



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Cambios fenotípicos en proteínas relacionadas
con la sinapsis en el prosencéfalo del ratón
modelo del síndrome X frágil

María Nieves Ávila Martín

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular,
Genética y Fisiología

TESIS DOCTORAL
2014



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y
FISIOLOGÍA**

Área de Biología Celular

**CAMBIOS FENOTÍPICOS EN PROTEÍNAS
RELACIONADAS CON LA SINAPSIS EN EL
PROSENCÉFALO DEL RATÓN MODELO DEL
SÍNDROME X FRÁGIL**

María Nieves Ávila Martín

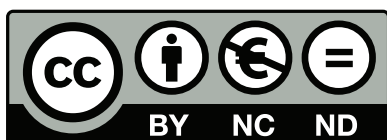
Málaga, 2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: María Nieves Ávila Martín

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGÍA

Área de Biología Celular

Dr. D^a María Ángeles Real Avilés, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular,
Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga

Y

Dr. D. Salvador Guirado Hidalgo, Catedrático del Departamento de Biología Celular,
Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Cambios fenotípicos en proteínas relacionadas con la sinapsis en el prosencéfalo del ratón modelo del síndrome X frágil**” presentada por D^a María Nieves Ávila Martín ha sido realizada bajo su dirección y supervisión, en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, y que presenta para la obtención del grado de Doctora en Biología.

Málaga, Diciembre de 2014

Fdo: María Ángeles Real Avilés

Fdo: Salvador Guirado Hidalgo

A mi padre

A Francis



AGRADECIMIENTOS

En este periodo, durante la realización de esta tesis, son muchas las personas que merecen mis agradecimientos. Entre las que han pasado por este laboratorio (mi lugar de trabajo) y en orden cronológico tengo que agradecer a Rocío y a Mónica el apoyo personal y profesional de mi primera etapa, con ellas aprendí gran parte de lo que hoy sé.

Cuando todo parecía ir sobre ruedas bajo una tranquilidad máxima apareció Bea, se acabó la tranquilidad, pero le dio vida al laboratorio, gracias por hacer este último periodo más emocionante.

A Edu y Noe deciros que me recordáis mucho a cuando yo entré con mi amigo Juan a realizar el máster (aunque por suerte nosotros no cantábamos tanto), espero poder ayudaros como a mi me ayudaron desde el primer momento.

Y terminar esta parte dando las gracias a Reme, la cual me ha ayudado y se ha entregado en cada trabajo que le he pedido, espero romper tus sueños en alguna ocasión más (señal de que sigo trabajando contigo).

Mis mayores agradecimientos son para vosotros; Salva y Mari Ángeles. Gracias a los dos por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo vuestra dirección, porque nadie lo hubiera hecho mejor. Gracias por apostar por mí, enseñarme todo lo que sé y dejarme formar parte de vuestro grupo. Quiero que sepáis que siento una inmensa admiración hacia los dos y me parece fascinante como dos personas tan diferentes pueden estar tan compenetradas.

Sois admirables en lo profesional, pero aún más admirables en lo personal. Mari Ángeles, tu entusiasmo y tus ganas por todo siempre me han

llenado de energía. Salva, tu serenidad y tu comprensión siempre me han aportado una gran tranquilidad. Ambos me habéis escuchado con toda vuestra atención cuando lo he necesitado y sobre todo con los dos me he reído muchísimo y espero seguir haciéndolo, siempre os estaré eternamente agradecida.

A nivel personal son dos las personas a las que les estaré siempre agradecida por su apoyo incondicional durante este periodo:

Francis, gracias porque desde el primer día que decidimos estar juntos has sido mi mayor apoyo, me has escuchado, me has comprendido, me has ayudado, me has animado a seguir siempre y me has ofrecido un entorno tan confortable que gracias a ti ha sido muy fácil conseguir esta meta. Contagias fuerza, energía y entusiasmo, eres una persona emprendedora y por supuesto mi gran amor, gracias por estar siempre a mi lado (UNIVERSO-MUNDO-INFINITO).

Papá, gracias porque eres el pilar principal de mi vida, me has enseñado a valorar la cosas importantes, me has demostrado que todo se puede conseguir en esta vida y que por muy dura que sean las circunstancias siempre hay que ser fuerte y seguir hacia delante. Para mi eres el mejor ejemplo a seguir y por supuesto el mejor padre del mundo, siempre estaré orgullosa de ser tu hija. Eres y serás siempre la persona más importante para mi y cada logro en mi vida siempre será gracias a ti.

ÍNDICE



ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	6
<i>1. El síndrome X-Frágil</i>	7
<i>2. Síntomas del síndrome X-Frágil</i>	9
<i>3. Diagnóstico del síndrome X-Frágil</i>	11
<i>4. Mutación del gen FMR1</i>	12
<i>5. Metilación del gen FMR1</i>	14
<i>6. La proteína FMRP</i>	16
<i>7. Anormalidades anatómicas y ultraestructurales en el cerebro humano con síndrome X-Frágil</i>	17
<i>8. El ratón como modelo animal utilizado en el estudio del síndrome X-Frágil</i>	19
<i>9. Fenotipo y patología del ratón Fmr1-KO</i>	21
<i>10. Estudios en el cerebro anterior de ratones Fmr1-KO</i>	24
<i>11. Últimos avances en la investigación del síndrome X-Frágil</i> ---	25
<i>12. Marcadores neuroquímicos de neuronas GABAérgicas</i>	26
<i>12.1 Proteínas ligadoras de calcio</i>	27
<i>12.2 La sintasa del óxido nítrico</i>	29
<i>13. Transportadores vesiculares de glutamato como marcadores de neuronas glutamatérgicas</i>	30
<i>14. Proteína quinasa II alfa dependiente de Ca²⁺ y calmodulina (CaMKII)</i>	31
<i>15. Proteína vesicular sinapsina 1</i>	34

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	37
<i>Planteamiento</i>	38
<i>Objetivos</i>	39
MATERIAL Y MÉTODOS	40
<i>1. Animales de experimentación</i>	41
<i>2. Genotipación de ratones para el gen Fmr1</i>	42
<i>2.1 Pasos importantes del genotipado</i>	42
<i>2.1.1 Extracción de ADN genómico</i>	42
<i>2.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	43
<i>2.1.3 Electroforesis en gel de agarosa</i>	44
<i>3. Estudio quimioarquitectónico</i>	45
<i>3.1 Pasos importantes de la técnica inmunohistoquímica</i>	47
<i>3.1.1 Desactivación de la peroxidasa endógena</i>	47
<i>3.1.2 Preincubación</i>	47
<i>3.1.3 Incubación en anticuerpo primario</i>	47
<i>3.1.4 Incubación en anticuerpo secundario biotilado</i>	47
<i>3.1.5 Incubación en Estreptavidina-peroxidasa</i>	48
<i>3.1.6 Revelado de la peroxidasa</i>	48
<i>3.2 Controles</i>	49
<i>3.3 Cuantificación de las células inmunorreactivas</i>	49
<i>3.4 Análisis estadístico</i>	52
<i>3.5 Tratamiento de las imágenes</i>	52
<i>4. Análisis de proteínas mediante Western Blot</i>	52
<i>4.1 Pasos importantes del análisis mediante Western Blots</i>	53
<i>4.1.1 Extracción de las proteínas</i>	53
<i>4.1.2 Cuantificación de proteínas totales</i>	53

4.1.3 Preparación de los extractos -----	54
4.1.4 Electroforesis y electrotransferencia -----	55
4.1.5 Incubación de anticuerpos y revelado -----	55
4.2 Cuantificación por densitometría -----	56
4.3 Análisis estadístico -----	57
5. Anexo -----	57
5.1 Anticuerpos -----	57
5.2 Tampones -----	58
5.3 Fijadores -----	60
5.4 Inhibidores -----	60
 RESULTADOS -----	 61
 <i>Estudio quimioarquitectónico y Western Blots</i> -----	 62
<i>1. Estudio comparado de las proteínas ligadoras de calcio (calbindina, calretinina y parvalbúmina) y de la sintasa del óxido nítrico neuronal como marcadores de neuronas GABAérgicas en ratones WT y ratones Fmr1-KO</i> -----	62
1.1 Western Blots para CB, CR, PV y nNOS -----	63
1.2 Inmunohistoquímicas para CB, CR, PV y nNOS -----	63
1.2.1 Inmunorreactividad para calbindina en el cerebro anterior de ratones Fmr1-KO en comparación a ratones WT -----	64
1.2.2 Cuantificación y análisis estadístico de la inmunorreactividad para calbindina en el tálamo -----	68
1.2.3 Inmunorreactividad para calretinina en el cerebro anterior de ratones Fmr1-KO en comparación con ratones WT -----	70
1.2.4 Cuantificación y análisis estadísticos de la inmunorreactividad para calretinina en el tálamo -----	71
1.2.5 Inmunorreactividad para parvalbúmina en el cerebro anterior de ratones Fmr1-KO en comparación a ratones WT -----	75

1.2.6 Inmunorreactividad para la sintasa del óxido nítrico neuronal en el cerebro anterior de ratones <i>Fmr1-KO</i> en comparación a ratones <i>WT</i> -----	79
2. Estudio comparado de los transportadores vesiculares de glutamato tipo 1 y 2 (<i>VGLUT1</i> , <i>VGLUT2</i>) como marcadores de neuronas glutamatérgicas en ratones <i>WT</i> y ratones <i>Fmr1-KO</i> -----	83
2.1 Western Blots para <i>VGLUT1</i> y <i>VGLUT2</i> -----	83
2.2 Inmunohistoquímicas para <i>VGLUT1</i> y <i>VGLUT2</i> -----	84
2.2.1 Inmunorreactividad para <i>VGLUT1</i> y <i>VGLUT2</i> en el cerebro anterior de ratones <i>Fmr1-KO</i> en comparación a ratones <i>WT</i> -----	85
3. Estudio comparado de la proteína quinasa II alfa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (<i>CaMKIIα</i>) en ratones <i>WT</i> y ratones <i>Fmr1-KO</i> -----	92
3.1 Western Blots para <i>CaMKIIα</i> durante el desarrollo postnatal en ratones <i>WT</i> -----	92
3.2 Western Blots para p- <i>CaMKIIα</i> durante el desarrollo postnatal en ratones <i>WT</i> -----	93
3.3 Western Blots para <i>CaMKIIα</i> y p- <i>CaMKIIα</i> en ratones <i>WT</i> y ratones <i>Fmr1-KO</i> durante el desarrollo postnatal hasta adulto -----	94
3.4 Inmunohistoquímica para <i>CaMKIIα</i> y p- <i>CaMKIIα</i> -----	100
3.4.1 Inmunorreactividad para <i>CaMKIIα</i> en el cerebro anterior de ratones <i>Fmr1-KO</i> en comparación a ratones <i>WT</i> -----	101
3.4.2 Inmunorreactividad para p- <i>CaMKIIα</i> en el cerebro anterior de ratones P14, P21 y adultos <i>Fmr1-KO</i> en comparación con ratones <i>WT</i> -----	104
4. Estudio comparado de la proteína sinapsina 1 en ratones <i>WT</i> y ratones <i>Fmr1-KO</i> -----	112

4.1 Western Blots para sinapsina 1 en ratones WT durante el desarrollo -----	112
4.2 Western Blots para sinapsina 1 en ratones WT y ratones Fmr1-KO durante el desarrollo postnatal hasta adulto -----	113
4.3 Inmunorreactividad para sinapsina 1 en el cerebro anterior de ratones Fmr1-KO en comparación a ratones WT -----	116
5. Estudio de la proteína FMRP en ratones WT a partir de la segunda semana de vida -----	120
5.1 Western Blots para la proteína FMRP en ratones WT desde P14 hasta adultos -----	120
5.2 Análisis estadístico de la expresión de FMRP en P14, P21 y adultos WT -----	121
5.3 Inmunorreactividad para FMRP en el cerebro anterior de ejemplares postnatales y adultos WT -----	122
DISCUSIÓN -----	126
1. Expresión de las proteínas ligadoras de calcio calbindina, calretinina y parvalbúmina en ratones Fmr1-KO en comparación con ratones WT -----	127
2. Expresión de la sintasa del óxido nítrico neuronal en ratones Fmr1-KO en comparación con ratones WT -----	130
3. Expresión de los transportadores vesiculares de glutamato tipo 1 (VGLUT1) y tipo 2 (VGLUT2) en ratones Fmr1-KO en comparación con ratones WT -----	131
4. Expresión de la quinasa CaMKII α y su forma activa p-CaMKII α en ratones Fmr1-KO en comparación con ratones WT a lo largo del desarrollo postnatal y hasta el adulto -----	133

5. Mayor cantidad de proteína CaMKII α fosforilada en ratones <i>Fmr1-KO</i> en comparación con ratones <i>WT</i> -----	134
6. Expresión de la sinapsina 1 en ratones <i>Fmr1-KO</i> en comparación con ratones <i>WT</i> a lo largo del desarrollo postnatal y hasta el adulto -----	139
7. Mayor cantidad de proteína sinapsina 1 en ratones <i>Fmr1-KO</i> en comparación con los ratones <i>WT</i> -----	141
8. Lugar de actuación de la proteína sinapsina 1 -----	143
9. Expresión de FMRP en ratones <i>WT</i> a partir de la segunda semana de vida -----	145
10. Cambios fenotípicos a partir de la segunda semana del nacimiento -----	146
11. Relación entre las proteínas CaMKII α , sinapsina 1 y calbindina con la proteína FMRP y los receptores <i>mGluR5</i> en los terminales presinápticos de ratones <i>WT</i> -----	149
12. Posibles efectos de la ausencia de FMRP en los terminales presinápticos -----	151
13. Consecuencias del incremento de p-CaMKII α y sinapsina 1 en los ratones <i>Fmr1-KO</i> a nivel presináptico a lo largo del desarrollo postnatal -----	153
CONCLUSIONES -----	157
BIBLIOGRAFÍA -----	160

ABREVIATURAS



Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico cíclico.

