) (Tocris, 1237) durante treinta minutos previos a la estimulación.

**6.5.2 Inducción de NMDA-LTD con glutamato enjaulado en una sola espinas.** Para la inducción de NMDA-LTD en una sola espinas, se diseñó un protocolo nuevo basado en el protocolo de pulsos eléctricos a baja frecuencia (LFS). Nuestro protocolo consiste en estimular con pulsos de luz a baja frecuencia con microscopía de dos fotones uLFS: 180 pulsos, 0.2 Hz, durante 15 min,  $\sim 15 \text{ mW}$  poder de laser (720 nm), 2.5 mM MNI-caged-L-glutamate. La liberación de glutamato se realizó a  $\sim 0.5 \mu\text{m}$  del centro de la espinas, en dirección contraria a la dendrita (Fig. 11).

Para los experimentos en presencia del antagonista del receptores NMDA, se perfundió con ACSF (previamente descrito) en presencia de D-AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ) (Sigma, A8054) durante todo el experimento.



**Figura 11. Foto-activación de glutamato enjaulado.** **a)** Estructura del glutamato enjaulado (MNI-L-cage-glutamate). **b)** foto-activación del glutamato enjaulado con luz infrarroja (720nm), en espinas dendríticas individuales por medio de microscopía de excitación de dos fotones. **c)** Protocolos de inducción de mGluR-LTD y NMDA-LTD a través de pulsos de luz infrarroja.

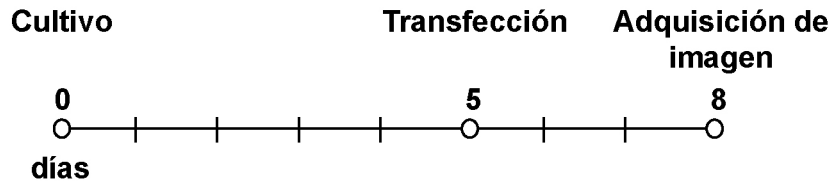
**6.6 Inmunofluorescencias.** Se obtuvieron rebanadas de 200  $\mu\text{m}$  de grosor de ratones posnatales de 7-10 días, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Las rebanadas fueron bloqueadas con suero de cabra 5% en PBS por una hora a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas se incubaron durante 12 horas a 4°C con anticuerpo anti-mGluR1 [1:100] o anti-mGluR5 [1:150] (Alomone labs, AGC-006 y AGC-007 respectivamente), anti-GluN2A [1:100] o anti-GluN2B [1:150] (Alomone labs, AGC-002 y AGC-003). Posteriormente se incubó durante dos horas con el anticuerpo secundario anti-rabbit Alexa 488 [1:500] (Invitrogen, A11034), diluido en PBS con suero de cabra al 5%. Las rebanadas finalmente se montaron con Vecta Shield (Vector Laboratories) y se adquirieron imágenes en microscopio confocal LSM 710 (Zeiss), con un objetivo 63x, inmersión de agua, 1.0 AN, 2.4 mm distancia de trabajo, láseres 488nm, 594 nm, utilizando 1.0 Airy unit, a 1024 x 1024 píxeles.

**6.7 Análisis de volumen en espinas dendríticas.** El volumen de las espinas se determinó con un plugin SpineS de MatLab (Erdil et al., 2012; Ghani et al., 2017), el cual usa una detección semi-automatizada, con una alineación automática y segmentación de la cabeza de las espinas. De esta forma el volumen de las espinas fue calculado sumando la intensidad de la fluorescencia, y normalizando a la intensidad de fluorescencia de la dendrita parental, esto para ajustar los niveles de fluorescencia dentro de la neurona. Para todos los experimentos se analizaron las espinas estimuladas y las espinas contiguas, entre 6-12 para cada experimento. La normalización del volumen de las espinas se determinó usando la media de los tiempos basales.

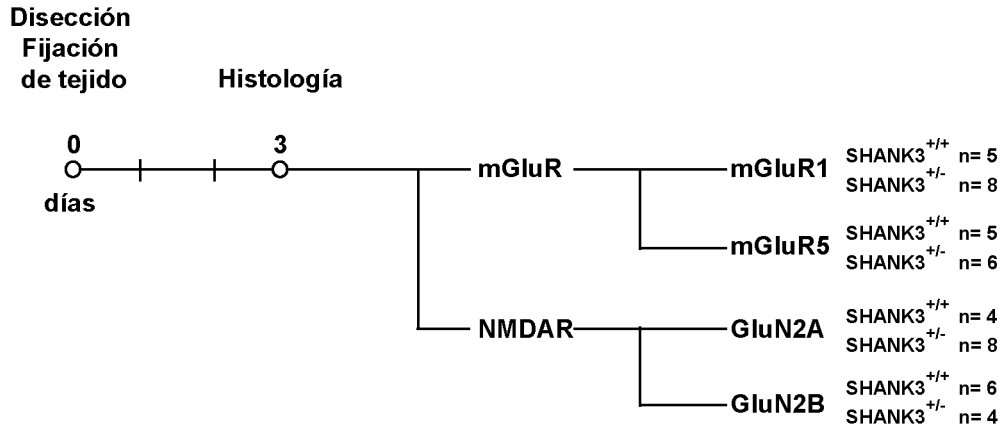
**6.8 Estadística.** Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media. Se utilizaron los siguientes análisis estadísticos: Prueba Mann-Whitney, Kurskall-wallis, análisis de varianza, post hoc Tuckey y Dunns's. Valor de  $p < 0.05$  para considerar estadísticamente significativo.



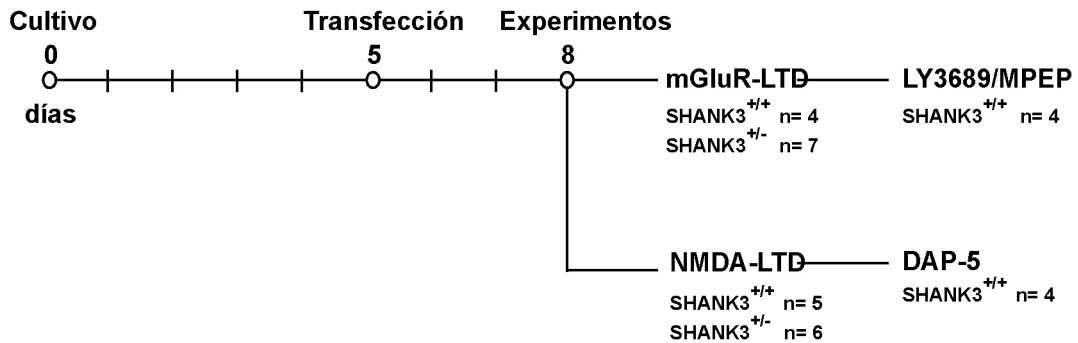
**a Imagenología de espinas dendríticas en neuronas piramidales**



**b Expresión de receptores NMDA y mGlu**



**c Experimentos de liberación de glutamato enjaulado**



**Figura 12. Diagrama del diseño experimental y número de experimentos. a)** Imagenología de espinas dendríticas en neuronas piramidales **b)** Expresión de receptores NMDA y mGlu **c)** Experimentos de liberación de glutamato enjaulado.

## 7. Resultados

### 7.1 Disminución en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratones SHANK3.

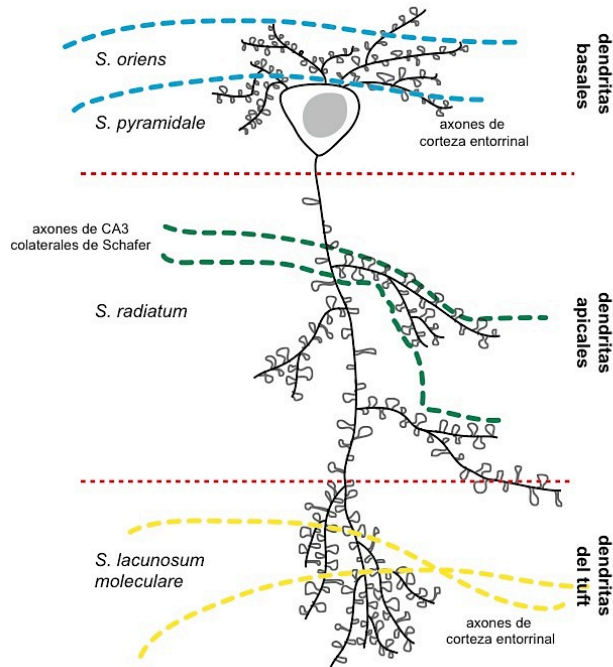
La estructura de las espinas dendríticas o su densidad se ve afectada en ciertos desórdenes del neurodesarrollo, debido a las alteraciones moleculares. Por lo tanto, nosotros evaluamos la densidad de las espinas dendríticas y su morfología para determinar si la haploinsuficiencia de Shank3 tiene consecuencias estructurales.

Las neuronas fueron transfectadas balísticamente para expresar la proteína verde fluorescente (GFP). Se realizaron imágenes de neuronas vivas de rebanadas de cultivos organotípicos con microscopía de excitación de dos fotones (LSM710 Zeiss). Se adquirieron imágenes de proyecciones en Z de dendritas secundarias o terciarias de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, en los estratos *Stratum oriens* y *Stratum pyramidale* (dendritas basales), *Stratum radiatum* (dendritas apicales) y *Stratum lacunosum moleculare* (dendritas del “tuft”) (Fig. 13).

Las espinas se clasificaron morfológicamente en cuatro tipos de acuerdo a la literatura de Rochefort y colaboradores (Rochefort and Konnerth, 2012), las cuales son el tipo hongo, tipo stubby, delgadas y filopodia (Fig. 5).

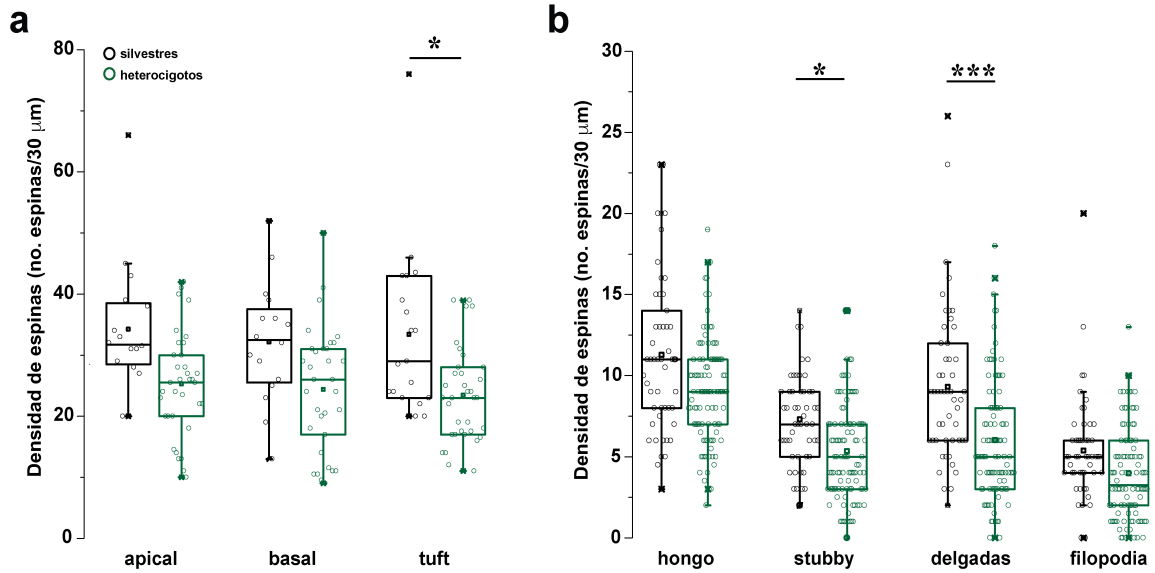
Sabiendo que las neuronas de la región CA1 del hipocampo son inervadas por diferentes regiones, realizamos una cuantificación de la densidad de espinas basada en los diferentes estratos del árbol dendrítico. De estos datos observamos que la región del tuft tiene menor densidad de espinas en neuronas de ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>) en comparación con las neuronas de ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>). Por otro lado, en la región basal y apical parece haber una tendencia a la baja en la densidad, sin embargo no fue significativo (Fig. 14a).