ANOVA: Análisis de la varianza.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico.

BK: Canal grande de potasio

BLA: Núcleo basolateral amigdalino.

BSA: Albúmina sérica bovina.

CaM: Calmodulina.

CaMKII: Proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina.

CaMKIV: Proteína quinasa IV dependiente de Ca^{2+} /calmodulina.

CaMKII α : Proteína quinasa II alfa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina.

CaMKII β : Proteína quinasa II beta dependiente de Ca^{2+} /calmodulina.

CaMKII α -IR: Inmunorreactividad para CaMKII α .

CaMKII α -KO: Ratón que no expresa la proteína CaMKII α .

CB: Calbindina.

CB-IR: Inmunorreactividad para CB.

CL: Núcleo centrolateral del tálamo.

CM: Núcleo centromedial del tálamo.

CR: Calretinina.

CR-IR: Inmunorreactividad para calretinina.

Ce: Núcleo central amigdalino.

CE: Coeficiente de error.

DAB: Diaminobencidina.

DAG: Diacilglicerol.

DPX: Medio de montaje.

DN: Densidad numérica.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

- Fmr1***: Gen murino del retraso mental ligado al cromosoma X.
- FMRI***: Gen del retraso mental ligado al cromosoma X (Fragile X Mental Retardation 1).
- Fmr1-KO***: Ratón nulo para el gen *Fmr1* (*Fmr1*-KnockOut).
- FMRP**: Proteína que codifica el gen *Fmr1* (Fragile X Mental Retardation Protein).
- FMRP-IR**: Inmunorreactividad para FMRP.
- FRAXA**: Sitio donde se encuentra el gen *FMRI*.
- FXTAS**: Síndrome de temblor y ataxia asociado al síndrome X-Frágil.
- g**: Capa granular del giro dentado.
- GD**: Giro dentado.
- h**: Hilio.
- HRP**: Peroxidasa de rábano.
- IgG**: Inmunoglobulina G.
- IGL**: Núcleo intergeniculado del tálamo.
- IH**: Inmunohistoquímica.
- IMD**: Núcleo intermediodorsal talámico.
- IP3**: Inositol trifosfato.
- KH1 y 2**: Dominios de la proteína FMRP.
- KO**: Knockout.
- La**: Núcleo lateral amigdalino.
- LTP**: Sistema de potenciación a largo plazo.
- m**: Capa molecular del giro dentado.
- MD**: Núcleo dorsomedial talámico.
- MDC**: Parte central del núcleo dorsomedial talámico.
- MDL**: Parte lateral del núcleo dorsomedial talámico.
- MDM**: Parte medial del núcleo dorsomedial talámico.
- Me**: Parte medial amigdalina.
- MGD**: Parte dorsal del núcleo geniculado medial del tálamo.
- mGluRs**: Receptores metabotrópico de glutamato.
- mGluR1**: Receptor metabotrópico de glutamato tipo 1.
- mGluR5**: Receptor metabotrópico de glutamato tipo 2.
- MGM**: Parte medial del núcleo geniculado medial del tálamo.
- MGV**: Parte ventral del núcleo geniculado medial del tálamo.

- NES:** Señal de exportación nuclear.
- NLS:** Señal de localización nuclear.
- NMDA:** Receptores ionotrópicos de glutamato
- nNOS:** Sintasa del óxido nítrico neuronal.
- nNOS-IR:** Inmunorreactividad para nNOS.
- NRF1:** Factor respiratorio nuclear tipo 1.
- NR2A:** Subunidad de NMDA.
- PB:** Tampón fosfato.
- PBS:** Tampón fosfato salino.
- PaXi:** Núcleo paraxifoidal talámico.
- PC:** Núcleo paracentral.
- p-CaMKII α :** Proteína quinasa II dependiente de Ca²⁺/calmodulina fosforilada.
- p-CaMKII α -IR:** Inmunorreactividad para p-CaMKII α .
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- PIL:** Parte posterior del núcleo intralaminar talámico.
- PIP2:** Fosfatidilinositol bifosfato.
- PKA:** Proteína quinasa A.
- PKC:** Proteína quinasa C.
- PLC:** Fosfolipasa C.
- PP2A:** Proteína fosfatasa tipo 2A
- Pv:** Núcleo paraventricular talámico.
- PV:** Parvalbúmina.
- Re:** Núcleo reuniens.
- Rh:** Núcleo romboidal.
- RP:** Vesículas de reserva.
- RRP:** Vesículas listas para liberarse.
- SAM:** s-adenosilmethionina.
- SEM:** Error estándar de la media.
- SG:** Núcleo supragenicolado talámico.
- SNC:** Sistema nervioso central.
- STP:** Sistema de potenciación a corto plazo.
- Sub:** Núcleo submedio talámico.

SYN1: Sinapsina tipo 1.

SXF: Síndrome X-Frágil.

TAE: Buffer Tris-acetato-EDTA.

Thr286: Treonina 286.

TPBS: Tampón fosfato salino con Tween.

UV: Ultravioleta.

VGLUT-IR: Inmunorreactividad para VGLUT.

VGLUTs: Transportadores vesiculares de glutamato.

VGLUT1: Transportador vesicular de glutamato tipo 1.

VGLUT2: Transportador vesicular de glutamato tipo 2.

VGLUT2-IR: Inmunorreactividad para VGLUT2.

VGLUT3: Transportador vesicular de glutamato tipo 3.

VRe: Parte ventral del núcleo reuniens.

WB: Western Blot.

WT: Wild type.

INTRODUCCIÓN



1. El síndrome X-Frágil

El síndrome X-Frágil (SXF) es la forma más común de discapacidad intelectual hereditaria afectando a 1 de cada 4.000 varones y a 1 de cada 6.000/8.000 mujeres (Turner y cols., 1996; Kooy y cols., 2000; Crawford y cols., 2001). El síndrome X-Frágil fue descrito por primera vez en 1943 como un retraso mental hereditario ligado al cromosoma X (Martin y Bell, 1943). Lubs en 1969, mediante la realización de un estudio citogenético en cultivos de linfocitos en medios pobres en ácido fólico (Fig. 1), describió una anomalía que consistía en un estrechamiento de la zona distal del brazo largo de cromosoma X que denominó “marcador X” (Lubs, 1969) y que posteriormente, por el aspecto de fragilidad que presentaba, se le llamó “sitio frágil” (Fig. 1; citado en Penagarikano y cols., 2007).

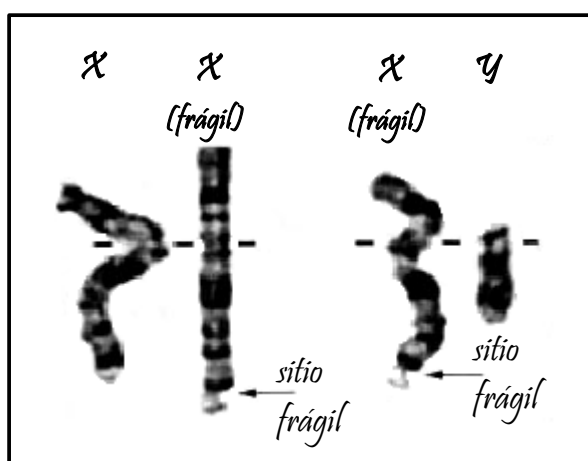


Figura 1. Imagen de dos pares de cromosomas que presentan el sitio de fragilidad en uno de sus cromosomas. El par cromosómico de la izquierda estaría presentes en mujeres portadoras y el par de la derecha en varones afectados por el síndrome X-Frágil.

Más de una década después, con la ayuda de las técnicas de bandeado cromosómico, se descubrió que el gen que afectaba al síndrome X-Frágil, denominado *FMRI* (Fragile X Mental Retardation), se localizaba exactamente en la región Xq27.3 en la parte distal del brazo largo del cromosoma X (Harrison y cols., 1983; Verkerk y cols., 1991) y que codificaba para la proteína de retraso mental X Frágil (FMRP) (Ashley y cols., 1993).

Fue en 1985 cuando Sherman y sus colaboradores indicaron que el patrón de herencia observado no seguía las leyes mendelianas. Este síndrome presentaba una herencia dominante y con penetrancia incompleta, presentando el fenómeno de anticipación genética, que consiste en que la enfermedad puede aparecer antes y de forma más severa en las siguientes generaciones. Estos riesgos de padecer la enfermedad dio lugar a una serie de observaciones que en su conjunto se denominó paradoja de Sherman (Fu y cols., 1991).

En 1991 se describió que una expansión del triplete repetitivo CGG en el extremo 5' (no codificante) del gen *FMR1* era la causante del síndrome X-Frágil (Verkerk y cols, 1991). En individuos normales, la repetición del triplete CGG se encontraba entre 5 y 50 veces, con un promedio de aproximadamente 30 repeticiones (Fu y cols., 1991), dando lugar a los niveles normales de FMRP (Fig. 2). La premutación presentaba entre 50 y 200 repeticiones (Fig. 2) y se sugirió que daban lugar a los varones asintomáticos descritos en la paradoja de Sherman (Maddalena y cols, 2001) y la mutación completa, presente en varones y mujeres afectados, contenían expansiones superiores a 200 CGG, normalmente alrededor de 800 repeticiones (Fig. 2) (Oberlé y cols., 1991).

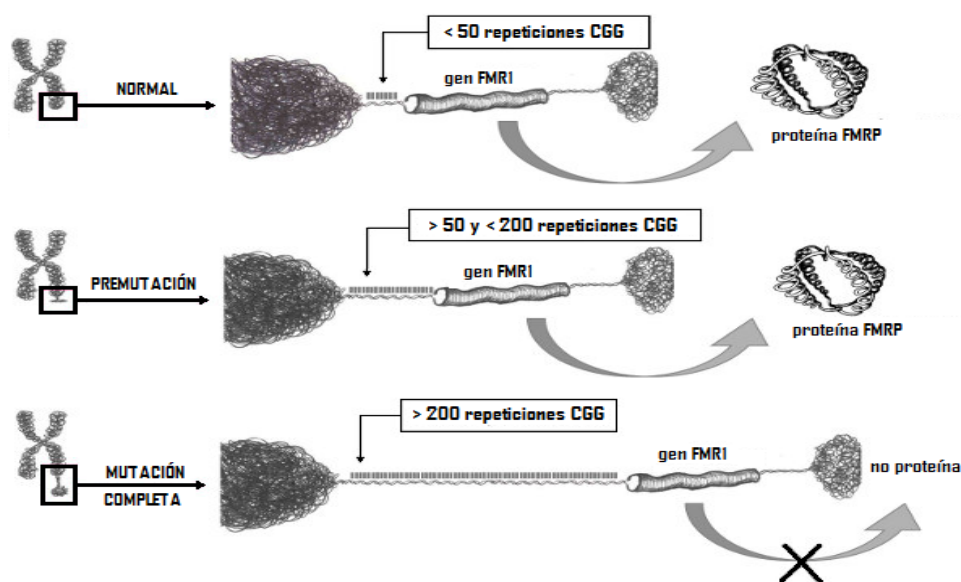


Figura 2. Esquema representativo de un cromosoma normal y uno premutado que dará lugar a la proteína FMRP y de un cromosoma que presenta la mutación completa no formándose dicha proteína.

Desde el punto de vista clínico han aparecido dos nuevos subtipos de manifestación tardía. En primer lugar el fallo ovárico prematuro, que se relaciona con insuficiencia ovárica en las mujeres sugiriendo que el gen *FMRI* interviene en el desarrollo y maduración del ovario (Murray y cols., 1998; Bretherick y cols., 2005). Y en segundo lugar lo que fue denominado como FXTAS (Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome) que tiene lugar en adultos que presentan la premutación, encontrándose niveles de ARNm del gen *FMRI* muy elevados, dando lugar a un efecto patogénico por ganancia de función. (Hagerman y cols., 2001; Hagerman y cols., 2004; Hagerman y Hagerman., 2007). Los síntomas suelen aparecer pasados los 50 años y se caracterizan por presentar temblor intencional progresivo, ataxia, parkinsonismo, déficit cognitivo, atrofia cerebral generalizada e impotencia sexual (Hagerman y cols., 2001; Hagerman y cols., 2004; Hagerman y Hagerman, 2007).