### Arbol dendrítico de neurona piramidal CA1



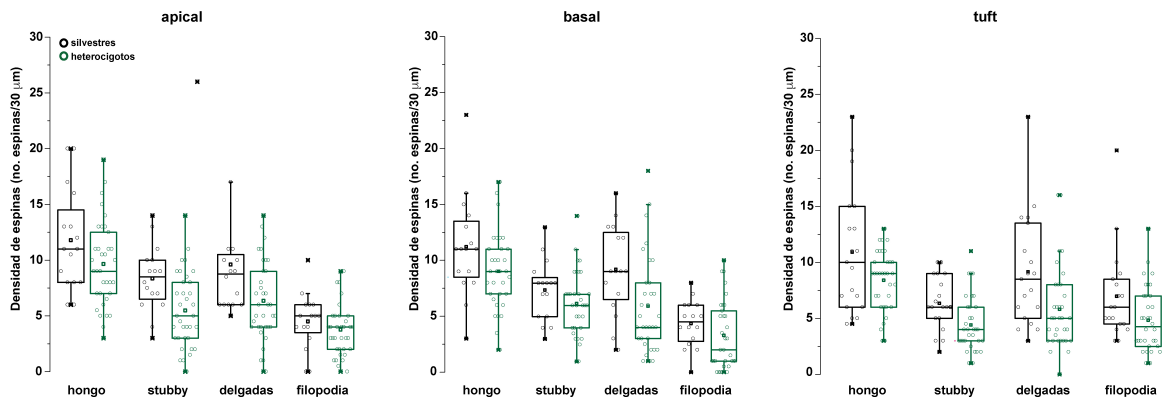
**Figura 13.** Esquema de los diferentes estratos del árbol dendrítico de una neurona piramidal de la región CA1 del hipocampo. En el esquema se muestra como los diferentes estratos reciben conexiones de diferentes áreas como de la corteza entorrinal y de la región CA3 a través de las fibras colaterales de Schaffer.

Respecto a la clasificación morfológica de las espinas, encontramos que hay una disminución en el número de espinas tipo delgada y tipo “stubby” en ratones heterocigotos en comparación con las neuronas de ratones silvestres. Las espinas de tipo hongo y filopodia presentaron una tendencia a la baja; sin embargo no fueron significativamente diferentes a las neuronas de ratones silvestres (Fig. 14b).



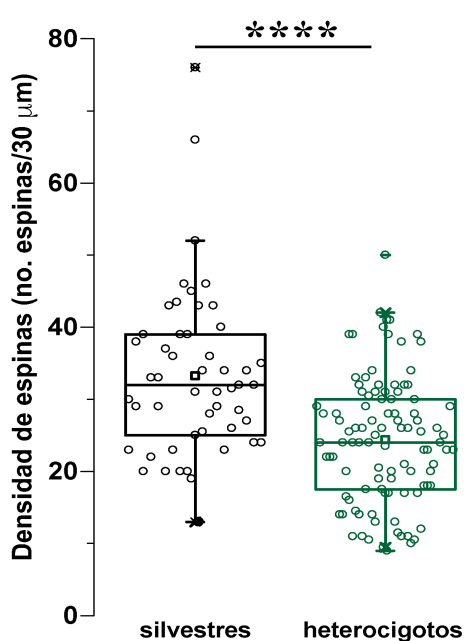
**Figura 14.** La haploinsuficiencia de SHANK3 disminuye la densidad de espinas en la región del tuft y disminuye las espinas tipo stubby y delgadas en neuronas piramidales. **a)** Cuantificación de espinas dendríticas por estrato del árbol dendrítico. **b)** Cuantificación de las espinas dendríticas por categoría morfológica: tipo hongo, tipo “stubby”, tipo delgada y tipo filopodia, en neuronas piramidales de CA1.  $n=5$  (SHANK3<sup>+/+</sup>),  $n=9$  (SHANK3<sup>+/-</sup>). Las barras representan la media  $\pm$  E.S. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P = 0.001$ .

Además, cuantificamos la densidad de las espinas basado en la morfología y el estrato del árbol dendrítico. Al respecto, encontramos que no hay diferencia significativa entre ambos genotipos (Fig. 15).



**Figura 15.** Cuantificación de espinas dendríticas por morfología en cada uno de los estratos de neuronas piramidales de ratones SHANK3 no presentan cambios. Cuantificación de espinas dendríticas por morfología en dendritas apicales, dendritas basales y dendritas del tuft.  $n=5$  (SHANK3<sup>+/+</sup>),  $n=9$  (SHANK3<sup>+/-</sup>). Las barras representan la media  $\pm$  E.S.

Finalmente, cuantificamos el número de espinas totales por genotipo. Observamos que la densidad total de espinas dendríticas en neuronas de ratones heterocigotos es menor respecto a ratones silvestres (Fig. 16). Estos datos muestran que la haploinsuficiencia de Shank3 disminuye la densidad de espinas dendríticas en la región de CA1, específicamente espinas tipo stubby y delgadas.



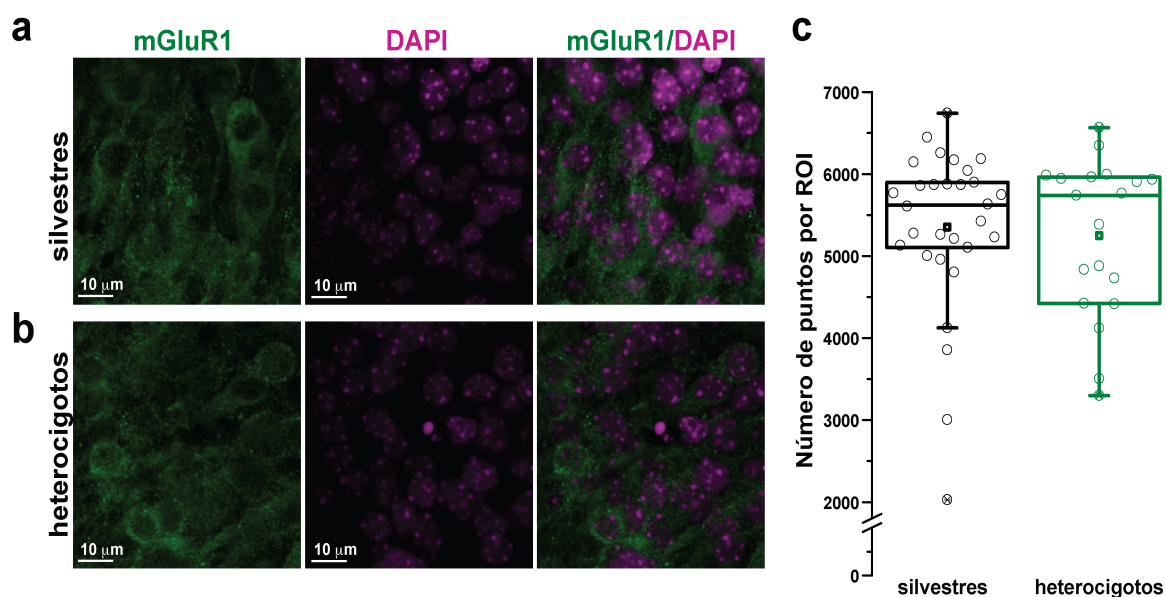
**Figura 16. La haploinsuficiencia SHANK3 causa una disminución en la densidad poblacional de espinas dendríticas.** Cuantificación de espinas dendríticas en regiones de 30  $\mu\text{m}$  en neuronas positivas a GFP. Las barras representan la media  $\pm$  E.S. \*\*\* $P < 0.001$ .

## 7.2. Expresión de los receptores mGluRs en neuronas de ratones SHANK3.

Como se mencionó en la introducción, la proteína SHANK3 tiene dominios de unión a receptores glutamatérgicos, como mGlu y NMDA. Conociendo la importancia de estos receptores en la respuesta sináptica, nosotros evaluamos la expresión de estos receptores para determinar si la haploinsuficiencia de Shank3 altera su expresión.

Para evaluar la expresión del grupo I de los receptores metabotrópicos, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para los receptores mGluR1 y mGluR5. Se

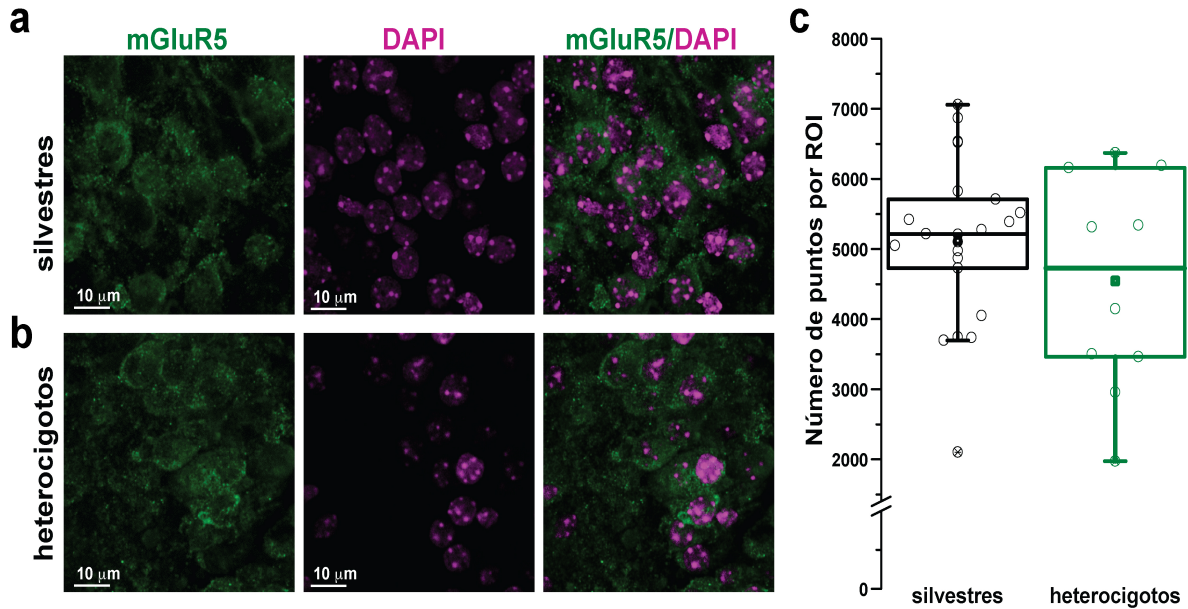
obtuvieron imágenes confocales en la región CA1 del hipocampo de rebanadas de cultivos organotípicos. El análisis se realizó convirtiendo las imágenes de confocal a imágenes binarias a través del software Image J, las imágenes obtenidas se analizaron mediante la función “detector de puntos” del programa Icy (de Chaumont et al., 2012).



**Figura 17. La haploinsuficiencia de SHANK3 no altera la expresión de mGluR1. a, b)** Micrografía confocal de un ROI de la región CA1 del hipocampo positiva para mGluR1 (verde) y DAPI (magenta) de rebanada de hipocampo de ratones silvestres ( $SHANK3^{+/+}$ ) y ratones heterocigotos ( $SHANK3^{+/-}$ ) respectivamente. **c)** Cuantificación de la expresión de los receptores mGluR1.  $n=5$  ( $SHANK3^{+/+}$ ),  $n=8$  ( $SHANK3^{+/-}$ ). Las barras representan la media  $\pm$  E.S.

Nuestros resultados muestran que la expresión del receptor mGluR1 y mGluR5 no se ven alteradas en neuronas de ratones heterocigotos con respecto a las neuronas de ratones silvestres (Fig. 17, 18)

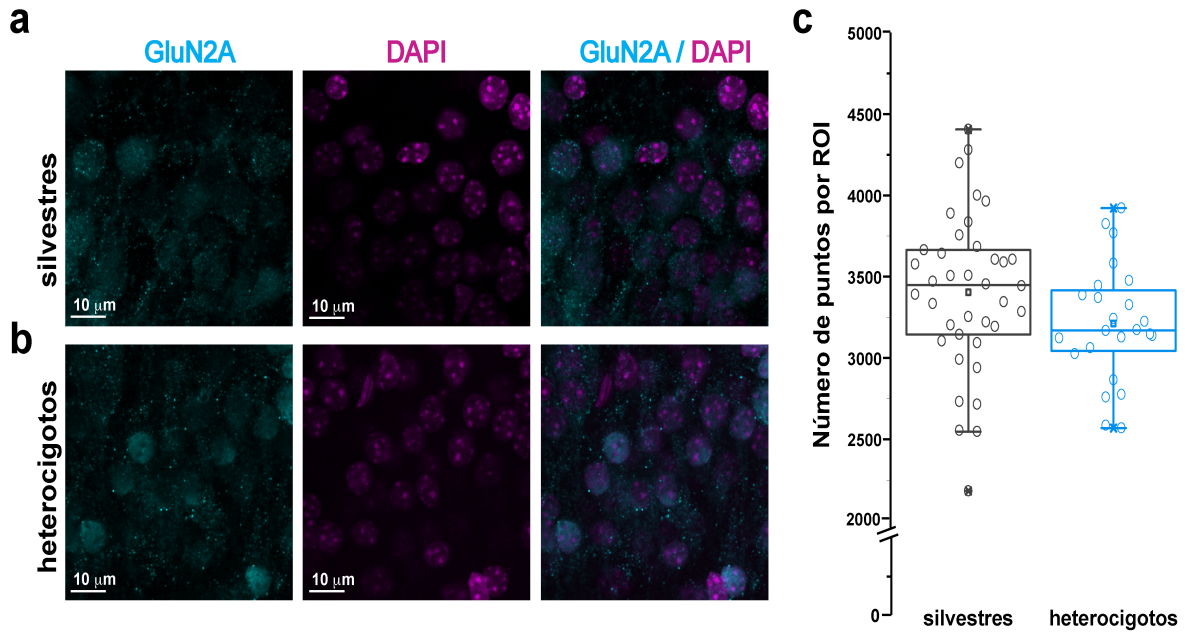
Estos datos muestran que la ausencia de la proteína SHANK3 no altera la expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I en la región de CA1 del hipocampo en neuronas piramidales.



**Figura 18. La haploinsuficiencia de SHANK3 no altera la expresión de mGluR5. a, b )** Micrografía confocal de un ROI de la región CA1 del hipocampo positiva para mGluR1 (verde) y DAPI (magenta) de rebanada de hipocampo de ratones silvestres ( $SHANK3^{+/+}$ ) y ratones haploinsuficientes ( $SHANK3^{+/-}$ ) respectivamente. **c)** Cuantificación de los receptores mGluR5 en CA1.  $n=5$  ( $SHANK3^{+/+}$ ),  $n=6$  ( $SHANK3^{+/-}$ ). Las barras representan la media  $\pm$  E.S.

### 7.3 Expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B de los receptores NMDA en neuronas de ratones SHANK3.

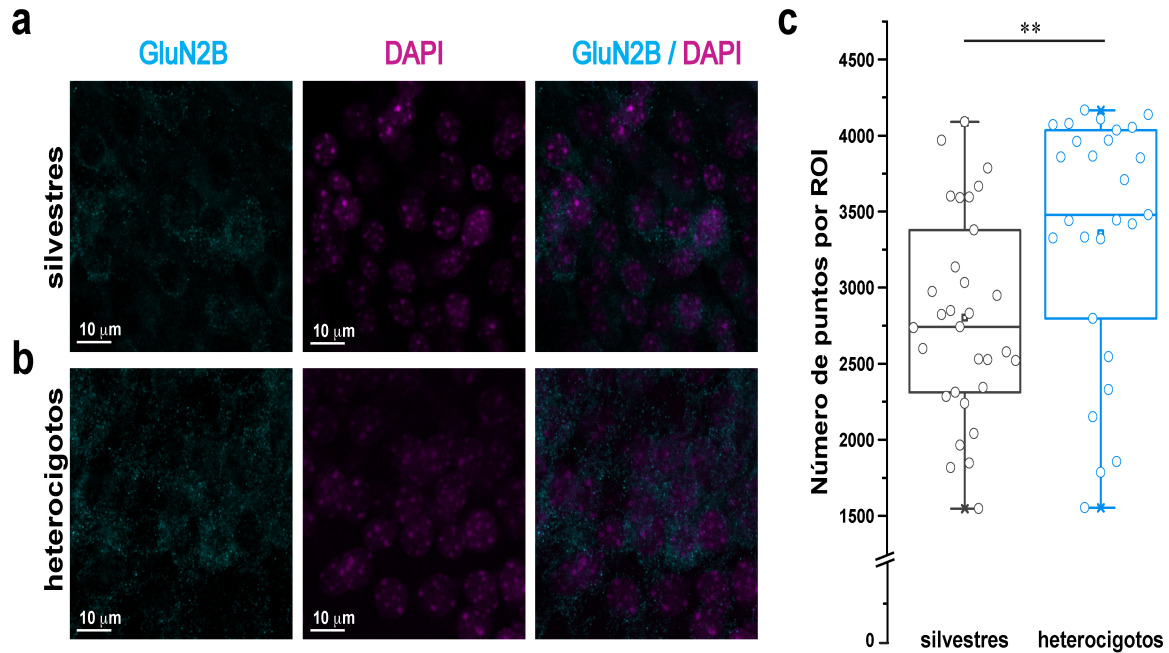
Se evaluó de la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B de los receptores NMDA a través de inmunofluorescencias. El análisis se realizó convirtiendo las imágenes de confocal a imágenes binarias a través del software Image J, las imágenes obtenidas se analizaron mediante la función “detector de puntos” del programa Icy (de Chaumont et al., 2012). Nuestros resultados muestran que la expresión de la subunidad GluN2A no se ve alterada en neuronas de ratones heterocigotos en comparación a ratones silvestres (Fig. 19).



**Figura 19.** En neuronas de ratones **SHANK3** no existen cambios en la expresión de de la subunidad **GluN2A**. **a, b)** Micrografía confocal de un ROI de la región CA1 del hipocampo positiva para GluN2A (cian) y DAPI (magenta) de rebanada de hipocampo de ratones silvestres ( $SHANK3^{+/+}$ ) y ratones heterocigotos ( $SHANK3^{+/-}$ ) respectivamente. **c)** Cuantificación de la subunidad GluN2A en CA1.  $n=4$  ( $SHANK3^{+/+}$ ),  $n=8$  ( $SHANK3^{+/-}$ ). Las barras representan la media  $\pm$  E.S.

Además cuantificamos la expresión de la subunidad GluN2B e interesantemente observamos que la expresión de esta subunidad se encuentra aumentada en neuronas de ratones heterocigotos en comparación de los ratones silvestres (Fig. 20). Estos datos muestran que la ausencia de la proteína SHANK3 altera la expresión de las subunidad GluN2B en la región de CA1 del hipocampo en neuronas piramidales.





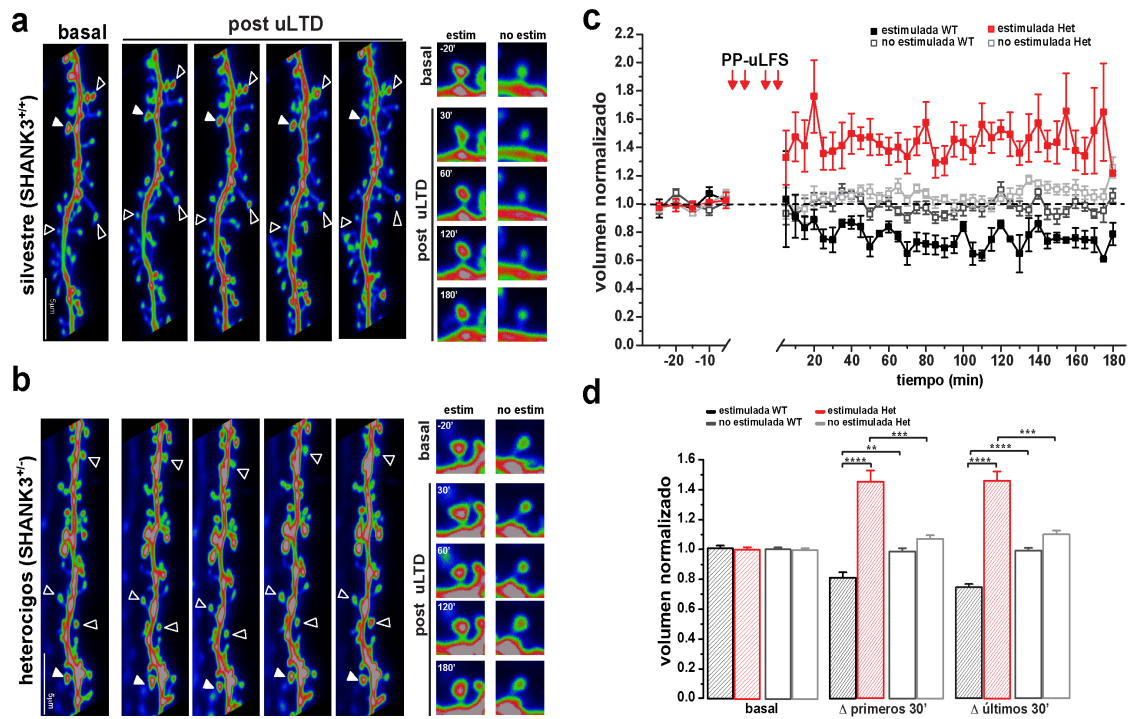
**Figura 20.** En neuronas de ratones **SHANK3** presentan una disminución en la expresión de de la subunidad **GluN2B**. **a, b)** Micrografía confocal de un ROI de la región CA1 del hipocampo positiva para GluN2B (cian) y DAPI (magenta) de rebanada de hipocampo de ratones silvestres (SAHnk3<sup>+/+</sup>) y ratones haploinsuficientes (SHANK3<sup>+/-</sup>) respectivamente. **c)** Cuantificación de la subunidad GluN2B en CA1. n=6 (SHANK3<sup>+/+</sup>), n=4 (SAHnk3<sup>+/-</sup>). Las barras representan la media ± E.S., \*\* P<0.01.

#### 7.4 Inducción de mGluR-LTD en espinas dendríticas individuales mediante fotoactivación de glutamato enjaulado.

Se sabe que la haploinsuficiencia de Shank3 altera la LTP, pero no la LTD (Bozdagi et al., 2010). Sin embargo, estos estudios se realizaron con estimulaciones eléctricas poblacionales, que no reflejan la respuesta de las sinapsis individuales, las cuales sabemos son compartimentos eléctricos y computacionales que individualmente participan en la integración sináptica, y se modifican en respuesta a la actividad y el aprendizaje (Poirazi and Mel, 2001, Losonczy et al., 2008, Roberts et al., 2010).