Actualmente, por su relativa incidencia en la población y por la falta de hallazgos típicos durante la primera infancia, el estudio del gen *FMRI* es uno de los test genéticos más solicitados en niños con déficit intelectual de grado leve a moderado para descartar el diagnóstico del síndrome X-Frágil (ver apartado 3 de la introducción).

2. Síntomas del síndrome X-Frágil



El aspecto físico de las personas que sufren el síndrome X-Frágil incluye unos rasgos principales que suelen estar presentes en la mayoría de los varones afectados: cara alargada con frente amplia, mentón prominente, orejas grandes y despegadas, pies planos, hiperlaxitud articular, trastornos en el tejido conectivo y macroorquidismo (Chudley y Hagerman, 1987; Penagarikano y cols., 2007).

Muchos afectados varones con el síndrome X-Frágil presentan discapacidad intelectual y variaciones en la conducta y la mayoría de los niños presentan deficiencia intelectual desde los 3 años, teniendo un coeficiente intelectual situado en retraso mental de moderado a severo, mientras que sólo un 25% de las niñas muestran un coeficiente intelectual

comparable con los niños gravemente afectados (Skinner y cols., 2005).

Una característica importante presente en los afectados de este síndrome es la imposibilidad de responder a un estímulo concreto, ya que presentan una exagerada atención a todos los estímulos sensoriales de su alrededor (revisado en Reynolds y Lane, 2008). La gran dificultad de responder a estímulos concretos da lugar a respuestas lentas y sin capacidad de discriminar entre lo relevante y lo irrelevante (Munir y cols., 2000). Los varones afectados presentan trastornos de atención, hiperactividad, distracción y falta de atención que empeora progresivamente con la edad (Turk y Cornish, 1998), mientras que en las mujeres los trastornos de atención son observados en menor grado (Cornish y cols., 2008).

Alrededor del 15-30% de los pacientes con síndrome X-Frágil parecen presentar características presentes en los trastornos del espectro autista (Kelleher y Bear, 2008), mientras que sólo el 2-6% de los pacientes autistas analizados presentan la mutación genética del síndrome X-Frágil (Bailey y cols., 1993; Reddy, 2005). A nivel cognitivo existen similitudes entre el autismo y el síndrome X-Frágil en las habilidades que implican interacción social y reciprocidad (Cornish y cols., 2007), sin embargo, estas características presentan diferencias entre ambas enfermedades (Cornish y cols., 2008). Los varones con el síndrome X-Frágil se muestran tímidos y angustiados ante situaciones de interacción social, pero éstas no les son indiferentes, ni tampoco las rechazan sino que incluso a veces las provocan. Y por otro lado, presentan una mirada comunicativa aunque eviten el contacto ocular, siendo selectivo, evitando menos la mirada de personas conocidas que de desconocidos (Wolff y cols., 1989; Cornish y cols., 2004; Cornish y cols., 2008).

Las personas con síndrome X-Frágil presentan menor capacidad para comprender las creencias y las intenciones de otras personas, lo que parece ser debido a un incorrecto procesamiento de la información (revisado en Cornish y cols., 2008). Además de presentar déficit en el procesamiento sensorial, muestran retrasos en las habilidades motoras. Parece ser que el procesamiento motor está directamente relacionado con los niveles de expresión de FMRP (revisado en Kau y cols., 2002). Por otro lado, alrededor del 10-40% de los pacientes presentan crisis de epilepsia, posiblemente debido a un aumento en la excitabilidad sináptica (Musumeci y cols., 1988; Kluger y cols., 1996).

Lo expuesto en este apartado es una mención de los principales síntomas del síndrome X-Frágil.

3. Diagnóstico del síndrome X-Frágil



En un principio el diagnóstico se realizaba mediante métodos citogenéticos (Fig. 1), este método tenía una gran dificultad técnica, además de ser muy costoso y dar falsos negativos (Lubs, 1969).

A partir de 1991 se empezó a realizar la técnica del Southern Blot estudiando directamente la región donde se encuentran los tripletes CGG, detectando posibles expansiones y el grado de metilación del promotor regulador de la expresión del gen *FMRI*. Esta técnica se basa en la medición del número de repeticiones CGG mediante la digestión del ADN con dos enzimas de restricción, una de ellas sensible a la metilación y la posterior hibridación con una sonda de la región. Mediante esta técnica podemos realizar el diagnóstico de cualquier individuo, siendo precisa y exacta a pesar de ser larga y costosa (Fu y cols., 1991; Verkerk y cols., 1991).

Otra técnica para descartar los casos normales consiste en la determinación del número de repeticiones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se basa en la amplificación de la zona repetitiva y el posterior análisis del fragmento amplificado para medir su tamaño (Erster y cols., 1992). Esta técnica proporciona el número exacto de repeticiones por debajo de 100-200 CGG, sin dar información acerca del estado de metilación del promotor regulador de la expresión del gen *FMRI*, por lo tanto sólo permite la confirmación de normalidad de un individuo y el diagnóstico de individuo con premutación. Actualmente, existen modificaciones de esta técnica que permiten la amplificaciones de hasta unas 600 repeticiones (Durán y cols., 2001).

Hoy en día el diagnóstico comprende los dos análisis: la técnica de PCR con “primers” específicos para determinar el número exacto de repeticiones CGG y la técnica Southern Blot para ver el estado de metilación y el tamaño si la mutación es completa (Tsiouris y Brown, 2004). De esta forma se podría diagnosticar al 99% de los casos, siendo el 1% restante casos con una mutación puntual o delección parcial o total en *FMRI* (Sherman y cols., 2005).

Existe otra técnica utilizada actualmente que se basa en el estudio de la expresión de la proteína FMRP por inmunohistoquímica (Willemsen y cols., 1999; Rifé y cols., 2003). Se detecta la ausencia y presencia de la proteína FMRP mediante anticuerpos específicos normalmente sobre la raíz del cabello. Se utiliza principalmente para realizar estudios preliminares y cribados ya que es poco invasiva, rápida y fácil de realizar, aunque se trata de un método de detección cualitativo.

4. Mutación del gen *FMRI*



El síndrome X-Frágil es una enfermedad monogénica causada por la mutación del *FMRI*, en la región FRAXA del cromosoma Xq 27.3 (Verkerk y cols., 1991). Este gen tiene unas 38 Kb y está compuesto por 17 exones y 16 intrones (Eichler y cols., 1994). Está altamente conservado entre las especies (Oostra y Chiurazzi, 2001) y codifica un ARN mensajero de 3,9 Kb, que consta de una región 5' no traducida de 0,2 Kb, una región codificante de 1,9 Kb y una región 3' no traducida de aproximadamente 1,8 Kb.

El hallazgo más importante en este gen es la existencia de un segmento de repeticiones CGG que forman parte de las islas CpG. Dentro del gen se encuentran secuencias AGG intercaladas en cada 9 o 10 repeticiones CGG. La pérdida de estas secuencias está relacionada con la inestabilidad de la secuencia repetitiva CGG (Eichler y cols., 1994; Kunst y cols., 1996; Verheij y cols., 1995).

La mutación que causa el síndrome X-Frágil es una amplificación trinucleótida CGG en la región 5' UTR no traducida del exón 1 del gen *FMRI* (Fig. 3; De Vries y cols., 1998). Esta secuencia es polimórfica en longitud y contenido, en individuos normales varía de 5 a 50 repeticiones CGG, en individuos portadores (premutación) de 50 a 200 repeticiones y en individuos afectados (mutación completa) el incremento de la secuencia repetitiva CGG a más de 200 tripletes desencadena un proceso de hipermetilación de las secuencias CGG y la isla CpG adyacente del promotor, dando lugar a la inactivación del gen *FMRI*, lo que impide el proceso de transcripción y por tanto la síntesis de la proteína FMRP (Nussbaum y Ledbetter, 1995; Hoogeveen y Oostra, 1997; De Vries y cols., 1998).

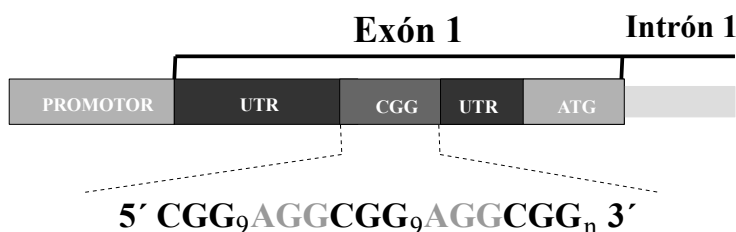


Figura 3. Esquema del primer exón del gen *FMR1* donde se encuentra la mutación que da lugar al síndrome X-Frágil. En condiciones normales las secuencias AGG se intercala cada 9 o 10 repeticiones de CGG aportando estabilidad.

El mecanismo molecular de la expansión todavía no se conoce (Kolehmainen, 1994; Richards y cols., 1994), pero nunca se ha observado que un alelo normal se expanda a mutación completa en un solo paso de transmisión. Uno de los mecanismos que se asume que pudiera estar involucrado en una expansión inicial de la cadena de trinucleótidos es un inadecuado apareamiento de las cadenas de ADN durante la replicación del ADN (Schlötterer y Tautz, 1992), o bien durante su reparación (Sinden, 2001).

Con respecto a la estructura, el número de repeticiones es un factor de riesgo en relación a la inestabilidad (Eichler y cols., 1994; Kunst y Warren, 1994). Cuando las secuencias AGG, que aportan estabilidad, no se intercalan entre las repeticiones CGG queda una larga cadena de trinucleótidos con una alta probabilidad de expandirse y premutar (Nolin

y cols., 1999, Crawford y cols., 2000). Los alelos premutados casi no presentan AGG, siendo muy inestables, con una alta posibilidad de expandirse y transformarse en una mutación completa al pasar de una generación a otra (Oberlé y cols., 1991). Sólo a través de la transmisión materna la premutación puede transformarse en mutación completa (Devys y cols., 1993; Feng y cols., 1995; Bat y cols., 1997; Tassone y cols., 2000).

Los alelos normales que presentan un número de tripletes cercano a 50 repeticiones presentan lo que se denomina zona gris (Oostra y Chiurazzi, 2001). Estos alelos de gran tamaño pueden convertirse en la premutación. En algunos pacientes con el síndrome X-Frágil se pueden observar varios tamaños de fragmentos CGG en diferentes células, lo que se denomina mosaicismo somático (Nolin y cols., 1994; Rousseau y cols., 1994). Entre el 20% y el 40% de los pacientes con el síndrome presentan mosaicismo somático (premutación junto con mutación completa). Si la premutación se transcribe y se traduce se expresará FMRP en algunas de sus células (Devys y cols., 1993; Feng y cols., 1995). Estos pacientes presentan un coeficiente intelectual similar a los varones con la mutación completa (Devys y cols., 1993; Rousseau y cols., 1994).

Existen casos concretos de varones afectados que no presentan la expansión del promotor del gen *FMRI*, como por ejemplo un paciente al que se le detectó una mutación puntual del exón 10 que modifica un dominio de la proteína FMRP (De Boulle y cols., 1993).

5. *Metilación del gen FMRI*

Por lo general la mutación completa coincide con la metilación de los residuos de citosina de los trinucleótidos CGG y de la isla CpG (región con abundante Citosina-Guanina) del promotor del gen *FMRI*. La metilación del promotor imposibilita la transcripción del gen *FMRI*, no produciendo la proteína FMRP (Malter y cols., 1997). Esto tiene lugar después de la fecundación en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Malter y cols., 1997).

Algunos afectados por la enfermedad con la mutación completa presentan una alta proporción de leucocitos, aproximadamente el 60%, con la mutación sin metilar, expresando FMRP, a esto se le denomina mosaico de metilación (McConkie-Rosell y cols., 1993; Hagerman y cols., 1994; Smeets y cols., 1995; De Vries y cols., 1996; Wöhrle y cols., 1996; Taylor y cols., 1999; Tassone y cols., 2000). Estos pacientes generalmente presentan un fenotipo menos severo, porque producen FMRP aunque en un número de células menor que en condiciones normales (Hagerman y cols., 1994; Smeets y cols., 1995; De Vries y cols., 1996; Tassone y cols., 1999). En estos pacientes el nivel de ARNm es significativamente más elevado (Tassone y cols., 2000), que puede ser debido a un mecanismo compensatorio por encontrarse dificultades en la traducción (Brouwer y cols., 2007).

En general, los varones con mutación completa que expresan niveles insignificantes de FMRP presentan un grado mayor de severidad en comparación con los pacientes que presentan altos niveles de FMRP, que suelen ser individuos que muestran mosaico o un estado de metilación bajo (Tassone y cols., 1999).

Hay varios estudios que muestran una correlación entre el nivel de FMRP y la función cognitiva de los afectados por el síndrome X-Frágil (Tassone y cols., 1999; Menon y cols., 2000; Bailey y cols., 2001).

Existen estudios *in vitro* donde tras la desmetilación de un alelo con la mutación completa se observa FMRP por reactivación del gen *FMRI* (Chiurazzi y cols., 1998, 1999; Coffee y cols., 1999). Por tanto la metilación parece clave en la inactivación del gen *FMRI*, estando algunos estudios dirigidos en la obtención de la proteína FMRP funcional con la intención de evitar la manifestación del síndrome (Tassone y cols., 2001).