Por lo tanto, nosotros evaluamos la depresión sináptica de largo plazo (LTD) en espinas individuales mediada por receptores metabotrópicos de glutamato. Utilizamos el protocolo de pares de pulsos de luz a baja frecuencia (descrito en la Metodología) (Ramiro-Cortes, en proceso) para la liberación de glutamato enjaulado en espinas

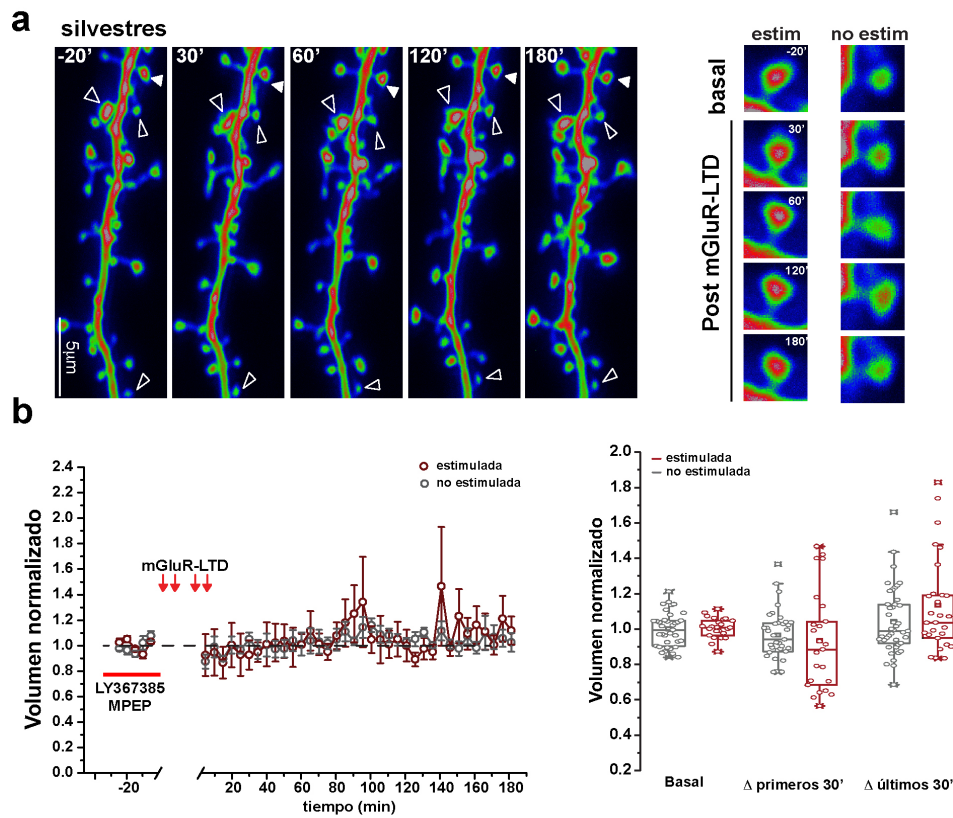
individuales. Determinamos que las espinas estimuladas de ratones heterocigotos no disminuyen su volumen en respuesta a LTD mediado por receptores mGlu, como ocurre en espinas de ratones silvestres, las cuales disminuyen su volumen en respuesta a mGluR-LTD. Por el contrario, aumentan su volumen, sugiriendo una respuesta potenciada. Para ambos genotipos las espinas controles, que no recibieron estimulación no presentan cambios significativos en el volumen (Fig.21).



**Figura 21. La inducción de mGluR-LTD en espinas dendríticas individuales en ratones SHANK3 induce potenciación sináptica.** **a,b)** Izquierda, proyecciones en Z de imágenes con microscopía de excitación de dos fotones de dendritas y de espinas de ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>) y ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>). Las flechas blancas indican las espinas estimuladas con el protocolo uPP-LFS, las flechas vacías muestran las espinas no estimuladas. **c)** Curso temporal del cambio en el volumen de espinas estimuladas y espinas no estimuladas. **d)** Cuantificación del volumen durante los primeros 30 minutos y en los últimos 30 minutos posteriores a la estimulación. n=4 (SHANK3<sup>+/+</sup>), n=7 (SAHNK3<sup>+/-</sup>). Las barras representan la media± E.S., \* P<0.05 \*\*\* P<0.001.

## 7.5 Especificidad del protocolo para mGluR-LTD.

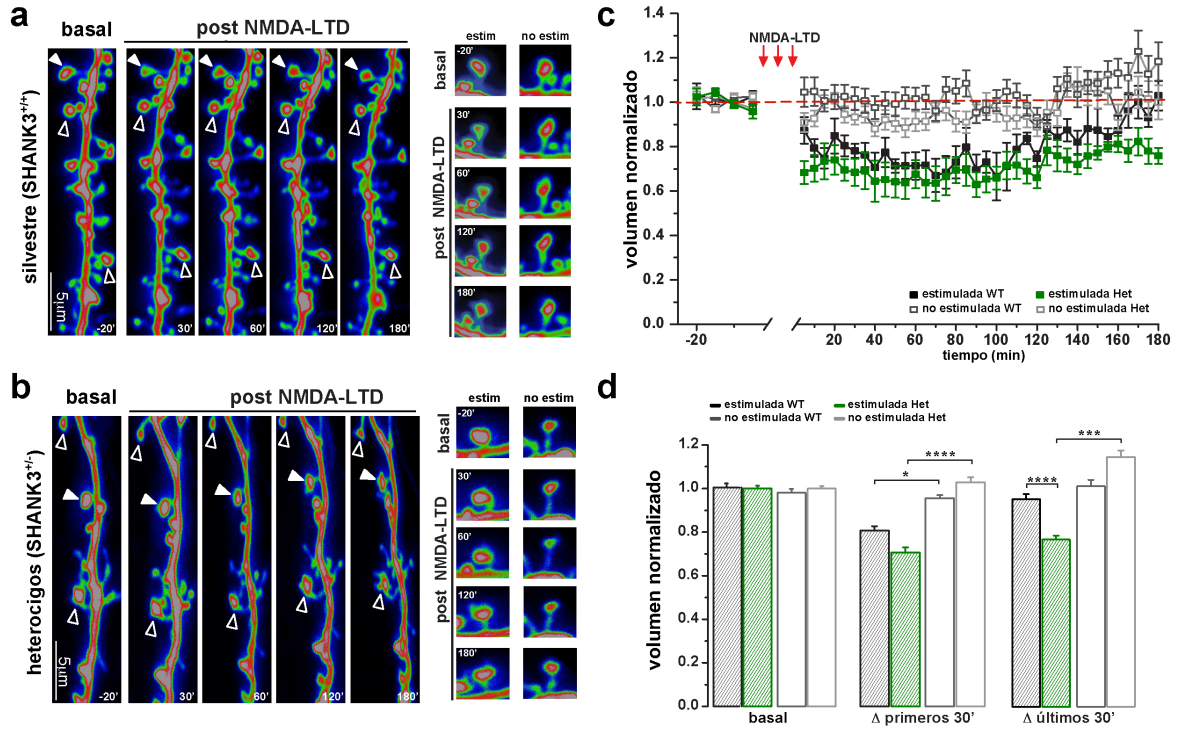
Con la finalidad de corroborar la especificidad del protocolo de inducción de mGluR-LTD, se realizaron experimentos de estimulación en presencia de los antagonistas de receptores metabotrópicos de glutamato 1 y 5 (LY367385 y MPEP respectivamente) en neuronas de ratones silvestres. Nuestros resultados muestran que al estimular una espina con el protocolo mGluR-LTD en presencia de los antagonistas, no se observó una disminución en el volumen de la espina, como ocurre en ausencia de los antagonistas. Esto confirma que el protocolo mGluR-LTD es específico. Las espinas controles no presentan cambios significativos en el volumen (Fig.22).



**Figura 22. El protocolo de pares de pulsos de luz a baja frecuencia induce LTD dependiente de receptores mGlu.** **a)** Proyecciones en Z de imágenes con microscopía de excitación de dos fotones de dendritas, y de una espina representativa estimulada de ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>). La flecha blanca indica la espina estimulada con el protocolo mGluR-LTD flechas vacías muestran las espinas que no fueron estimuladas. **b)** Curso temporal del cambio en el volumen de espinas estimuladas y espinas no estimuladas (panel izquierdo), cuantificación del volumen durante los primeros 30 minutos y en los últimos 30 minutos posteriores a la estimulación (panel derecho). n=4 (SHANK3<sup>+/+</sup>). Las barras representan la media ± E.S.

## **7.6 Inducción de NMDA-LTD en espinas dendríticas individuales mediante foto-activación de glutamato enjaulado.**

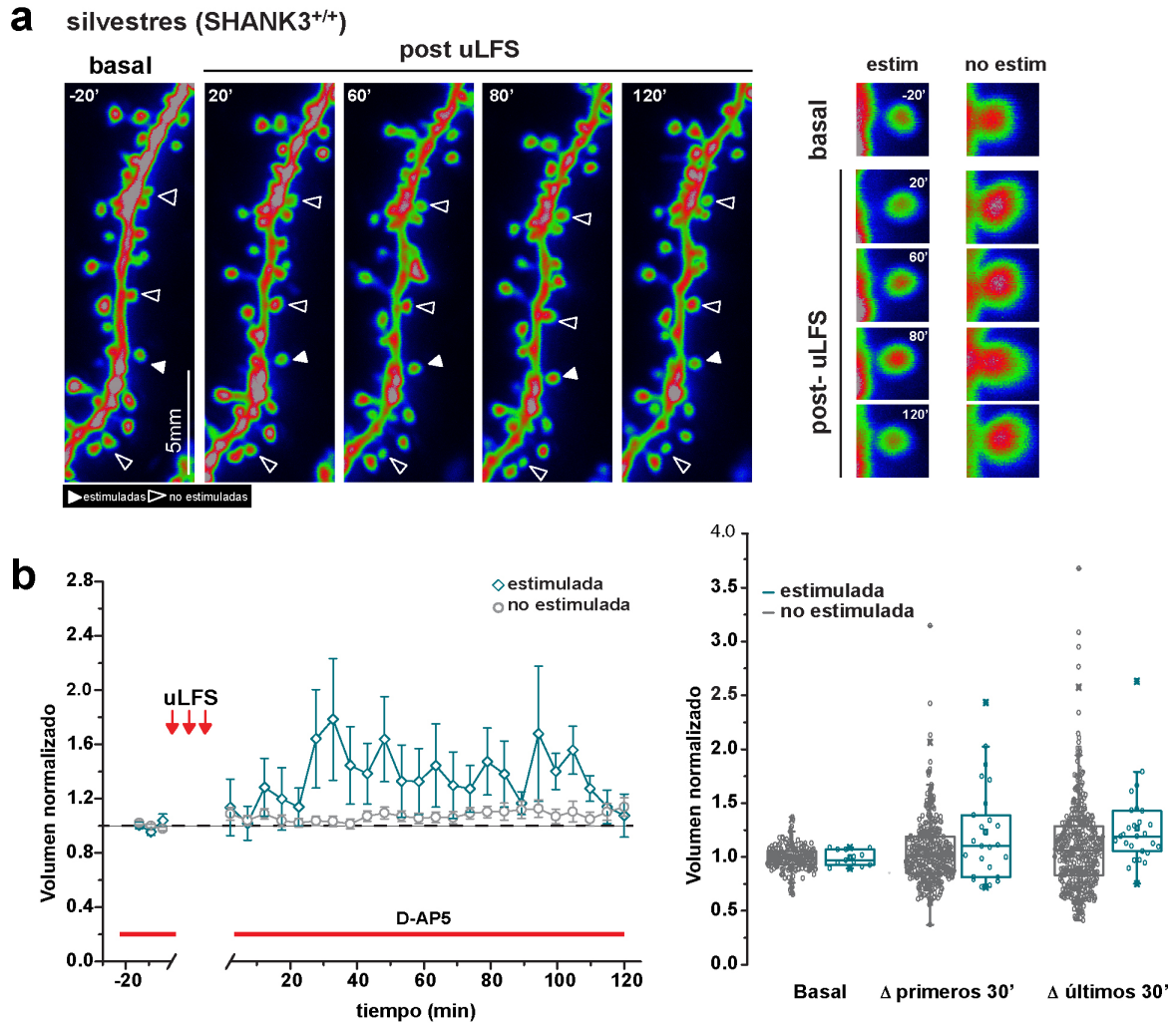
Para la inducción de LTD mediado por receptores NMDA, diseñamos un nuevo protocolo de estimulación basado en el protocolo de estimulación eléctrica, pero adaptado para la liberación de glutamato enjaulado mediante microscopia de dos fotones basado en otros protocolos (Holbro et al., 2009). Interesantemente, observamos que las espinas estimuladas de ratones heterocigotos responden con una disminución en su volumen, similar a como ocurre en las espinas de ratones silvestres. Sin embargo, cabe hacer notar que las espinas de ratones heterocigotos presentan depresión de largo plazo, pues se mantienen deprimidas durante las tres horas de registro, mientras que las espinas de ratones silvestres regresan a su nivel basal pasadas dos horas posterior a la estimulación, considerando esta respuesta como LTD de corto plazo. Por otro lado, las espinas controles que no recibieron estimulación, no presentaron cambios en su volumen (Fig.23). Estos datos demuestran por primera vez, que la depresión sináptica mediada por receptores NMDA es de largo plazo en espinas de ratones haploinsuficientes de Shank3.