6. La proteína FMRP

La proteína FMRP es el producto codificado por el gen *FMRI* y es de localización citoplasmática y nuclear. El gen *FMRI* presenta un proceso de empalme alternativo que genera diferentes proteínas cuyos pesos moleculares van de 70 a 80 kDa (Siomi y cols., 1993; Jin y Warren, 2000). Sólo se conocen 6 isoformas de la proteína y la isoforma más grande (FMRP1) es de aproximadamente 632 aminoácidos (Siomi y cols., 1993; Jin y Warren, 2000).

FMRP consta de varios dominios funcionales, en la región N-terminal se encuentra una señal de importación nuclear (NLS), próxima a esta secuencia se localizan 2 dominios de unión al ARN (dominios de homología a ribonucleoproteína K, llamados KH1 y KH2); también se encuentra una señal de exportación nuclear (NES) codificada por el exón 14, y por último un conjunto de residuos de glicina y arginina llamado caja RGG, localizada en el extremo carboxilo (Fig. 4; Siomi y cols., 1993).

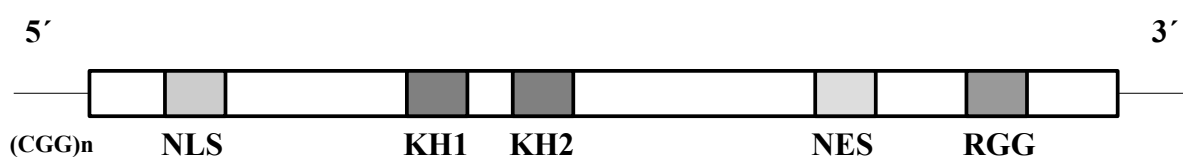


Figura 4. Representación esquemática de la proteína FMRP.

Hoy día se sabe que los dominios KH y la caja RGG son secuencias que se encuentran en proteínas de unión al ARN (Bardoni y cols., 2001) y que FMRP es una proteína capaz de unir ARN a través de los dominios de unión KH1, KH2 y de la caja RGG (Ashley y cols., 1993; Siomi y cols., 1993). Esta proteína se encuentra asociada con polisomas que traducen activamente (Siomi y cols., 1993; Corbin y cols., 1997; Hoogeveen y Oostra, 1997; Kooy y cols., 2000), y actúa como reguladora del ARNm en el transporte y traducción desempeñando un importante papel en la función y maduración sináptica (Bagni y Greenough, 2005).

En estudios recientes se han identificado una serie de proteínas, más de 800, cuya síntesis está regulada por FMRP, de tal manera que cuando FMRP es activa inhibe la síntesis de estas proteínas (Darnell y cols., 2011). FMRP parece regular aproximadamente el 30% del proteoma postsináptico (Darnell y cols., 2011) y el 30% del proteoma presináptico (Akins y cols., 2009).

Hasta hace poco los estudios relacionados con el síndrome X-Frágil se han centrado mayoritariamente en alteraciones a nivel postsináptico que darían lugar a disfunciones en la plasticidad a largo plazo (Huber y cols., 2002), a pesar de que existían evidencias de que la pérdida de FMRP afectaba tanto a nivel postsináptico como presináptico (Brown y cols., 2001; Miyashiro y cols., 2003; Liao y cols., 2008; Christie y cols., 2009).

Recientemente se están realizando estudios que van enfocados a posibles alteraciones a nivel presináptico, ya que FMRP parece estar involucrada en procesos presinápticos (Brown y cols., 2010) y no se limita sólo a controlar la traducción de proteínas, sino que interactúa con canales de potasio presentes en los terminales presinápticos (Contractor, 2013; Deng y cols., 2013). La ausencia de FMRP en los terminales presinápticos y por tanto la ausencia de la interacción con los canales de potasio podría dar lugar a anomalías relacionadas con la liberación del neurotransmisor y con la plasticidad a corto plazo (Contractor, 2013; Deng y cols., 2013).

7. Anormalidades anatómicas y ultraestructurales en el cerebro humano con síndrome X-Frágil

Estudios de imágenes mediante resonancia magnética del cerebro de pacientes con el síndrome X-Frágil muestran diferencias anatómicas en varias regiones del cerebro, siendo estas regiones de vital importancia en el procesamiento cognitivo y en el comportamiento (Reiss y cols., 1988). Reiss y cols. fueron los primeros en observar una disminución del tejido

de conexión entre los dos hemisferios cerebelosos denominado vermis cerebeloso. El vermis está conectado anatómicamente a estructuras límbicas tales como el hipocampo y la amígdala, y se cree que participa en la ejecución y la regulación de la conducta motora (Rosenthal y cols., 1988), en aspectos auditivos (Huang y Burkard, 1986), en los movimientos sacádicos del ojo (Hayakawa y cols., 2002) y en el procesamiento del lenguaje (Moretti y cols., 2002). Por tanto las anomalías del vermis cerebeloso podrían estar relacionadas con anomalías del comportamiento propias del síndrome X- Frágil, tales como la hiperactividad, movimiento ocular repetitivo y las deficiencias en la atención (Hessl y cols., 2004).

También se ha observado un mayor volumen del hipocampo, una estructura muy importante en el aprendizaje y la memoria (Mazzocco y cols., 1993; Kates y cols., 1997) y en la amígdala, una estructura implicada con la sensación del miedo y en el comportamiento emocional (Reiss y cols., 1995).

Del mismo modo se observó un aumento en el tamaño del núcleo caudado de los ganglios basales. Este núcleo conecta con el lóbulo frontal que es de vital importancia en la atención de los estímulos (Reiss y cols., 1995).

Los cambios ultraestructurales observados en este síndrome fueron caracterizados por primera vez por Rudelli y sus colaboradores en 1985 tras la autopsia del cerebro de un paciente con el síndrome X-Frágil. Encontraron que las neuronas del neocórtex y del allocórtex (incluye corteza olfativa e hipocampo) presentaban una morfología anormal en las dendritas apicales, siendo éstas más alargadas e irregulares que las dendritas de las neuronas de una persona normal (Rudelli y cols., 1985), presentando una morfología típica de las dendritas durante el desarrollo temprano (Marin-Padilla, 1967).

Estudios posteriores corroboraron esta anormal morfología de la dendrita en otras regiones del cerebro (Hinton y cols., 1991; Wisniewski y cols., 1991). Posteriormente, Irwin y sus colaboradores en el 2001 observaron en las células piramidales de la corteza piramidal y visual una mayor densidad de espinas dendríticas con una morfología inmadura.

Se planteó la hipótesis de que esta anormal morfología de las dendritas presentes en el síndrome X-Frágil era debida a defectos durante el desarrollo de una correcta poda dendrítica y eliminación de sinapsis, que tiene lugar a lo largo del proceso de maduración sináptica (Irwin y cols., 2001; Bagni y cols., 2005).

Hoy en día son varias las líneas de investigación abiertas en relación al síndrome X-Frágil en busca de cambios en las alteraciones sinápticas en el cerebro de animales modelo de la enfermedad y en relación a cómo la falta de FMRP interfiere en el normal desarrollo y en la maduración neuronal.

8. El ratón como modelo animal utilizado en el estudio del síndrome X-Frágil

Los modelos animales son herramientas fundamentales a la hora de investigar las alteraciones que causan la pérdida de las funciones de la proteína FMRP y son esenciales para el estudio *in vivo* de la fisiopatología del síndrome X-Frágil, sus procesos bioquímicos y su influencia en el comportamiento (Bakker y Ostra, 2003). A veces los resultados obtenidos mediante el empleo de modelos animales no son extrapolables a humanos, pero estos modelos constituyen una herramienta básica para la comprensión de muchas enfermedades.

Actualmente se utilizan varios modelos animales en la búsqueda de tratamientos específicos para esta enfermedad. Se utilizan modelos capaces de reproducir total o parcialmente algunas de las características típicas de este síndrome, ya sea mediante la anulación del gen *FMRI*, la inducción de sobreexpresión, la inducción de una mutación puntual o la anulación del gen en ciertos tejidos concretos. Con el empleo de estos modelos se pretende entender mejor la fisiopatología, encontrar nuevas dianas terapéuticas experimentales y ensayar posibles tratamientos.

Los más utilizados son el ratón (*Mus musculus*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el pez cebra (*Danio rerio*) y dos especies de ranas (*Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*).

El modelo animal más utilizado es el ratón nulo para el gen *FMRI* (*Fmr1*-Knockout o *Fmr1*-KO; Bakker y cols., 1994), el cual no expresa la proteína FMRP. El ratón mutante del gen *Fmr1* fue generado por recombinación homóloga mediante la utilización de un vector que inserta una señal de terminación en el exón 5 del gen. Esta alteración genética se transfiere a una célula germinal embrionaria que después se inyecta en un embrión (Mansour y cols., 1988). Esta técnica consiste en una reconstrucción génica en la que se reemplaza la secuencia de ADN endógena, en un punto del gen seleccionado, con ADN homólogo alterado previamente para causar una mutación. En el caso del ratón *Fmr1*-KO (Bakker y cols., 1994) se utilizó la recombinación homóloga para insertar el ADN exógeno en zonas específicas del gen *Fmr1*, lo que produjo una inactivación, y la consecuente generación de animales deficientes en el producto de su traducción, la proteína FMRP.

Aunque la mutación del gen *Fmr1* en el ratón nulo es diferente a la mutación presente en humanos afectados por el síndrome (interrupción del gen en ratón y expansión de la secuencia inestable de tripletes CGG en humanos), en ambos casos se observa la falta del producto del gen *Fmr1*, la proteína FMRP, mostrando severos síntomas comportamentales como hiperactividad, respuestas anormales relacionadas con la ansiedad, respuestas sensorial-motora anormales y fallos de coordinación motora (Bakker y cols., 1994; Peier y cols., 2000).

El gen *Fmr1* se encuentra altamente conservado entre las distintas especies a lo largo de la evolución (Verkerk y cols., 1991). El gen murino muestra un 95% de homología con la secuencia humana y la proteína FMRP de ratones presenta un 97% de similitud con la proteína humana (Ashley y cols., 1993).

Como en el caso de humanos, el gen *Fmr1* de ratón se encuentra en el cromosoma X y presenta una media de 10 repeticiones del triplete CGG en la secuencia del primer exón, en la zona anterior al inicio de la traducción (5'UTR), mucho menor al promedio de repeticiones en

humanos (30 repeticiones; Deelen y cols., 1994).

El nivel de expresión del ARNm de *Fmr1* y la localización de la proteína FMRP en el ratón es casi idéntico en cuanto al nivel y a la localización en los diferentes tejidos en los humanos (Abitbol y cols., 1993; Hinds y cols., 1993; Devys y cols., 1993; Bakker y cols., 2000; De Diego y cols., 2000). El ratón *Fmr1*-KO presenta macroorquidismo en el 90% de los casos, similar a lo que ocurre en humanos (Kooy y cols., 1996). También la función cognitiva y el perfil del comportamiento en el ratón *Fmr1*-KO se correlacionan con el comportamiento en humanos afectados con el síndrome (Kooy y cols., 1996; Paradee y cols., 1999; Peier y cols., 2000; Musumeci y cols., 2000; Van Dam y cols., 2000; Mineur y cols., 2002; Nielsen y cols., 2002).

Por tanto, los ratones *Fmr1*-KO son considerados un modelo eficaz para estudiar las alteraciones relacionadas con la ausencia de FMRP, ya que presentan muchas manifestaciones similares a humanos como: macroorquidismo, problemas de comportamiento, espinas dendríticas alteradas, convulsiones e hiperactividad (Ashley y cols., 1993; Bakker y cols., 1994; Irwin y cols., 2000, 2001).

9. Fenotipo y patología del ratón *Fmr1*-KO



A simple vista no existen diferencias fenotípicas macroscópicas importantes entre el ratón WT y el *Fmr1*-KO (Bakker y cols., 1994; Ashley y cols., 1993). Al igual que los estudios realizados en humanos con el síndrome, en los ratones *Fmr1*-KO no se observaron alteraciones en el estudio macro y microscópico en diferentes tejidos como el hígado, corazón, pulmón, bazo y riñón (Bakker y cols., 1994). Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, los pacientes con síndrome X-Frágil presentan macroorquidismo en un 90% de los afectados, siendo esta característica similar a la observada en los ratones *Fmr1*-KO, donde se observó un incremento del peso testicular en aproximadamente un 30% (Bakker y cols., 1994; Kooy y cols., 1996).

Para el análisis neuroanatómico de los ratones *Fmr1*-KO, al igual que en pacientes afectados por esta enfermedad, se usaron técnicas de resonancia magnética en vivo (Kooy y cols., 1999). Al contrario de lo observado en los pacientes afectados por el síndrome, en el caso de los ratones *Fmr1*-KO no se observó ninguna alteración en el tamaño de la vermis cerebelar, ni del núcleo caudado, ni del hipocampo (Kooy y cols., 1999). Mediante reconstrucciones 3D se ha medido el volumen total del cerebro de ratones *Fmr1*-KO y de ratones WT, no encontrándose diferencias entre ambos genotipos (Kooy y cols., 1999).