**Figura 23. La inducción de NMDA-LTD en espinas dendríticas individuales en ratones SHANK3 induce LTD de largo plazo. a,b)** Izquierda, proyecciones en Z de imágenes con microscopía de excitación de dos fotones de dendritas y de espinas estimuladas en ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>) y ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>). Las flechas blancas indican las espinas estimuladas con el protocolo uLFS, las flechas vacías muestran las espinas que no fueron estimuladas. **c)** Curso temporal del cambio en el volumen de espinas estimuladas y espinas no estimuladas. **d)** Cuantificación del volumen durante los primeros 30 minutos y en los últimos 30 minutos posteriores a la estimulación. n=5 (SHANK3<sup>+/+</sup>), n=6 (SAHNK3<sup>+/-</sup>). Las barras representan la media ± E.S., \* P<0.05 \*\*\* P<0.001.

### 7.7 Especificidad del protocolo NMDA-LTD.

Para confirmar la especificidad de nuestro protocolo de inducción de NMDA-LTD se realizaron experimentos de estimulación en presencia del antagonista de receptores NMDA (D-AP5) en neuronas de ratones silvestres. Encontramos que en presencia D-AP5, no ocurre la disminución en el volumen de las espinas estimuladas inducido con el protocolo NMDA-LTD. Por lo tanto, estos datos sugieren que el protocolo usado para inducir LTD mediado por NMDA es específico (Fig. 24).



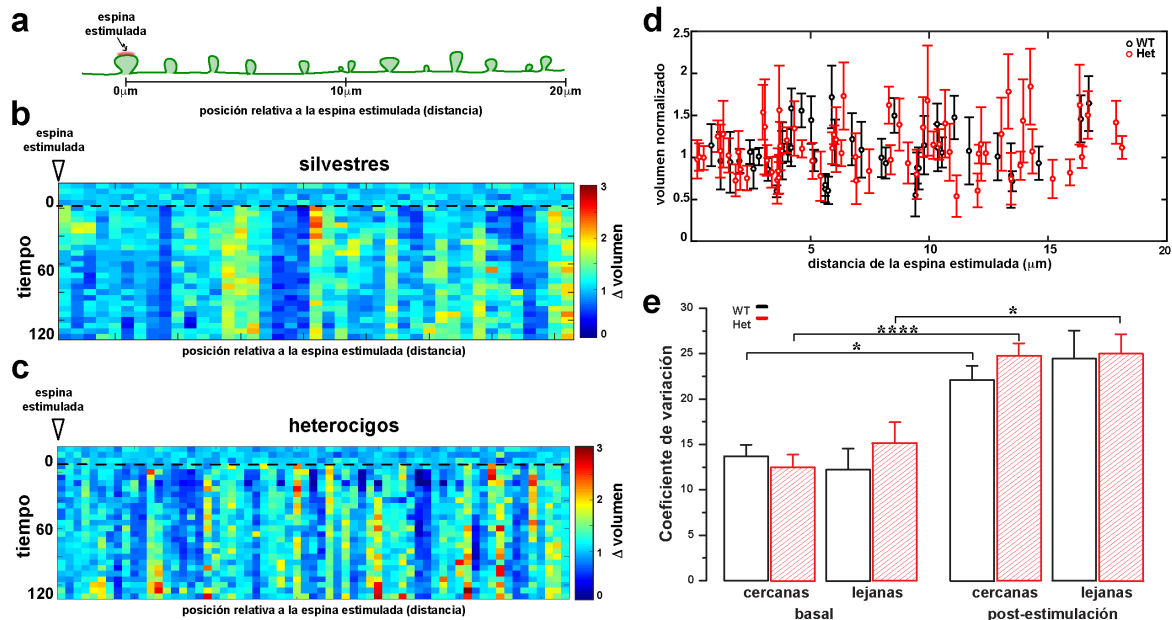
### 7.8 Variabilidad del volumen de las espinas control relativo a la distancia de la espina estimulada.

Por otra parte considerando que la plasticidad sináptica de largo plazo promueve la síntesis proteica local, lo que a su vez promueve la interacción entre espinas cercanas dentro de un mismo dominio dendrítico (Harvey and Svoboda, 2007, Govindarajan et al.,

2011, Oh et al., 2015). Nosotros evaluamos la influencia de la respuesta sináptica en las espinas control que no fueron estimuladas, con la finalidad de dilucidar el posible efecto de la síntesis de proteínas inducida por la depresión sináptica en neuronas de ratones SHANK3.

Por consiguiente, analizamos la dinámica del cambio en el volumen de las espinas control relativo a la espina estimulada, categorizándolas en espinas cercanas (0-10  $\mu\text{m}$ ) y lejanas (10-20  $\mu\text{m}$ ) durante dos horas posteriores a la estimulación.

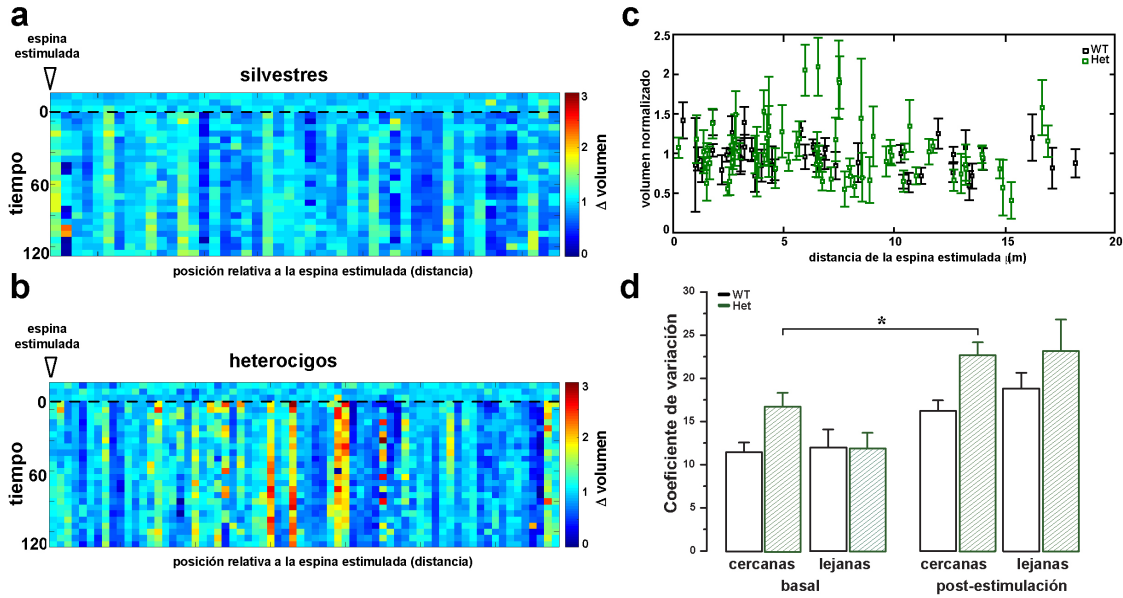
Al respecto, observamos que tanto las espinas de ratones silvestres como heterocigotos incrementan su variabilidad en el volumen posterior a la estimulación con mGluR-LTD (Fig. 25a,b). Además las espinas cercanas de ratones heterocigotos tienen una tendencia al incrementar su coeficiente de variación respecto a los silvestres, sin embargo no llega a ser significativo. Estos datos sugieren que la síntesis de proteínas que ocurre con el protocolo de mGluR-LTD influye volumen de las espinas cercanas (0-10 $\mu\text{m}$ ) de la espina que fue estimulada en ambos genotipos (Fig. 25).



**Figura 25. Dinámica de espinas dendríticas en experimentos de mGluR-LTD.** **a)** esquema que representa la posición relativa de las espinas a partir de la espina estimulada. **b,c)** Diagrama de color que representa el cambio en el volumen a lo largo del tiempo y a la distancia relativa a la espina estimulada en ratones silvestres y ratones heterocigotos. Las flechas indican la posición de las espinas estimuladas con el protocolo mGluR-LTD. **d)** Gráfica de dispersión del volumen de las espinas no estimuladas respecto a la distancia de la espina estimulada durante 120 minutos posteriores a la estimulación. **e)** Coeficiente de variación del volumen de las espinas cercanas (0-10 $\mu$ m) y lejanas (10-20 $\mu$ m) respecto a la espina estimulada. n=4 (SHANK3<sup>+/+</sup>), n=7 (SAHnk3<sup>+/-</sup>). Las barras representan la media $\pm$  E.S. \*\*\*\* P <0.0001 \* P<0.05.

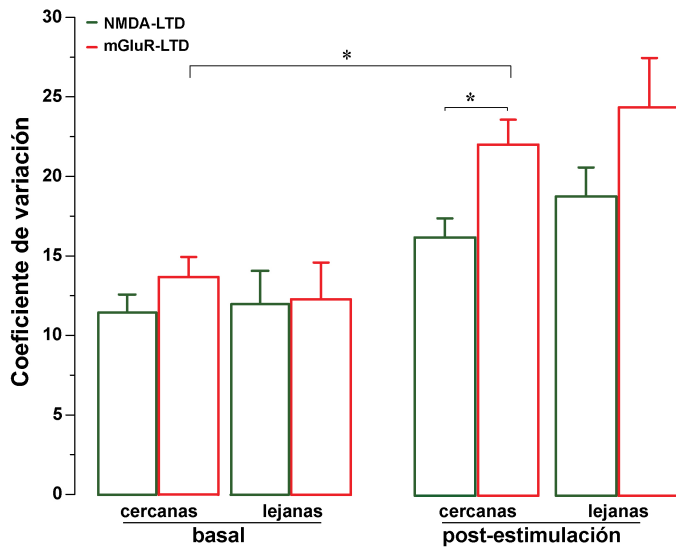
Al igual que en mGluR-LTD, evaluamos la influencia de la inducción de NMDA-LTD en las espinas control que no fueron estimuladas. De manera muy interesante observamos que sólo las espinas cercanas de ratones heterocigotos incrementan su variación respecto su basal y respecto a los ratones silvestres (Fig. 26).