Mineur y sus colaboradores en el 2002 observaron en el ratón *Fmr1*-KO una alteración en la distribución de las fibras musgosas en el hipocampo y una disminución en el tamaño. Sin embargo, un estudio simultáneo indicaba resultados contrarios, con un aumento del tamaño en las fibras musgosas (Ivanco y Greenough, 2002). Se sabe que este tipo de fibras están relacionados con la memoria espacial (Crusio y Schewegler, 1987, Schewegler y cols., 1990; Schewegler y Crusio, 1995), aunque no están claras todavía las consecuencias de estas posibles alteraciones.

En conclusión podemos decir que no parecen existir grandes diferencias neuroatómicas entre los ratones *Fmr1*-KO y los ratones WT como parece ser que sí las hay en humanos. Hay que tener en cuenta que los trabajos realizados en humanos son muy escasos, entre los que se encuentran el estudio realizado por Jäkälä y sus colaboradores en 1997, que correlaciona la expansión del triplete CGG con el volumen del hipocampo.

Por otra parte, en relación a la función cognitiva se han realizado numerosos estudios de comportamiento en el ratón en los cuales se observó un ligero retraso cognitivo en forma de deficiencia en el aprendizaje espacial y en la memoria, mediante el empleo del laberinto de agua de Morris y otras pruebas de aprendizaje de posición espacial (Bakker y cols., 1994; Kooy y cols., 1996; D'Hooge y cols., 1997; Paradee y cols., 1999; Dobkin y cols., 2000; Peier y cols., 2000; Van Dam y cols., 2000; Mineur y cols., 2002; Gálvez y cols., 2005).

También se han realizado pruebas para medir la exploración, hiperactividad, ansiedad, aprendizaje condicionado y agresión (Bakker y cols., 1994; Kooy y cols., 1996; D'Hooge y

cols., 1997; Paradee y cols., 1999; Peier y cols., 2000; Van Dam y cols., 2000; Minuer y cols., 2002). En todos estos estudios se observó un incremento en la actividad y en el comportamiento exploratorio de los ratones *Fmr1*-KO.

Otros estudios han puesto de manifiesto un déficit en la respuesta al miedo condicionado en los ratones *Fmr1*-KO (Paradee y cols., 1999), además de mostrar una hiperactividad importante posiblemente por la baja habituación del animal cuando es colocado en un nuevo entorno (Zhang y cols., 1995). Estos animales parecen ser más susceptibles a presentar episodios epilépticos espontáneos mediante la estimulación con sonidos de baja frecuencia, lo que podría indicar un incremento de excitabilidad cortical debido a la falta de FMRP (Nielsen y cols., 2002).

En cuanto a los cambios ultraestructurales presentes en humanos a nivel de las espinas dendríticas también fueron observados en los ratones *Fmr1*-KO. Las espinas dendríticas de las células piramidales en la corteza cerebral del ratón *Fmr1*-KO son más largas, sinuosas y densas que el ratón WT (Comery y cols., 1997). Esta morfología atípica en el modelo animal es similar en los pacientes con el síndrome (Comery y cols., 1997; Nimchinsky y cols., 2001). Las espinas se muestran generalmente más largas, asemejándose a las espinas inmaduras, y con un incremento en la densidad de las mismas.

Comery y sus colaboradores en 1997 sugirieron que la ausencia de FMRP podría estar implicada en la maduración y elongación de las espinas dendríticas, mientras que Nimchinsky y sus colaboradores en 2001 indicaron que una maduración anormal de las espinas dendríticas en los primeros días de la etapa postnatal podría estar afectando a la sinaptogénesis, es decir, a la formación de las sinapsis entre neuronas. Estas anomalías en las espinas dendríticas se muestran más pronunciadamente en la corteza somatosensorial durante el período en el cual se produce una mayor sinaptogénesis en esta región (White y cols., 1997). Por lo tanto, parece posible que FMRP tenga un papel importante en la sinaptogénesis. Alteraciones en la sinaptogénesis podrían dar lugar a déficit cognitivo por un incorrecto establecimiento de las conexiones neuronales (Nimchinsky y cols., 2001).

A pesar del incremento en el conocimiento acerca de la función de FMRP y de las proteínas asociadas, los mecanismos que dan lugar a las anomalías presentes en este síndrome son aún desconocidos. Las diferencias en determinadas proteínas relacionadas con FMRP entre los ratones WT y los *Fmr1*-KO nos ayudarán a una mejor comprensión de lo que está ocurriendo en ausencia de FMRP.

10. Estudios en el cerebro anterior de ratones *Fmr1*-KO

Hoy en día son muchas las investigaciones sobre el síndrome X-Frágil a nivel del cerebro anterior utilizando como modelo de investigación al ratón *Fmr1*-KO.

Son numerosos los estudios en ratones *Fmr1*-KO que presentan alteraciones en el hipocampo a nivel dendrítico (Braun y Segal, 2000; Segal y cols., 2003; Antar y cols., 2006; Grossman y cols., 2006; Gross y cols., 2010; Levenga y cols., 2011; Swanger, 2011), también se han encontrado cambios en las espinas dendríticas a nivel de la amígdala en este mismo modelo animal (Qin y cols., 2011).

Sin embargo, en el caso del tálamo la mayoría de los estudios han sido dirigidos a las posibles alteraciones de las conexiones tálamo-corticales, donde se han observado anomalías en estas conexiones en los ratones *Fmr1*-KO (Harlow y cols., 2010; Gibson y cols., 2008).

Los estudios en el cerebro anterior de ratones *Fmr1*-KO se han centrado mayoritariamente en alteraciones a nivel postsináptico que darían lugar a disfunciones en la plasticidad a largo plazo (Huber y cols., 2002), a pesar de que existían evidencias de que la pérdida de FMRP afectaba tanto a nivel postsináptico como presináptico (Brown y cols., 2001; Miyashiro y cols., 2003; Liao y cols., 2008; Christie y cols., 2009). Hasta hace poco tiempo se consideraba la regulación en la traducción local del ARNm de proteínas dendríticas como función principal de FMRP (Bassell y Warren, 2008; Huber y cols., 2002). Hoy en día son cada vez más los estudios sobre este síndrome en busca de alteraciones a nivel presináptico.

11. Últimos avances en la investigación del síndrome X-Frágil

Recientemente se están realizando estudios que van enfocados a posibles alteraciones a nivel presináptico, ya que FMRP parece estar involucrada en estos procesos presinápticos (Brown y cols., 2010).

Los recientes estudios sobre la función de FMRP apuntan a sitios de actuación fuera del compartimento dendrítico. Se ha localizado, mediante microscopía electrónica, la proteína FMRP en axones y terminales presinápticos (Christie y cols., 2009; Akins y cols., 2012); se ha encontrado una amplia variedad de ARNm regulado por FMRP que da lugar a proteínas localizadas en los terminales presinápticos (Brown y cols., 2001; Miyashiro y cols., 2003; Darnell y cols., 2011); se ha observado que los niveles de muchas proteínas presinápticas se ven afectados por la pérdida de FMRP (Liao y cols., 2008; Klemmer y cols., 2011); y se han encontrado cambios en el tamaño del conjunto de las vesículas sinápticas y en la cinética de reciclaje de estas vesículas en los terminales del hipocampo de los ratones *Fmr1*-KO (Deng y cols., 2011). Estos son algunos de los recientes hallazgos que sugieren que algunas de las principales anomalías neuronales atribuidas a la pérdida de FMRP podrían tener lugar a nivel presináptico.

FMRP no se limita sólo a controlar la traducción de proteínas, sino que actúa regulando directamente proteínas integrales de membrana a través de un vía independientes de la traducción. Parece ser que FMRP se une a determinados canales en la membrana regulando el flujo de determinados iones (Brown y cols., 2010; Zhang y cols., 2012). Esto ha sido corroborado con varios estudios en los cuales se ha observado un acoplamiento entre FMRP y la subunidad $\beta 4$ de los canales de potasio BK dependientes de calcio. La ausencia de FMRP en los terminales presinápticos y por tanto la ausencia de la interacción con los canales de potasio podría dar lugar a anomalías relacionadas con la liberación del neurotransmisor y con la plasticidad sináptica a corto plazo (Contractor, 2013; Deng y cols., 2013).

Son necesarios más estudios particularmente dirigidos a comprender cómo la falta de FMRP altera las proteínas a nivel presináptico y cómo estos cambios proteicos dan lugar a un desequilibrio en la excitación e inhibición que como consecuencia producen las anomalías típicas de las personas que presentan este síndrome.

El estudio de proteínas marcadoras de grupos de neuronas específicos en ratones *Fmr1*-KO, junto con el estudio de proteínas claves en la liberación de los neurotransmisores a nivel presináptico podrían aportar información acerca de lo que está ocurriendo en el prosencéfalo en ausencia de la proteína FMRP y por tanto aportar datos en la investigación sobre el síndrome X-Frágil.

12. Marcadores neuroquímicos de neuronas GABAérgicas



Las diferentes subpoblaciones GABAérgicas presentes en el cerebro anterior de vertebrados expresan de forma diferencial diversos tipos de marcadores neuroquímicos, entre los que se encuentran las proteínas ligadoras de calcio: calbindina, calretinina y parvalbúmina y la sintasa del óxido nítrico (Gulyás y cols., 1991; Dávila y col., 1991, 1993, 1995, 1997; Martínez-Guijarro y Freund, 1992; Valtschanoff y cols., 1993; Gabbott y Bacon, 1995; Freund y Buzsáki, 1996; Yan y cols., 1996; Kempainen y Pitkanen, 2000; Guirado y cols, 2003). La elevada solubilidad de estas moléculas les permite estar presentes en todo el citosol, incluso en las dendritas distales y axones, permitiendo de esta forma el estudio de la morfología celular y de la integración sináptica. Además, la expresión característica restringida a determinadas poblaciones celulares constituye una poderosa herramienta para el establecimiento de límites precisos entre las diferentes regiones cerebrales, así como para la definición de subunidades morfológicas y funcionales (Braun, 1990; Celio, 1990; Baimbridge y cols., 1992, Vincent y Kimura, 1992; Brüning, 1993; Veenman y Reiner, 1994; Dávila y cols., 2005; Legáz y cols., 2005).

Las interneuronas que presentan estos marcadores neuroquímicos desempeñan un

papel fundamental modulando y sincronizando la actividad de las neuronas principales, y su alteración está relacionada con desórdenes de ansiedad, con epilepsias del lóbulo temporal (en modelos animales de esta enfermedad) y con esquizofrenia (Fite, 2000; Benes y Berretta, 2001; Pillai-Nair y col., 2005).

12.1 Proteínas ligadoras de calcio

Las proteínas ligadoras de calcio juegan un papel fundamental en el mantenimiento de las concentraciones óptimas de calcio intracelular, esencial en la regulación de numerosos procesos celulares, incluyendo la regulación de canales iónicos y la liberación de los neurotransmisores. La presencia de estas proteínas durante el desarrollo temprano ha sido asociada con procesos de migración celular y con el crecimiento de las prolongaciones sinápticas (Enderlin y cols., 1987; Hendrickson y cols., 1991; Andressen y cols., 1993; Komuro y Rakic, 1996), mientras que las alteraciones en los niveles de estas proteínas conducen a disfunciones y muerte celular (Schanne y cols., 1979; Farber, 1981; Jancsó y cols., 1984; Siesjö, 1986; Deshpande y cols., 1987; Choi, 1988)

Diversos estudios inmunohistoquímicos han demostrado la participación de estas proteínas en neuropatologías tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Guentchev y cols., 1997), la esquizofrenia (Beasley y Reynolds, 1997), la epilepsia (DeFelipe, 1999), la encefalitis por SIDA (Masliah y cols., 1995) y el Alzheimer (Heizman y Braun, 1992; Leuba y cols., 1998).

Se han relacionado las variaciones en algunas de estas proteínas ligadoras de calcio con la falta de FMRP y por tanto con el síndrome X-Frágil (Selby y cols., 2007; Real y cols., 2011; Giráldez-Pérez y cols., 2013).

El primer estudio que mostró alteraciones significativas en las interneuronas GABAérgicas que expresaban proteínas ligadoras de calcio en ratones *Fmr1*-KO a nivel de la corteza somatosensorial fue el realizado por Selby y sus colaboradores en 2007 donde se observó una reducción de aproximadamente el 20% de la interneuronas que expresaban parvalbúmina en los ratones *Fmr1*-KO en comparación con ratones WT, no encontrando

diferencias ni en las neuronas que expresaban calbindina, ni en las que expresaban calretinina.

En nuestro grupo de investigación se realizó un estudio a nivel del hipocampo en ratones *Fmr1*-KO donde se encontraron diferencias significativas a nivel de la capa piramidal de CA1 y de la capa granular del giro dentado en las neuronas que expresaban calbindina. En este estudio se observó un menor número de células inmunorreactivas para calbindina en los ratones *Fmr1*-KO en comparación con los ratones WT (Fig. 5; Real y cols., 2011).

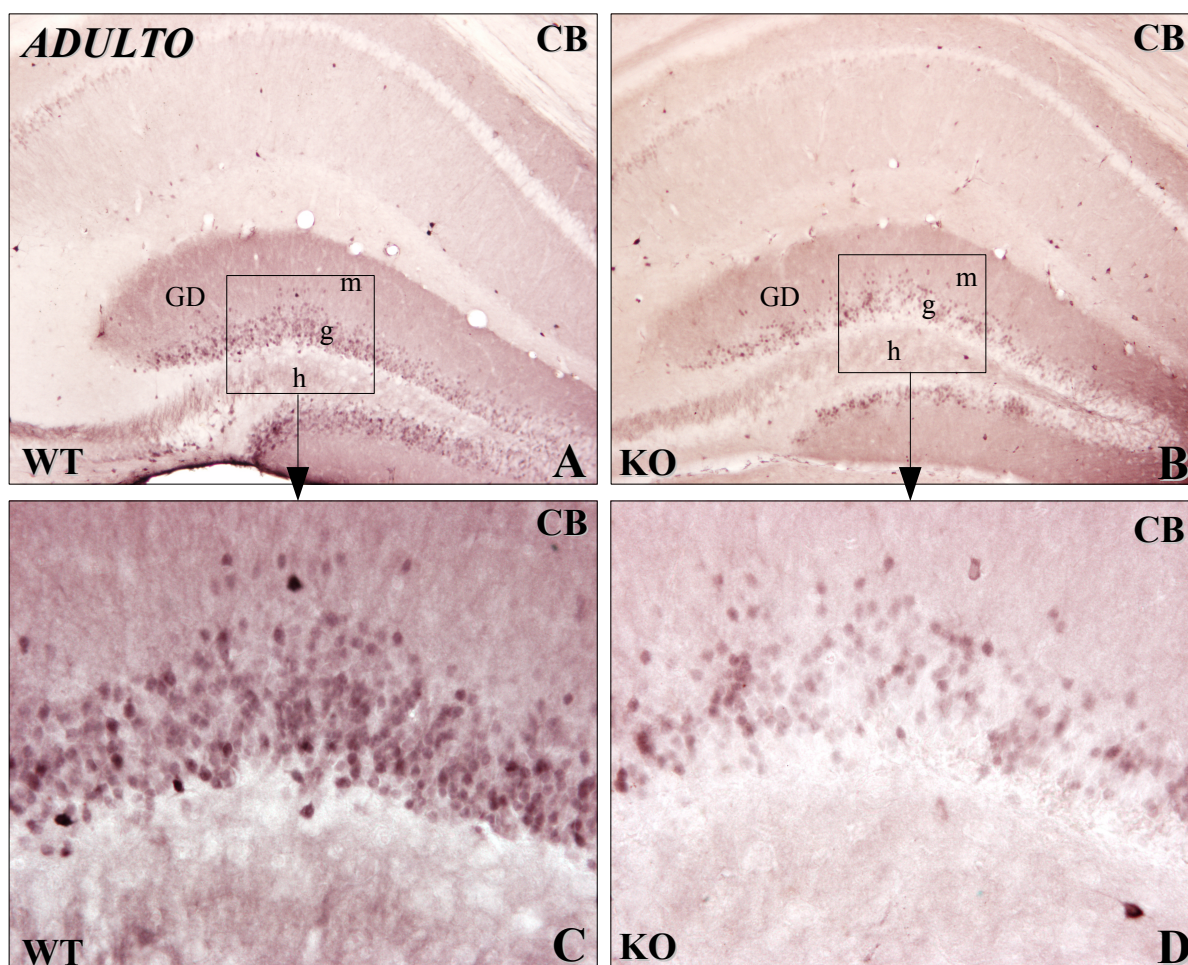


Figura 5. Microfotografía de secciones transversales del telencéfalo de ratones machos adultos. Se observa inmunoreactividad para calbindina (CB) en el hipocampo de ratones silvestres (WT) a la izquierda y de ratones knock-out para *Fmr1* (*Fmr1*-KO) a la derecha. A, C: Se aprecian células CB-inmunorreactivas (CB-IR) principalmente en la capa granular de ratones WT. B, D: Presencia de neuronas CB-IR en la misma capa para ratones *Fmr1*-KO. C, D: Se observa menos CB-IR en *Fmr1*-KO que en WT. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio. Aumentos: A, B = 100x; C, D = 400x.

Parte de los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han dado lugar a una publicación en relación a la expresión de calbindina en ratones *Fmr1*-KO a nivel del

tálamo dorsal, donde se observó un número de células menor en el tálamo dorsal de los ratones machos *Fmr1*-KO en relación a los ratones machos WT, no encontrándose diferencias entre los ratones hembras de ambos genotipos (Giráldez-Pérez y cols., 2013).

Cada vez existen más evidencias experimentales y clínicas que indican que la patofisiología de algunas enfermedades y desórdenes neurológicos están relacionadas con alteraciones en el desarrollo de las neuronas GABAérgicas (Levitt y cols., 2004; Arnold y cols., 2005). Por tanto el estudio de las subpoblaciones de neuronas GABAérgicas en ratones *Fmr1*-KO podría aportar información sobre posibles alteraciones en el síndrome X-Frágil.

12.2 La sintasa del óxido nítrico

El óxido nítrico es un neurotransmisor gaseoso esencial en el establecimiento de determinados tipos de sinapsis químicas y en eventos de plasticidad neuronal. Su síntesis, a partir de L-arginina, es catalizada por la sintasa del óxido nítrico en presencia de calcio y calmodulina. La distribución de esta sintasa del óxido nítrico es característica de diferentes regiones cerebrales, hallándose generalmente asociada a interneuronas de carácter GABAérgico (Valtschanoff y cols., 1993., Gabbott y Bacon, 1995; Yan y cols 1996). Esta molécula ha sido asociada a diversas enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington o el Parkinson (Moreno-López y González-Forero, 2006) y recientemente al síndrome X-Frágil (Xu y cols., 2012).

En el reciente estudio realizado por Xu y sus colaboradores se observaron diferencias en el hipocampo de los ratones *Fmr1*-KO en relación a los ratones WT en determinados estadios postnatales. Se observó una menor expresión de nNOS en P21 a nivel del hipocampo en los ejemplares *Fmr1*-KO que se correlacionó con una menor cantidad de proteína nNOS. Estos resultados parecen sugerir que los ratones *Fmr1*-KO presentan un retraso temporal en el incremento requerido de nNOS en P21. Este retraso coincide en el tiempo con la espinogénesis y la sinaptogénesis en el hipocampo y por tanto esta falta de nNOS podría alterar la formación correcta de las espinas dendríticas y de las sinapsis.

Por lo tanto, las posibles diferencias en la nNOS entre el cerebro anterior de los ratones *Fmr1*-KO y WT nos aportará información sobre las posibles causas que dan lugar al síndrome X-Frágil.

13. Transportadores vesiculares de glutamato como marcadores de neuronas glutamatérgicas

Hasta ahora se han caracterizado tres isoformas de estos transportadores que mantienen aproximadamente un 70% de homología en su estructura (Shigeri y cols., 2004): el transportador vesicular de glutamato tipo 1 (VGLUT1), el tipo 2 (VGLUT2) y el tipo 3 (VGLUT3).

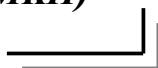
VGLUT1 y VGLUT2 se expresan exclusivamente en el neuropilo a diferencia de VGLUT3 que es el único que se distingue claramente en somas neuronales (Mestikawy y cols., 2011). VGLUT1 y VGLUT2 son considerados buenos marcadores de neuronas glutamatérgicas, ya que están presentes en todas las población de neuronas excitadoras, expresando uno o ambos transportadores vesiculares (Fremeau y cols., 2001).

VGLUT1 es sintetizado principalmente en la corteza, giro dentado y capas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, en algunos núcleos del tálamo y en la capa granular del cerebelo (Fujiyama y cols., 2001; El Mestikawy y cols., 2011). VGLUT2, por el contrario, es sintetizado en el tálamo, hipotálamo, tronco cerebral y en menor medida en algunas zonas de la corteza parietal (Fujiyama y cols., 2001). Existe una distribución complementaria de ambos transportadores (Fremeau y cols., 2001), aunque también existen estudios que indican la coexpresión de ambos transportadores en algunas zonas, por ejemplo en el hipocampo, donde se ha demostrado que pueden colocalizar no sólo en la misma neurona sino incluso en el mismo terminal sináptico (Herzog y cols., 2006).

Algunos estudios indican que el nivel de expresión de los VGLUTs puede alterarse en determinadas patologías. Por ejemplo, las drogas antidepresivas inducen un incremento de VGLUT1 en corteza e hipocampo, mientras que en pacientes esquizofrénicos VGLUT1 disminuye en la corteza y la expresión de VGLUT2 aumenta en el tálamo (Takamori, 2006). También se ha detectado un incremento de VGLUT1 y VGLUT2 en muestras humanas con la enfermedad de Parkinson (Kashani y cols., 2007). Los ratones que no expresan VGLUT2 presentan alteraciones conductuales como en la respuesta al dolor o en el ocultamiento de bolos de comida. Estos cambios en la conducta se relacionan con una disminución en la amplitud de la respuesta postsináptica en cultivos de neuronas talámicas (Moechars, 2006). Además, la sobreexpresión del homólogo de *Drosophila* de VGLUT1, D-VGLUT1 mediante vectores virales genera una alta tasa de mortalidad neuronal en estas moscas (Daniels y cols., 2011).

Por su relación con determinadas enfermedades neurológicas y por estar presente en todas las las neuronas glutamatérgicas hemos considerado a VGLUT1 y VGLUT2 dos buenos candidatos para el estudio de las neuronas excitadoras en ratones *Fmr1*-KO.

14. Proteína quinasa II alfa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII)



El terminal presináptico contiene una gran variedad de proteínas, muchas de éstas contribuyen al control preciso de la liberación de los neurotransmisores, que es fundamental para el buen funcionamiento del sistema nervioso. Entre las proteínas presinápticas que regulan la liberación de los neurotransmisores está la proteína quinasa II alfa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMKII), un componente esencial que interviene en el control de la potenciación y la plasticidad sináptica a través de interacciones con otros componentes presinápticos (Wang, 2008).

La CaMKII es una proteína que se encuentra altamente concentrada en el cerebro, donde se cree que desempeña un papel importante en la síntesis y liberación de los neurotransmisores, la regulación de los canales de calcio, en la estructura del citoesqueleto, en el transporte axonal, en la plasticidad sináptica y en la expresión génica (Hanson y Schulman, 1992a; Braun y Schulman, 1995).

Esta proteína presenta 4 isoformas, siendo las isoformas alfa y beta específicas del cerebro (Bayer y cols., 1999). La pérdida de la isoforma alfa en ratones “knock-out” conduce al deterioro de la memoria espacial y de la potenciación a largo plazo, por lo que las otras isoformas no compensan su ausencia (Bayer y cols., 1999), siendo la CaMKII α esencial en el cerebro.

Parece ser que CaMKII α no juega ningún papel en el desarrollo embrionario, realizando su función durante el desarrollo postnatal y en el adulto (Silva y cols., 1992a; Bayer y cols., 1999). La expresión de las isoformas de CaMKII durante el desarrollo embrionario y postnatal fueron estudiadas mediante Northern Blots y se obtuvieron transcritos de CaMKII α por primera vez en postnatales de 1 día de edad (Silva y cols., 1992a; Bayer y cols., 1999).

Por otro lado, una característica esencial que presenta CaMKII es la capacidad de formar holoenzimas. Estas holoenzimas constan de 12 subunidades que forman dos anillos hexaméricos apilados, siendo esta estructura clave para la autofosforilación (Kolodziej y cols., 2000; Morris y Török 2001). Cada subunidad presenta 4 dominios: uno catalítico, uno regulador, un segmento variable y un dominio de asociación. El dominio regulador se divide en dominio inhibitorio y dominio de unión a calmodulina (Fig. 6) (Griffith, 2008).

La actividad de CaMKII puede ser controlada por una autofosforilación, que en el caso de la isoforma alfa tendría lugar a nivel del dominio inhibitorio en la treonina 286. Ésta puede permanecer activa incluso después de volver a los niveles de calcio basales (Miller y cols., 1988; Fong y cols., 1989; Hanson y cols., 1989; Waxham y cols., 1990; Ohsako y cols.,

1991).

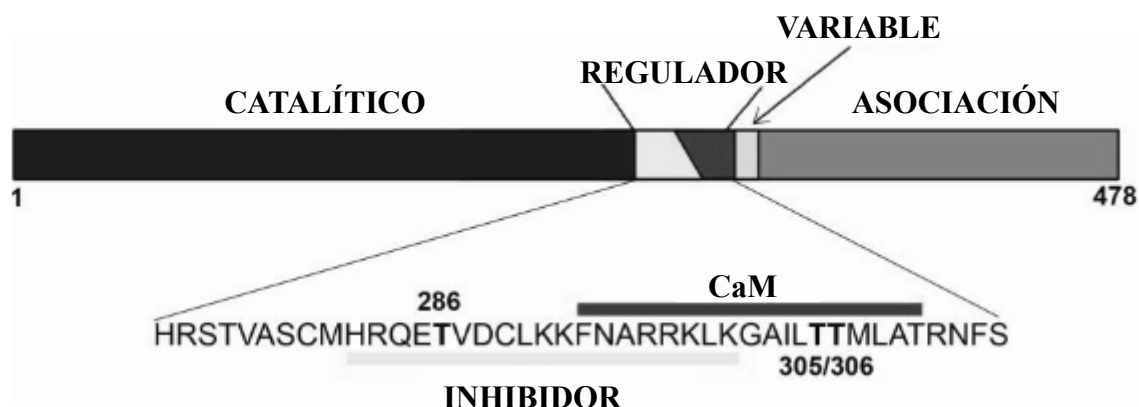


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de CaMKII α donde se observa los distintos dominios. Dentro del dominio regulador está el dominio autoinhibidor y el dominio de unión Ca²⁺/calmodulina. Cuando la autofosforilación tiene lugar en la treonina 286 la proteína está activa, mientras que cuando la autofosforilación tiene lugar en treonina 305 y 306 se bloquea y no puede ser activada (modificado de Wang, 2008).