**Figura 26. Dinámica de espinas dendríticas en experimentos de NMDA-LTD. a,b)** Diagrama de color que representa el cambio en el volumen a lo largo del tiempo y la distancia relativa a las espinas estimuladas en ratones silvestres y heterocigotos. Las flechas indican la posición de las espinas estimuladas con el protocolo NMDA-LTD. **c)** Diagrama de dispersión del volumen de las espinas no estimuladas respecto a la distancia de la espina estimulada durante 120 minutos de experimento. **d)** Coeficiente de variación del volumen de las espinas cercanas (0-10 $\mu$ m) y lejanas (10-20 $\mu$ m) respecto a la espina estimulada.  $n=5$  (SHANK3<sup>+/+</sup>),  $n=6$  (SHANK3<sup>+/-</sup>). Las barras representan la media  $\pm$  E.S. \*  $P < 0.05$ .

Por otra parte, de nuestros datos determinamos que el protocolo de mGluR-LTD induce una respuesta de largo plazo, mientras que el protocolo de NMDA-LTD induce una respuesta de corto plazo, esto sugiere la posible participación de la síntesis proteica en el protocolo de LTD mediado por receptores mGlu. Por lo tanto, comparamos los protocolos mGluR-LTD y NMDA-LTD en espinas de ratones silvestres, observamos un aumento en la variabilidad de las espinas cercanas para el protocolo de mGluR-LTD, en comparación al protocolo de NMDA (Fig. 27). Esto sugiere que la disponibilidad de proteínas dentro de un dominio dendrítico influye en la variabilidad de las espinas cercanas en los procesos de largo plazo.



**Figura 27. Dinámica de espinas dendríticas en experimentos de NMDA-LTD y mGluR-LTD.** Coeficiente de variación del volumen de las espinas cercanas (0-10 $\mu$ m) y lejanas (10-20 $\mu$ m) respecto a la espina estimulada en experimentos de NMDA-LTD y mGluR-LTD de ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>) n=4 (NMDA-LTD), n=5 (mGluR-LTD). Las barras representan la media  $\pm$  E.S. \* P<0.05).

## 8. Discusión

Se sabe que algunos trastornos de espectro autista son causados por alteraciones en el neurodesarrollo, dichas alteraciones ocurren principalmente en genes involucrados en la estructura y función sináptica (Zoghbi and Bear, 2012). Sin embargo, aún ***se desconoce si estas alteraciones están modificando la plasticidad sináptica y estructural***. En el presente trabajo, realizado en un modelo genético de autismo en ratones haploinsuficientes del genShank3, observamos que existe una disminución global en el número de espinas en ratones heterocigotos en comparación de ratones silvestres. También identificamos que existe un aumento en la expresión de la subunidad GluN2B del receptor NMDA. Finalmente observamos que no ocurre la depresión sináptica mediada por los receptores mGluR, incluso se observa una potenciación. Y que la depresión mediada por los receptores NMDA es de largo plazo. Esto demuestra que la haploinsuficiencia del gen Shank3 altera la plasticidad sináptica y sus correlatos estructurales.

Una adecuada espinogénesis y morfogénesis de las dendritas juega un rol fundamental en el establecimiento de los circuitos neuronales, por tal motivo ha sido de gran interés el estudiar la morfología de las neuronas en enfermedades del neurodesarrollo (Forrest et al., 2018). En nuestro modelo de autismo observamos una disminución en la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales. Esto correlaciona con modelos knockout del gen Shank3 (Peca et al., 2011, Kouser et al., 2013, Wang et al., 2016). Sin embargo, cabe recalcar que nuestro modelo presenta una haploinsuficiencia, es decir, que cuenta con una copia funcional del gen. Esto podría tener como resultado algún efecto compensatorio que impida tener efectos tan drásticos como en los ratones knockout.

Las neuronas piramidales de la región de CA1 del hipocampo cuentan con un árbol dendrítico dividido en tres regiones. Cada región recibe proyecciones diferentes, en la región basal y del “tuft” se reciben entradas provenientes de la corteza entorrinal y

la región apical recibe entradas directas del área CA3 del hipocampo (Andersen, 2007). Se ha demostrado que la proporción de sinapsis incrementa en función a la distancia del soma (Nicholson et al., 2006), y que el mayor número de entradas en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo se da en las dendritas del “tuft” (Megias et al., 2001). Partiendo de la premisa que la actividad puede modificar la estructura, se cuantificó el número de espinas en cada región del árbol dendrítico, se observó que únicamente hay una disminución en la densidad de espinas en la región del tuft. Esto podría sugerir que existe una disminución en las entradas sinápticas provenientes de la corteza entorrinal, se sabe que las entradas del “tuft” cumplen un papel modulador en la excitabilidad dendrítica y en la integración sináptica (Spruston, 2008), lo cual podría desembocar en una manera de integración sináptica diferente en estos ratones.

Al analizar las espinas por su morfología, observamos una disminución en la densidad de las espinas tipo stubby y tipo delgadas en los ratones heterocigotos en comparación con los ratones silvestres, ambos tipos de espina se han descrito como espinas menos estables a través del tiempo y que cuentan con la capacidad de convertirse en espinas tipo hongo y formar sinapsis maduras (Knott et al., 2006). Hay que recalcar que nuestra preparación son cultivos organotípicos de ratones postnatales, es decir, que aún se encuentran en la etapa de maduración y poda de espinas dendríticas. Nuestras cuantificaciones son el reflejo de un proceso de poda sináptica y espinogénesis alterado; sin embargo nosotros desconocemos si en etapas adultas estas proporciones se mantienen. Por tal motivo se vuelve relevante hacer esta cuantificación por morfología en ratones adultos con el fin de observar si la disminución de espinas por estrato y morfología repercute en etapa adulta.

Evaluamos la expresión de expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1 y 5), pues SHANK3 tiene sitios de unión para receptores glutamatérgicos, y se sabe que la haploinsuficiencia de este gen promueve una disminución en la expresión de receptores AMPA (Bozdagi et al., 2010), y en ratones

knockout una disminución de la expresión de los receptores mGluR 1 y 5 (Kouser et al., 2013, Zhou et al., 2016). Contrario a lo esperado, no encontramos diferencias en la expresión de los receptores metabotrópicos en ambos genotipos, lo que nos indica que la haploinsuficiencia de Shank3 no es suficiente para alterar su expresión.

Respecto a la cuantificación de subunidades de los receptores NMDA observamos que GluN2A no presenta cambios entre genotipos; sin embargo, cuando analizamos GluN2B podemos apreciar un aumento en la expresión de esta subunidad. Como se describió previamente las propiedades de los receptores NMDA están determinadas por la composición de subunidades GluN2 (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). Los receptores NMDA presentan un intercambio de dichas subunidades en respuesta a la actividad y durante el desarrollo. Siendo en este último el intercambio de la subunidad GluN2B por GluN2A (Sheng et al., 1994, Erreger et al., 2005). Durante el desarrollo los receptores NMDA están compuestos predominantemente por la subunidad GluN2B, que se expresa de manera constitutiva. Al respecto, nuestros datos muestran que la haploinsuficiencia del gen Shank3 conlleva un aumento en la cantidad de la subunidad GluN2B de receptores NMDA expuestos en la membrana plasmática. Esto puede deberse a la alteración del intercambio de subunidades GluN2A y GluN2B que involucra un proceso mediado principalmente por las proteínas SAP-102 y PSD-95, de la cual PSD-95 se acopla directamente a la proteína SHANK3 (Beique et al., 2006, Dupuis et al., 2014).

A pesar del desarrollo de diferentes modelos animales de SHANK3, se desconoce cómo es la respuesta sináptica y sus correlatos estructurales. Sólo se ha reportado que en ratones heterocigotos SHANK3 la LTP esta disminuida, pero no se detectan cambios en la depresión sináptica con experimentos de estimulación eléctrica de campo (Bozdagi et al., 2010). Por lo tanto, en este proyecto realizamos experimentos funcionales induciendo la depresión sináptica mediada por receptores metabotrópicos (mGluR-LTD) y NMDA (NMDA-LTD) en espinas dendríticas individuales de neuronas piramidales hipocampales.

Nuestros resultados muestran por primera vez que la depresión sináptica mediada por receptores mGlu, no se puede inducir en espinas de ratones heterocigotos SHANK3, como ocurre en espinas de ratones silvestres de nuestra cepa y de otras cepas (Holbro et al., 2009). De manera sorprendente, observamos que el protocolo de inducción de mGluR-LTD (uPP-LFS) promueve un incremento en el volumen de las espinas estimuladas, lo que sugiere promueve una potenciación.

Esta potenciación puede ser el resultado del incremento en la expresión de la subunidad GluN2B del receptor NMDA, que observamos en ratones heterocigotos SHANK3. Uno de los elementos más importantes para facilitar la LTP es la composición de los receptores NMDA, la subunidad GluN2B facilita la inducción de LTP debido a que tiene una cinética de apertura mayor en comparación de la subunidad GluN2A, lo que se traduce en mayor entrada de calcio (Gardoni et al., 2009). Al respecto, se sabe que para la inducción de la potenciación sináptica es necesaria una concentración elevada de calcio, mientras que para la depresión sináptica se requiere una menor concentración de calcio (Kopp et al., 2006, Yashiro and Philpot, 2008). Esto sugiere que el intercambio de subunidades es una forma de metaplasticidad que altera los umbrales que permiten direccionar la plasticidad sináptica mediada por receptores NMDA, lo que permite la bidireccionalidad en la respuesta sináptica dependiendo de la actividad que reciban las sinapsis (Quinlan et al., 1999, Dumas, 2005, Yashiro and Philpot, 2008, Gray et al., 2011).

Además, se sabe que mGluR-LTD promueve la síntesis de proteínas (Huber et al., 2000, Huber et al., 2001) y activa la vía de la fosfolipasa C (PLC), esto favorece la liberación de calcio intracelular del retículo endoplásmico. Cabe mencionar que esta vía se encuentra hiperactiva durante las primeras semanas postnatales (Catania et al., 1991, Catania et al., 2007). De tal manera que una mayor entrada de calcio dada por el número de receptores NMDA, y el aumento de calcio intracelular por la activación de receptores mGlu, sea capaz de sobrepasar el umbral de calcio y favorecer la potenciación sináptica

(Gardoni et al., 2009, Halt et al., 2012, Lisman et al., 2012). Sin embargo, para poder corroborar dicha hipótesis debemos realizar experimentos en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas, así como de antagonistas de receptores mGluR y NMDA.

Para evaluar la depresión sináptica mediada por receptores NMDA diseñamos un protocolo nuevo, debido a que en la literatura los protocolos de estimulación resultaban complicados y no fácilmente reproducibles (Holbro et al., 2009, Oh et al., 2013). Por lo tanto, nuestro protocolo consta de pulsos de luz a baja frecuencia, con el objetivo de mimetizar los protocolos de estimulación eléctrica a baja frecuencia. Para determinar la especificidad de nuestro nuevo protocolo realizamos experimentos en presencia de D-AP5, un antagonista competitivo de los receptores NMDA, capaz de bloquear la depresión mediada por NMDA (Selig et al., 1995, Oliet et al., 1997).

En espinas de ratones silvestres nuestro protocolo induce una LTD dependiente de NMDA de corto plazo, ya que pasados 120 minutos el volumen de la espina estimulada regresa a su volumen inicial. Mientras que en espinas de ratones heterocigotos se induce una disminución en el volumen de las espinas estimuladas que permanece constante por tres horas. Esto indica que la haploinsuficiencia de SHANK3 promueve un NMDA-LTD de largo plazo.

Recientemente se ha descrito que la NMDA-LTD cuenta con un componente metabotrópico capaz de inducir depresión sináptica de largo plazo (Nabavi et al., 2013, Stein et al., 2015), este proceso podría estar hiperactivo como resultado de un mayor número de receptores NMDA en nuestro modelo de autismo. De tal manera que se favorezca una depresión de largo plazo. Para poder corroborar dicha hipótesis debemos realizar experimentos en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas, así como de antagonista de receptores NMDA en ratones heterocigotos.

Actualmente un modelo alternativo, combina el modelo de marcaje y captura sináptica (STC) con el fenómeno de síntesis de proteínas inducido por la actividad local (Steward and Schuman, 2001) llamado hipótesis de la plasticidad en “clusters” (CPH)

(Govindarajan et al., 2006). Esta hipótesis predice que las espinas que reciben una estimulación fuerte inducen una síntesis de proteínas local, y que la disponibilidad de estas proteínas promoverá una interacción entre las espinas cercanas que reciban una estimulación débil, permitiendo la cooperatividad o competencia entre las espinas cercanas dentro de un dominio dendrítico (Kelleher et al., 2004b, Govindarajan et al., 2011).

Sabemos que la inducción de LTD de largo plazo implica síntesis de proteínas local, las cuales pueden ser utilizadas por espinas cercanas a las espinas estimuladas, teniendo como resultado modificaciones funcionales y estructurales (Holbro et al., 2009, Ramiro-Cortes and Israely, 2013, Oh et al., 2015). Por lo tanto, analizamos la variabilidad del cambio en el volumen de espinas cercanas y lejanas a la espina estimulada que no recibieron estimulación.

Observamos que la inducción de mGluR-LTD induce un incremento en la variabilidad de las espinas control respecto a su basal, es decir, el volumen fluctúa más después de la estimulación, sin embargo, esta variabilidad es independiente de la distancia relativa a la espina estimulada y del genotipo. Por el contrario, en nuestro protocolo de NMDA-LTD observamos un proceso de corto plazo en ratones silvestres y un proceso de largo plazo en ratones heterocigotos, en este caso observamos que la variabilidad es mayor en los ratones heterocigotos en comparación de los ratones silvestres. En conjunto, estos datos sugieren que la disponibilidad de proteínas influye en los cambios estructurales de las espinas cercanas a la espina estimulada, y al parecer la disponibilidad de proteínas puede ser mayor en los ratones heterocigotos.

Cuando comparamos los protocolos de mGluR-LTD y NMDA-LTD en ratones silvestres, observamos una mayor variabilidad en las espinas cercanas con el protocolo de mGluR. Esto puede ser resultado de que el protocolo de NMDA es de corto plazo y no requiere necesariamente de la síntesis de proteínas (Huber et al., 2000), mientras que



como ya mencionamos la mGluR-LTD induce la síntesis de proteínas. Esto sugiere que la variabilidad de las espinas cercanas puede estar influenciada por los procesos de largo plazo.

## **9. Conclusión**

La haploinsuficiencia de SHANK3 promueve una disminución en la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas de la región de CA1 del hipocampo, no altera la expresión del grupo I de los receptores metabotrópicos, pero aumenta la expresión de la subunidad GluN2B, mientras que la expresión de la subunidad GluN2A no se ve alterada.

Respecto a la parte funcional, demostramos por primera vez que la haploinsuficiencia de Shank3 altera la respuesta sináptica. Específicamente inhibe la depresión sináptica mediada por receptores metabotrópicos, es decir, no permite la reducción en el volumen de las espinas estimuladas como ocurre en los ratones silvestres. Por el contrario, parece inducirse una potenciación pues las espinas estimuladas incrementaron su volumen.

Por otra parte, para la depresión mediada por receptores NMDA, diseñamos un nuevo protocolo tratando de mimetizar los protocolos de estimulación eléctrica, adaptado para la liberación de glutamato enjaulado a través de microscopia de dos fotones. De estos experimentos determinamos que la depresión sináptica induce una disminución en el volumen de las espinas estimuladas en ambos genotipos. Sin embargo observamos que en espinas de ratones heterocigotos esta depresión es de largo plazo, contrario a lo que ocurre en espinas de ratones silvestres, donde se registra una depresión de corto plazo. Derivado de estos resultados analizamos los coeficientes de variabilidad en el volumen de las espinas que no que no recibieron estimulación. Esto con la finalidad de tener una aproximación del papel de la síntesis proteica, que puede promover la interacción entre espinas cercanas dentro de un dominio dendrítico. Al respecto, encontramos que las espinas cercanas a la espina estimulada en ambos protocolos de depresión incrementan su variabilidad. De manera muy interesante,

cuando comparamos los protocolos en espinas de ratones silvestres encontramos que la variabilidad es mayor en el protocolo de mGluR-LTD en comparación al de NMDA-LTD de espinas cercanas.

En su conjunto, nuestros datos muestran por primera vez, que la haplionsuficiencia de Shank3 en etapas posnatales de ratón altera la depresión sináptica y sus correlatos estructurales a través de los receptores mGlu y NMDA. Además, concluimos que Shank3 es necesario para la correcta expresión de los receptores NMDA y la citoarquitectura de las neuronas piramidales.

## 10. Literatura citada

- Andersen P (2007) *The hippocampus book*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Antion MD, Hou L, Wong H, Hoeffler CA, Klann E (2008) mGluR-dependent long-term depression is associated with increased phosphorylation of S6 and synthesis of elongation factor 1A but remains expressed in S6K-deficient mice. *Mol Cell Biol* 28:2996-3007.
- Artola A, von Frijtag JC, Fermont PC, Gispen WH, Schrama LH, Kamal A, Spruijt BM (2006) Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *The European journal of neuroscience* 23:261-272.
- Banko JL, Hou L, Poulin F, Sonenberg N, Klann E (2006) Regulation of eukaryotic initiation factor 4E by converging signaling pathways during metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:2167-2173.
- Bassani S, Folci A, Zapata J, Passafaro M (2013) AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70:4411-4430.
- Bear MF (1999) Homosynaptic long-term depression: a mechanism for memory? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:9457-9458.
- Bear MF, Abraham WC (1996) Long-term depression in hippocampus. *Annual review of neuroscience* 19:437-462.
- Beique JC, Lin DT, Kang MG, Aizawa H, Takamiya K, Huganir RL (2006) Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:19535-19540.
- Bellone C, Nicoll RA (2007) Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron* 55:779-785.
- Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yanez I, de Lagran MM, Elston G, Estivill X, Fillat C, Defelipe J, Dierssen M (2004) On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Prog Neurobiol* 74:111-126.
- Bjarnadottir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, Schioth HB (2006) Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* 88:263-273.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bliss TV, Collingridge GL (2013) Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. *Mol Brain* 6:5.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology* 232:357-374.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology* 232:331-356.
- Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, Wang X, Dickstein DL, Takahashi N, Kajiwara Y, Yang M, Katz AM, Scattoni ML, Harris MJ, Saxena R, Silverman JL, Crawley JN, Zhou Q, Hof PR, Buxbaum JD (2010) Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Molecular autism* 1:15.

- Caroni P, Donato F, Muller D (2012) Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nature reviews Neuroscience* 13:478-490.
- Catania MV, Aronica E, Sortino MA, Canonico PL, Nicoletti F (1991) Desensitization of metabotropic glutamate receptors in neuronal cultures. *J Neurochem* 56:1329-1335.
- Catania MV, D'Antoni S, Bonaccorso CM, Aronica E, Bear MF, Nicoletti F (2007) Group I metabotropic glutamate receptors: a role in neurodevelopmental disorders? *Mol Neurobiol* 35:298-307.
- Choe ES, Wang JQ (2001a) Group I metabotropic glutamate receptor activation increases phosphorylation of cAMP response element-binding protein, Elk-1, and extracellular signal-regulated kinases in rat dorsal striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 94:75-84.
- Choe ES, Wang JQ (2001b) Group I metabotropic glutamate receptors control phosphorylation of CREB, Elk-1 and ERK via a CaMKII-dependent pathway in rat striatum. *Neuroscience letters* 313:129-132.
- Chrestensen CA, Shuman JK, Eschenroeder A, Worthington M, Gram H, Sturgill TW (2007) MNK1 and MNK2 regulation in HER2-overexpressing breast cancer lines. *The Journal of biological chemistry* 282:4243-4252.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010) Long-term depression in the CNS. *Nature reviews Neuroscience* 11:459-473.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37:205-237.
- Coombs ID, MacLean DM, Jayaraman V, Farrant M, Cull-Candy SG (2017) Dual Effects of TARP gamma-2 on Glutamate Efficacy Can Account for AMPA Receptor Autoinactivation. *Cell reports* 20:1123-1135.
- Costales JL, Kolevzon A (2015) Phelan-McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 12:620-630.
- Cowan WM, Südhof TC, Stevens CF (2003) *Synapses*: JHU Press.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004:re16.
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:2983-2994.
- de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Herve N, Pop S, Provoost T, Meas-Yedid V, Pankajakshan P, Lecomte T, Le Montagner Y, Lagache T, Dufour A, Olivo-Marin JC (2012) Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature methods* 9:690-696.
- De Felipe J, Marco P, Fairen A, Jones EG (1997) Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 7:619-634.
- Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248:73-76.
- Dhar SU, del Gaudio D, German JR, Peters SU, Ou Z, Bader PI, Berg JS, Blazo M, Brown CW, Graham BH, Grebe TA, Lalani S, Irons M, Sparagana S, Williams M, Phillips JA, 3rd, Beaudet AL, Stankiewicz P, Patel A, Cheung SW, Sahoo T (2010) 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH. *Am J Med Genet A* 152A:573-581.

- Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:4363-4367.
- Dumas TC (2005) Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Prog Neurobiol* 76:189-211.
- Dupuis JP, Ladepeche L, Seth H, Bard L, Varela J, Mikasova L, Bouchet D, Rogemond V, Honnorat J, Hanse E, Groc L (2014) Surface dynamics of GluN2B-NMDA receptors controls plasticity of maturing glutamate synapses. *EMBO J* 33:842-861.
- Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66-70.
- Erreger K, Dravid SM, Banke TG, Wyllie DJ, Traynelis SF (2005) Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *The Journal of physiology* 563:345-358.
- Ferraguti F, Shigemoto R (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell and tissue research* 326:483-504.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:8900-8911.
- Fonseca R, Nagerl UV, Bonhoeffer T (2006) Neuronal activity determines the protein synthesis dependence of long-term potentiation. *Nature neuroscience* 9:478-480.
- Forrest MP, Parnell E, Penzes P (2018) Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nature reviews Neuroscience* 19:215-234.
- Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain research* 452:57-65.
- Frey U, Morris RG (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385:533-536.
- Gallagher SM, Daly CA, Bear MF, Huber KM (2004) Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:4859-4864.
- Gardoni F, Mauceri D, Malinverno M, Polli F, Costa C, Tozzi A, Siliquini S, Picconi B, Cattabeni F, Calabresi P, Di Luca M (2009) Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:669-677.
- Govindarajan A, Israely I, Huang SY, Tonegawa S (2011) The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP. *Neuron* 69:132-146.
- Govindarajan A, Kelleher RJ, Tonegawa S (2006) A clustered plasticity model of long-term memory engrams. *Nature reviews Neuroscience* 7:575-583.
- Gray JA, Shi Y, Usui H, During MJ, Sakimura K, Nicoll RA (2011) Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron* 71:1085-1101.
- Greger IH, Watson JF, Cull-Candy SG (2017) Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* 94:713-730.
- Haering SC, Tapken D, Pahl S, Hollmann M (2014) Auxiliary subunits: shepherding AMPA receptors to the plasma membrane. *Membranes* 4:469-490.
- Hahamy A, Behrmann M, Malach R (2015) The idiosyncratic brain: distortion of spontaneous connectivity patterns in autism spectrum disorder. *Nature neuroscience* 18:302-309.