CaMKII se localiza de forma abundante en el terminal presináptico (Walaas y cols., 1989) y generalmente asociada a vesículas sinápticas (Ouimet y cols., 1984). Algunos estudios sugieren que a nivel presináptico actúa como un regulador positivo de la transmisión sináptica. Los primeros estudios que demostraban la implicación de CaMKII como regulador positivo de la transmisión sináptica tuvieron lugar en el axón gigante del calamar, donde se observó que la inyección de CaMKII en el terminal presináptico aumentaba la amplitud y el ritmo del potencial de acción, lo que sugería una mayor liberación del neurotransmisor (Llinás y cols., 1985; Llinás y cols., 1991). Los resultados obtenidos con posterioridad en otros estudios apoyaban esta idea.

En sinaptosomas purificados a partir de corteza de ratas se observó que un aumento de CaMKII autofosforilada incrementaba la liberación de glutamato, mientras que cuando se inhibía CaMKII disminuía la liberación del mismo (Nichols y cols., 1990). Estudios realizados en rodajas de cerebro de rata a nivel del hipocampo mediante inyección de inhibidores de CaMKII permitieron observar cómo en la capa CA1 se incrementaba la liberación del neurotransmisor glutamato (Waxham y cols., 1993). En neuronas del hipocampo de ratón cultivadas se observó cómo la incorporación de un inhibidor de CaMKII aumentaba el glutamato liberado, aumentando la corriente sináptica y el número de botones presinápticos activos (Ninan y Arancio, 2004). En *Xenopus*, los estudios con un inhibidor de

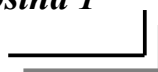
CaMKII específico del terminal presináptico demostraron un efecto estimulador sobre la corriente sináptica (He y cols., 2000). Y también, en *Drosophila*, los estudios con inhibidores de CaMKII bloqueaban la motilidad de las vesículas sinápticas (Shakiryanova y cols., 2007).

Todos los estudios expuestos anteriormente sugieren que CaMKII, a nivel presináptico, mejora la motilidad de las vesículas sinápticas, así como la liberación del neurotransmisor.

CaMKII a nivel presináptico también juega un papel en la potenciación a largo plazo (LTP). En diferentes estudios realizados sobre este aspecto en neuronas motoras y sensoriales de *Aplysia* (Jin y Hawkins, 2003), en neuronas de CA3 de rebanadas de hipocampo de rata (Lu y Hawkinsy, 2006) y en neuronas en cultivo del hipocampo de ratón (Ninan y Arancio, 2004), se ha demostrado que LTP puede ser reducido tras la inyección de un inhibidor de CaMKII en la neurona presináptica. Por el contrario la inyección de CaMKII α en la neurona presináptica produce un aumento del LTP (Ninan y Arancio, 2004).

Dentro del terminal nervioso el principal sustrato para CaMKII es sinapsina 1 (Greengard y cols., 1993), una proteína asociada a vesículas sinápticas que será descrita en el apartado siguiente por su implicación en este trabajo. La traducción de ambas proteínas está regulada por FMRP (Darnell y cols., 2011).

15. Proteína vesicular sinapsina 1



Las sinapsinas son proteínas asociadas a vesículas sinápticas involucradas en la liberación del neurotransmisor (Lonart y Simsek-Duran, 2006).

El genoma de mamíferos presenta tres genes distintos que codifican para sinapsinas (sinapsina 1, 2 y 3). Entre estas sinapsinas la sinapsina 1 es la más abundante en las neuronas maduras (Chin y cols., 1995; Ferreira y cols., 2000).

La sinapsina 1 tiene dos isoformas (1a y 1b), estas dos isoformas difieren sólo en el terminal carboxilo. Sinapsina 1a y 1b se pueden dividir en varios dominios estructurales. Los dominios A, B y C están también presentes en las sinapsinas 2 y 3, mientras que el dominio D es único de la sinapsina 1 (Fig. 7). Los terminales carboxilo distintos de sinapsina 1a y 1b se denominan dominios E y F respectivamente (Fig. 7). En el dominio D se encuentran los sitios fosforilables por CaMKII (Czernik y cols., 1987).

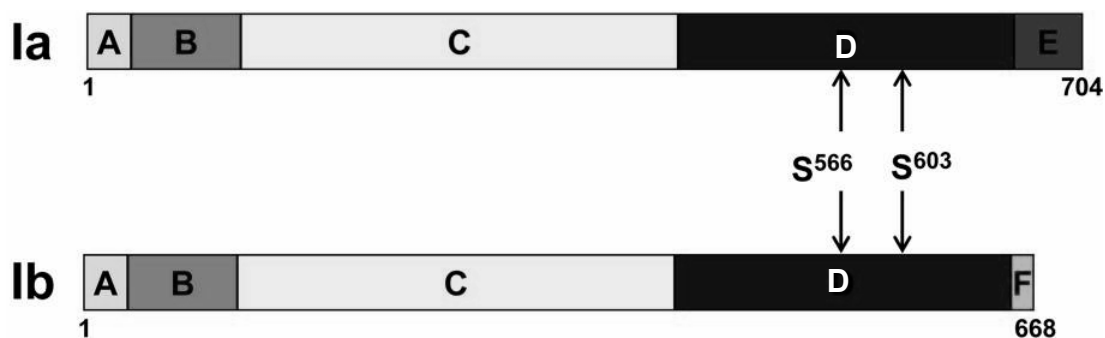


Figura 7. Representación esquemática de la sinapsina 1a y 1b y de los dominios que las conforman. Las dos isoformas surgen del corte y empalme alternativo de un único transcrito y sólo se diferencia en el terminal carboxilo. Cada isoforma contiene cinco dominios. Los dominios A, B, C y D son comunes en las sinapsinas 1a y 1b, mientras que los dominios E y F son únicos para 1a y 1b respectivamente. CaMKII fosforila a las sinapsina 1 en la serina 566 y en la serina 603 en el dominio D (Czernik y cols., 1987). (modificado de Wang, 2008)

La sinapsina 1 parece ser la primera proteína implicada en la función presináptica de CaMKII, siendo la única sinapsina que puede ser fosforilada por CaMKII (Linás y cols., 1985; Nichols y cols., 1990; Nichols y cols., 1992). Se localiza casi exclusivamente en los terminales nerviosos y la gran mayoría de los terminales presinápticos contienen sinapsina 1 (Huttner y cols., 1983). Los estudios bioquímicos muestran que esta proteína está asociada con las vesículas sinápticas y constituye aproximadamente el 6% del total de las proteínas vesiculares (Huttner y cols., 1983; De Camilli y cols., 1983). La sinapsina 1 también se asocia con la proteína del citoesqueleto actina (Bähler y Greengard, 1987). La unión de sinapsina 1 a la vesícula sináptica mediante la unión a la actina está regulada por la fosforilación de CaMKII. Sinapsina 1 se encuentra desfosforilada cuando está unida a la actina y a las vesículas sinápticas, siendo la fosforilación la que provoca que se desvincule de ambas (Bähler y Greengard, 1987; Benfenati y cols., 1992).

La hipótesis principal es que esta proteína actúa manteniendo unidas al conjunto de las vesículas sinápticas entre sí mediante la unión a la actina. Esta unión se interrumpe cuando la

sinapsina 1 es fosforilada por CaMKII, resultando un mayor número de vesículas disponibles para ser liberadas (Greengard y cols., 1993).

Durante el desarrollo, la expresión de sinapsina 1 se correlaciona temporal y topográficamente con la sinaptogénesis tanto *in vitro* (Bixby y Reichardt, 1985; Weiss y cols., 1986) como *in vivo* (De Camilli y cols., 1983; DeGennaro y cols., 1983; Levitt y cols., 1984; Mason, 1986; Moore y Berstein, 1989; Bergman y cols., 1992), por lo que se ha sugerido que la sinapsina 1 puede participar en la maduración funcional de las sinapsis (Lu y cols., 1992). Todos estos estudios sugieren que sinapsina 1 es un indicador preciso de la formación de sinapsis y que ésta podría ser utilizada como herramienta para el estudio de la sinaptogénesis en el sistema nervioso en desarrollo.

Alteraciones en los niveles de sinapsina 1 pueden estar relacionados con determinadas enfermedades neuronales como el síndrome de Rett (Ferlini y cols., 1990; Curtis y cols., 1993), trastornos epilépticos (García y cols., 2004; Etholm y cols., 2013) y trastornos del espectro autista (Fassio y cols., 2011; Greco y cols., 2013). Se han estudiado familias con autismo y ataques epilépticos que presentan mutaciones en el gen sinapsina 1 (Fassio y cols., 2011; García y cols., 2004). Se analizó una familia con mutación en este gen y se observó que presentaba epilepsia síndrómica asociada con retraso mental, macrocefalia y alteraciones del comportamiento (García y cols., 2004). Por otro lado, en otra familia, una mutación distinta de esta proteína dio lugar a personas con trastornos epilépticos y desórdenes autistas (Fassio y cols., 2011). Esto sugiere que sinapsina 1 presenta un papel causal en la patogenia de ambas enfermedades (epilepsia y autismo).

Como hemos comentado, la sinapsina 1 está relacionada con enfermedades neuronales y sugerimos que podría estar relacionada con el síndrome X-Frágil, ya que pertenece a una familia de genes sinápticos esenciales en la regulación de la formación de sinapsis, en el equilibrio entre la excitación e inhibición y en la reorganización sináptica dependiente de la actividad. Además los estudios de Darnell ponen de manifiesto que la sinapsina 1 está bajo la influencia de FMRP (Darnell y cols., 2011). Por todo esto hemos considerado fundamental el estudio de esta proteína en ratones *Fmr1*-KO para el mejor entendimiento del síndrome X-Frágil.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS



Planteamiento

En el síndrome X-Frágil son numerosos los estudios centrados en las posibles alteraciones en los circuitos sinápticos; algunos de estos estudios han revelado cambios en el sistema glutamatérgico de los ratones *Fmr1*-KO (Costa y cols, 2012; Cruz-Martín, 2012), mientras que otros ponen de manifiesto alteraciones en el sistema GABAérgico de estos ratones (El Idrissi y cols., 2005; Olmos-Serrano., 2010, 2011). Los estudios de los sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos, por tanto, son claves para una correcta comprensión del funcionamiento de los circuitos neuronales en el síndrome X-Frágil.

Por esta razón, en este proyecto de tesis doctoral se pretende realizar un estudio comparado del cerebro anterior de ratones adultos WT y de ratones *Fmr1*-KO como modelo del síndrome X-Frágil analizando una serie de marcadores neuronales en ambos genotipos, tales como las proteínas ligadoras de calcio calbindina, calretinina y parvalbúmina, y la sintasa del óxido nítrico como marcadores presentes en las neuronas GABAérgicas, y los transportadores vesiculares de glutamato tipo 1 y tipo 2 como marcadores de neuronas glutamatérgicas, con el fin de evaluar la existencia de diferencias de estos marcadores entre el cerebro anterior de ratones *Fmr1*-KO adultos y el cerebro de ratones WT adultos.

La mayoría de los estudios sobre este síndrome han sido enfocados a posibles alteraciones a nivel postsináptico; sin embargo, hoy en día son cada vez mayores los indicios de posibles perturbaciones a nivel presináptico. En el primer estudio de nuestro grupo de investigación sobre el síndrome X-Frágil encontramos diferencias relacionadas con la calbindina a nivel del hipocampo, y planteábamos la posibilidad de que estas diferencias podrían afectar al componente presináptico (Real y cols., 2011), por lo que hemos considerado clave el estudio a nivel del terminal presináptico.

Así, en este trabajo pretendemos estudiar de forma comparada el cerebro anterior de ratones *Fmr1*-KO y de ratones WT mediante el análisis de dos proteínas presentes en el terminal presináptico, la CaMKII α y la sinapsina 1, por estar implicadas en la liberación del

neurotransmisor y por estar su traducción regulada por FMRP. Este estudio comparativo a nivel presináptico se pretende realizar a lo largo del desarrollo postnatal hasta ratones adultos, ya que alteraciones en la liberación del neurotransmisor a lo largo del desarrollo podrían dar lugar a defectos neurológicos irreversibles como los presentes en el síndrome X-Frágil. También será analizada la expresión de FMRP en determinados estadios del desarrollo postnatal de ratones WT para un mejor entendimiento del desarrollo postnatal en ratones *Fmr1*-KO desprovistos de FMRP.