- Halt AR, Dallapiazza RF, Zhou Y, Stein IS, Qian H, Juntti S, Wojcik S, Brose N, Silva AJ, Hell JW (2012) CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *EMBO J* 31:1203-1216.
- Hammond C (2015) Cellular and molecular neurophysiology. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Harvey CD, Svoboda K (2007) Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites. *Nature* 450:1195-1200.
- Henley JM, Wilkinson KA (2016) Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature reviews Neuroscience* 17:337-350.
- Holbro N, Grunditz A, Oertner TG (2009) Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:15055-15060.
- Holtmaat A, Svoboda K (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature reviews Neuroscience* 10:647-658.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF (2000) Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288:1254-1257.
- Huber KM, Roder JC, Bear MF (2001) Chemical induction of mGluR5- and protein synthesis--dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *Journal of neurophysiology* 86:321-325.
- Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB, Swain RA, Weiler IJ, Greenough WT (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet* 98:161-167.
- Jacobi E, von Engelhardt J (2018) AMPA receptor complex constituents: Control of receptor assembly, membrane trafficking and subcellular localization. *Molecular and cellular neurosciences* 91:67-75.
- Jiang YH, Ehlers MD (2013) Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron* 78:8-27.
- Jo J, Heon S, Kim MJ, Son GH, Park Y, Henley JM, Weiss JL, Sheng M, Collingridge GL, Cho K (2008) Metabotropic glutamate receptor-mediated LTD involves two interacting Ca(2+) sensors, NCS-1 and PICK1. *Neuron* 60:1095-1111.
- Kandel ER (2013) Principles of neural science. New York: McGraw-Hill.
- Kang H, Schuman EM (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273:1402-1406.
- Kaufmann WE, Moser HW (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* 10:981-991.
- Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004a) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116:467-479.
- Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Tonegawa S (2004b) Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44:59-73.
- Kemp N, McQueen J, Faulkes S, Bashir ZI (2000) Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *The European journal of neuroscience* 12:360-366.
- Kitamura T, Ogawa SK, Roy DS, Okuyama T, Morrissey MD, Smith LM, Redondo RL, Tonegawa S (2017) Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science* 356:73-78.
- Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nature neuroscience* 9:1117-1124.

- Kopp C, Longordo F, Nicholson JR, Luthi A (2006) Insufficient sleep reversibly alters bidirectional synaptic plasticity and NMDA receptor function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:12456-12465.
- Kouser M, Speed HE, Dewey CM, Reimers JM, Widman AJ, Gupta N, Liu S, Jaramillo TC, Bangash M, Xiao B, Worley PF, Powell CM (2013) Loss of predominant Shank3 isoforms results in hippocampus-dependent impairments in behavior and synaptic transmission. *J Neurosci* 33:18448-18468.
- Krug M, Lossner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain research bulletin* 13:39-42.
- Kwon HB, Sabatini BL (2011) Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature* 474:100-104.
- Landers M, Bancescu DL, Le Meur E, Rougeulle C, Glatt-Deeley H, Brannan C, Muscatelli F, Lalonde M (2004) Regulation of the large (approximately 1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res* 32:3480-3492.
- Leonard AS, Lim IA, Hemsworth DE, Horne MC, Hell JW (1999) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:3239-3244.
- Lim S, Naisbitt S, Yoon J, Hwang JI, Suh PG, Sheng M, Kim E (1999) Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *The Journal of biological chemistry* 274:29510-29518.
- Lisman J (2017) Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372.
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (2012) Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature reviews Neuroscience* 13:169-182.
- Lohmann C, Kessels HW (2014) The developmental stages of synaptic plasticity. *The Journal of physiology* 592:13-31.
- Losonczy A, Makara JK, Magee JC (2008) Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature* 452:436-441.
- Lynch GS, Dunwiddie T, Gribkoff V (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266:737-739.
- Magee JC, Johnston D (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275:209-213.
- Manahan-Vaughan D, Braunewell KH (1999) Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:8739-8744.
- Markram H, Lubke J, Frotscher M, Sakmann B (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275:213-215.
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature neuroscience* 4:1086-1092.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.
- Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER (2012) Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

- McCoy CE, Campbell DG, Deak M, Bloomberg GB, Arthur JS (2005) MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochem J* 387:507-517.
- Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyas AI (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102:527-540.
- Moita MA, Rosis S, Zhou Y, LeDoux JE, Blair HT (2003) Hippocampal place cells acquire location-specific responses to the conditioned stimulus during auditory fear conditioning. *Neuron* 37:485-497.
- Momose T, Tonegawa A, Takeuchi J, Ogawa H, Umesono K, Yasuda K (1999) Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Development, growth & differentiation* 41:335-344.
- Monteiro P, Feng G (2017) SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature reviews Neuroscience* 18:147-157.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R (2014) Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511:348-352.
- Nabavi S, Kessels HW, Alfonso S, Aow J, Fox R, Malinow R (2013) Metabotropic NMDA receptor function is required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:4027-4032.
- Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current opinion in neurobiology* 7:217-227.
- Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1993) Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *The Journal of biological chemistry* 268:11868-11873.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews Neuroscience* 9:65-75.
- Nicholson DA, Trana R, Katz Y, Kath WL, Spruston N, Geinisman Y (2006) Distance-dependent differences in synapse number and AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 50:431-442.
- Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC (1988) The current excitement in long-term potentiation. *Neuron* 1:97-103.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313-353.
- Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N, Nakanishi S (1994) Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77:361-369.
- Nosyreva ED, Huber KM (2005) Developmental switch in synaptic mechanisms of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:2992-3001.
- O'Keefe J (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51:78-109.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research* 34:171-175.
- Oh WC, Hill TC, Zito K (2013) Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:E305-312.



- Oh WC, Parajuli LK, Zito K (2015) Heterosynaptic structural plasticity on local dendritic segments of hippocampal CA1 neurons. *Cell reports* 10:162-169.
- Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 18:969-982.
- Palmer CL, Lim W, Hastie PG, Toward M, Korolchuk VI, Burbidge SA, Banting G, Collingridge GL, Isaac JT, Henley JM (2005) Hippocalcin functions as a calcium sensor in hippocampal LTD. *Neuron* 47:487-494.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews Neuroscience* 14:383-400.
- Peca J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, Venkatraman TN, Lascola CD, Fu Z, Feng G (2011) Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472:437-442.
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* 14:285-293.
- Pettit DL, Wang SS, Gee KR, Augustine GJ (1997) Chemical two-photon uncaging: a novel approach to mapping glutamate receptors. *Neuron* 19:465-471.
- Phelan K, McDermid HE (2012) The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Mol Syndromol* 2:186-201.
- Phillips M, Pozzo-Miller L (2015) Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neuroscience letters* 601:30-40.
- Poirazi P, Mel BW (2001) Impact of active dendrites and structural plasticity on the memory capacity of neural tissue. *Neuron* 29:779-796.
- Quinlan EM, Olstein DH, Bear MF (1999) Bidirectional, experience-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition in the rat visual cortex during postnatal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:12876-12880.
- Ramiro-Cortes Y, Israely I (2013) Long lasting protein synthesis- and activity-dependent spine shrinkage and elimination after synaptic depression. *PLoS One* 8:e71155.
- Roberts TF, Tschida KA, Klein ME, Mooney R (2010) Rapid spine stabilization and synaptic enhancement at the onset of behavioural learning. *Nature* 463:948-952.
- Rochefort NL, Konnerth A (2012) Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO reports* 13:699-708.
- Rodenas-Ruano A, Chavez AE, Cossio MJ, Castillo PE, Zukin RS (2012) REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nature neuroscience* 15:1382-1390.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599.
- Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, Colleaux L, Lalande M (1998) An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nat Genet* 19:15-16.
- Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B, Buiting K (2001) The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet* 10:2687-2700.
- Samson F, Mottron L, Soulieres I, Zeffiro TA (2012) Enhanced visual functioning in autism: an ALE meta-analysis. *Human brain mapping* 33:1553-1581.
- Scheefhals N, MacGillavry HD (2018) Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Molecular and cellular neurosciences* 91:82-94.
- Selig DK, Hjelmstad GO, Herron C, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses. *Neuron* 15:417-426.

- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.
- Shipton OA, Paulsen O (2014) GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20130163.
- Snyder EM, Philpot BD, Huber KM, Dong X, Fallon JR, Bear MF (2001) Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nature neuroscience* 4:1079-1085.
- Sobczyk A, Scheuss V, Svoboda K (2005) NMDA receptor subunit-dependent [Ca<sup>2+</sup>] signaling in individual hippocampal dendritic spines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:6037-6046.
- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9:206-221.
- Stein IS, Gray JA, Zito K (2015) Non-Ionotropic NMDA Receptor Signaling Drives Activity-Induced Dendritic Spine Shrinkage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:12303-12308.
- Steward O, Levy WB (1982) Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2:284-291.
- Steward O, Schuman EM (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annual review of neuroscience* 24:299-325.
- Suh YH, Chang K, Roche KW (2018) Metabotropic glutamate receptor trafficking. *Molecular and cellular neurosciences* 91:10-24.
- Takashima S, Becker LE, Armstrong DL, Chan F (1981) Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain research* 225:1-21.
- Takashima S, Ieshima A, Nakamura H, Becker LE (1989) Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain Dev* 11:131-133.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421-425.
- Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG (2007) Schemas and memory consolidation. *Science* 316:76-82.
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23:583-592.
- Turrigiano G (2012) Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4:a005736.
- van Woerden GM, Harris KD, Hojjati MR, Gustin RM, Qiu S, de Avila Freire R, Jiang YH, Elgersma Y, Weeber EJ (2007) Rescue of neurological deficits in a mouse model for Angelman syndrome by reduction of alphaCaMKII inhibitory phosphorylation. *Nature neuroscience* 10:280-282.
- Wang X, Bey AL, Katz BM, Badea A, Kim N, David LK, Duffney LJ, Kumar S, Mague SD, Hulbert SW, Dutta N, Hayrapetyan V, Yu C, Gaidis E, Zhao S, Ding JD, Xu Q, Chung L, Rodriguiz RM, Wang F, Weinberg RJ, Wetsel WC, Dzirasa K, Yin H, Jiang YH (2016) Altered mGluR5-Homer scaffolds and corticostriatal connectivity in a Shank3 complete knockout model of autism. *Nat Commun* 7:11459.
- Wang X, McCoy PA, Rodriguiz RM, Pan Y, Je HS, Roberts AC, Kim CJ, Berrios J, Colvin JS, Bousquet-Moore D, Lorenzo I, Wu G, Weinberg RJ, Ehlers MD, Philpot BD, Beaudet AL, Wetsel WC, Jiang YH (2011) Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Hum Mol Genet* 20:3093-3108.

- Weeber EJ, Jiang YH, Elgersma Y, Varga AW, Carrasquillo Y, Brown SE, Christian JM, Mirnikjoo B, Silva A, Beaudet AL, Sweatt JD (2003) Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:2634-2644.
- Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall J, McDermid HE (2003) Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J Med Genet* 40:575-584.
- Wong AC, Shkolny D, Dorman A, Willingham D, Roe BA, McDermid HE (1999) Two novel human RAB genes with near identical sequence each map to a telomere-associated region: the subtelomeric region of 22q13.3 and the ancestral telomere band 2q13. *Genomics* 59:326-334.
- Xu L, Anwyl R, Rowan MJ (1997) Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature* 387:497-500.
- Yashiro K, Philpot BD (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55:1081-1094.
- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* 24:1071-1089.
- Zhong J, Zhang T, Bloch LM (2006) Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons. *BMC neuroscience* 7:17.
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44:749-757.
- Zhou Y, Kaiser T, Monteiro P, Zhang X, Van der Goes MS, Wang D, Barak B, Zeng M, Li C, Lu C, Wells M, Amaya A, Nguyen S, Lewis M, Sanjana N, Zhou Y, Zhang M, Zhang F, Fu Z, Feng G (2016) Mice with Shank3 Mutations Associated with ASD and Schizophrenia Display Both Shared and Distinct Defects. *Neuron* 89:147-162.
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.
- Zoghbi HY, Bear MF (2012) Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.