Estos estudios constituyen un paso más para el mejor conocimiento del desarrollo del cerebro anterior de ratones *Fmr1*-KO, y así poder entender las bases de los procesos patológicos que están presentes en el síndrome X-Frágil.

Objetivos

[1.] Estudio comparado de la expresión de las proteínas ligadoras de calcio calbindina, calretinina y parvalbúmina, y de la sintasa del óxido nítrico como principales marcadores de neuronas GABAérgicas en el cerebro anterior de ratones adultos WT y *Fmr1*-KO.

[2.] Estudio comparado de la expresión de los transportadores vesiculares tipo 1 y tipo 2 como principales marcadores presentes en neuronas glutamatérgicas en el cerebro anterior de ratones adultos WT y *Fmr1*-KO

[3.] Estudio de la expresión de CaMKII α , de su forma activa p-CaMKII α y de su principal sustrato en el terminal presináptico la sinapsina 1, como proteínas claves involucradas en la liberación de los neurotransmisores en el terminal sináptico en el cerebro anterior de ratones adultos WT y *Fmr1*-KO.

[4.] Estudio del desarrollo postnatal del cerebro anterior de ratones *Fmr1*-KO y WT mediante el análisis de los patrones espacio-temporales de expresión de CaMKII α , p-CaMKII α , sinapsina 1 y FMRP.

MATERIAL Y MÉTODOS



1. Animales de experimentación

Para los distintos estudios que abarca este trabajo se seleccionaron un total de 162 ratones machos adultos con una edad comprendida entre 3 y 7 meses y de entre 25-30 g de peso, 98 ejemplares postnatales comprendidos entre el día de nacimiento hasta los 21 días de edad (P0, P1, P4, P7, P14, P18 y P21) y un total de 10 embriones de 18.5 días (E18.5) post coito.

Todos los ratones utilizados pertenecían a la especie *Mus musculus* de la cepa FVB-129 (Figura 8) de genotipo silvestre (WT) y de genotipo nulo al gen *Fmr1* denominado genéricamente *Fmr1*-nulo o knockout (*Fmr1*-KO). Todos los ejemplares utilizados en este trabajo se obtuvieron de cruces de hembras homocigotas con machos hemicigotos nulos para este gen (*Fmr1*⁻ o KO). Estos animales *Fmr1*-KO fueron creados mediante recombinación genética homóloga y fueron comprados en “The Jackson Laboratory”; el nombre específico de la cepa es FVB.129P2- *Fmr1*^{tm1Cgr} / J, siendo su número de referencia el 004624 (Fig. 8). Con el fin de crear nuestra propia colonia se partió de 6 ejemplares, 4 hembras (2 WT y 2 *Fmr1*-KO) y 2 machos (1 WT y 1 *Fmr1*-KO).



Figura 8. Ratón de la cepa FVB.129. La línea FVB y las distintas sublíneas de 129 han adquirido gran popularidad en las últimas dos décadas debido a que son las más adecuadas para la producción de ratones transgénicos y knock-out.

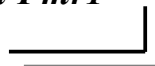
Durante los experimentos los animales fueron mantenidos como una colonia, bajo una temperatura ambiente de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, a una humedad relativa de $40 \pm 5\%$ y sometidos a fotoperiodos de luz-oscuridad de 12 horas con acceso libre a la comida (dieta SAFE A04, Panlab, Barcelona) y agua, en condiciones estándares de estabulación (Servicio de Estabulación de la Universidad de Málaga).

Para la obtención de los embriones y ejemplares postnatales se llevaron a cabo cruzamientos introduciendo en una jaula de cruce 2 hembras y 1 macho del mismo genotipo durante 24 horas. Transcurrido ese periodo de tiempo, se procedió a comprobar la formación del tapón mucoso en la vagina de la hembra, hecho que es tomado como indicador bastante fiable de la preñez. Se consideró E0 cuando se observó el tapón mucoso.

Los animales fueron destetados de la madre a los 21 días tras el nacimiento, siendo recolocados en grupos de 6-8 ratones por jaula, estando separados en todo momento los *Fmr1*-KO de los WT y las hembras de los machos. Con posterioridad fueron genotipados para el gen *Fmr1*.

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados conforme a la legislación Española para el uso y cuidado de animales de experimentación (BOE 252/34367-91, 2005) y a las directivas Comunitarias Europeas (86, 609, EEC).

2. Genotipación de ratones para el gen *Fmr1*



El genotipado tuvo lugar mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), según el protocolo publicado en Bakker y sus colaboradores en 1994.

2.1 Pasos importantes del genotipado

2.1.1 Extracción de ADN genómico

Para realizar la extracción de ADN genómico se partió de aproximadamente medio centímetro de cola de ratón y se le añadió 250 µl de tampón de extracción compuesto por Tris-HCl 100mM (pH 8.6), EDTA 5mM, SDS al 0.2%, NaCl 200mM y 200 µg/ml de Proteinasa K. Esta mezcla se deja a 56°C durante 24 horas en un baño de incubación.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente a máxima velocidad (15.000g). Una vez centrifugado se recogió el sobrenadante donde se encuentra el material genómico y se depositó en otro tubo. Al sobrenadante se le añadió 250 µl de isopropanol, se agitó y se metió durante 20 minutos a -20°C para que precipitara el ADN.

Una vez precipitado el ADN se centrifugó de nuevo a las mismas condiciones y se le eliminó el sobrenadante manteniendo el pellet, que es donde se encuentra el ADN. Se dejó secar bien antes de continuar. En último lugar se resuspendió el pellet en 50 µl de tampón TE 1x (Tris-EDTA; ver anexo) quedando las muestras listas para cargar. Se puso en cada reacción 1 µl de una dilución 1/10.

2.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR se utilizó el kit comercial (iProof™ HF Master Mix, Bio-Rad) compuesto por una solución tampón que lleva MgCl 3mM, la enzima iProof polimerasa 40U/ml, una mezcla de dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y estabilizadores. Se utilizaron cebadores (Genosys) cuyas secuencias se detallan en la tabla 1.

CEBADOR	SECUENCIA 5' - - - ► 3'	TIPO CEBADOR
oIMR2060	CAC GAG ACT AGT GAG ACG TG	KO
oIMR6734	TGT GAT AGA ATA TGC AGC ATG TGA	WT

Tabla 1. Secuencia de cebadores para la genotipación de ratones WT y *Fmr1*-KO.

La mezcla de los reactivos se preparó con los cebadores, la mezcla que contiene la polimerasa y el ADN, enrasando con agua estéril. Para la síntesis de ADNc se utilizó un termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal cycler). El detalle del programa de temperaturas, tiempos y ciclos se muestra a continuación (Tabla 2).

PASOS	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Activación de la enzima	98°C	30 segundos	1
Desnaturalización	98°C	10 segundos	x 35
Alineamiento	45-72°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión Final	72°C	10 minutos	1
Conservación	4°C	Indefinido	

Tabla 2. Detalle de los ciclos del termociclador y los diferentes pasos de temperatura.

2.1.3 Electroforesis en gel de agarosa

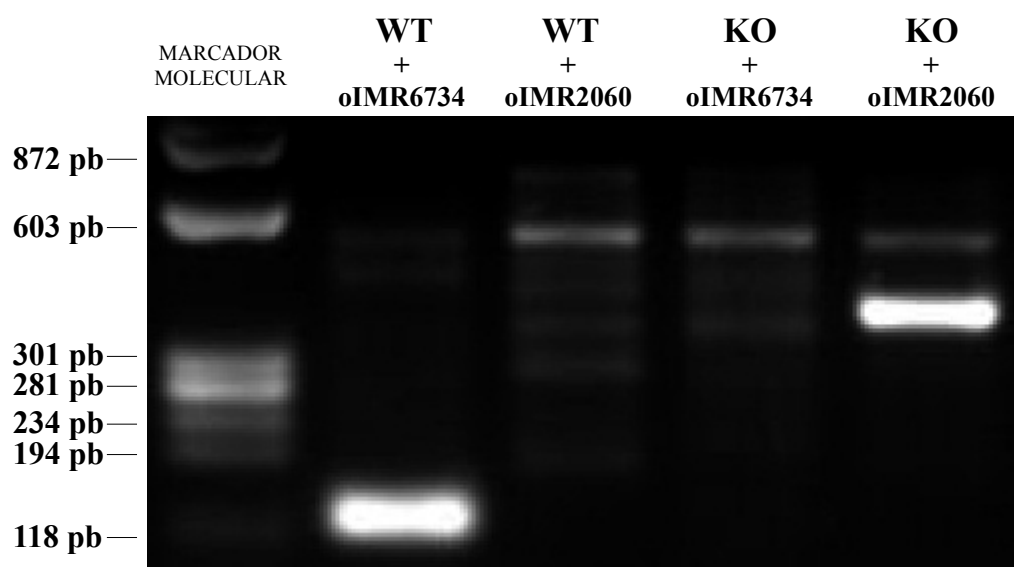


Figura 9. Gel de agarosa al 1.5%, revelado en cámara oscura con radiación UV. La banda correspondiente al producto de PCR de aproximadamente 130 pb corresponde a ratones silvestres (WT), esta banda solo aparece en el carril 1, porque es el único carril que presenta la muestra del ratón WT y el cebador para WT. Y la banda correspondiente al producto de PCR de 400 pb aproximadamente corresponde a ratones *Fmr1*-KO, por tanto sólo aparece en el carril 4, puesto que éste es el único que presenta la muestra del ratón *Fmr1*-KO y el cebador para *Fmr1*-KO.

Los productos de la PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA). En cada calle del gel se cargaron 15 µl del producto de PCR, mezclados con colorante (Sacarosa 7%, azul de bromofenol 0.04% y azul de xilenocianol 0.04%) y posteriormente se aplicó un voltaje de 60V durante 40 minutos. Los fragmentos de ADN se visualizaron con bromuro de etidio (1 µg/ml) en un transiluminador de luz ultravioleta (VilberLourmat CN-115). El marcador de peso molecular utilizado (Roche nº11449460001), abarca bandas entre 72 y 1353 pares de bases, dentro de las cuales se encuentran la banda del WT (131 pb) y la banda del *Fmr1*-KO (400 pb; Fig. 9).

3. Estudio quimioarquitectónico

Para la realización de este estudio se emplearon ejemplares adultos y postnatales P0, P7, P14, P18, P21. En todos los casos los animales fueron anestesiados con Ketamina (2 µl/g) y Xilacina (0.5 µl/g) y el método de fijación fue por perfusión vascular.

En primer lugar se realizó un lavado vascular con una solución de lavado, tampón fosfato salino (PBS) pH 7.3, 0.1M a 4°C, continuando con la solución fijadora: paraformaldehído al 4% en PB pH 7.3, 0.1M. El tiempo de la perfusión dependerá del estadio de desarrollo del ejemplar a analizar, siendo en el caso de los adulto de aproximadamente 1 hora de duración. Una vez terminada la perfusión se extrajo el cerebro y se llevó a cabo una postfijación por inmersión en paraformaldehído al 4% durante 24 horas a 4°C.

Una vez finalizado el periodo de postfijación los cerebros fueron encastrados en agar al 4% y se obtuvieron secciones transversales de 50 µm de grosor de cerebro adulto y de 70 µm en el caso de postnatales. Se empleó para ello un vibratomo modelo Leica VT 1000M. Una vez obtenidas las secciones se comenzó la técnica de inmunohistoquímica para el estudio quimioarquitectónico.

La técnica empleada para este estudio fue una inmunohistoquímica indirecta simple mediante el método de la avidina-biotina utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales

(Tabla 3).

Las moléculas que se han detectado en nuestro estudio son: las proteínas ligadoras de calcio calbindina (CB), parvalbúmina (PV) y la calretinina (CR), la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS), los transportadores vesiculares del glutamato (VGLUT1 y VGLUT2), la proteína quinasa II alfa dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKII α) y su forma fosforilada (p-CaMKII α), la proteína asociada a vesículas sinápticas sinapsina 1 (SYN1) y la proteína FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein; Tabla 3).

Anticuerpo	Animal de procedencia	Casa comercial y datos	Dilución IH / WB
Anti-calbindina (monoclonal)	Ratón	Sigma, código C9848, clon CB-955	1:2000/1:1000
Anti-calretinina (policlonal)	Conejo	Swant, código 7699/3H, lote 18299	1:2000/1:1000
Anti-parvalbumina (policlonal)	Conejo	Swant, código PV-28, lote 5,5	1:1000/1:1000
Anti-sintasa del óxido nítrico (nNOS) (policlonal)	Conejo	Sigma, código N7280, Aas 1409-1429	1:2000/1:1000
Anti-VGLIT1 (policlonal)	Cobaya	Millipore, código AB5905, lote 2061439	1:5000/1:1000
Anti-VGLUT2 (policlonal)	Cobaya	Millipore, código AB2251, lote 2041594	1:5000/1:1000
Anti-CaMKII α (policlonal)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, CaMKII α (L-15), sc-5391	1:1000/1:1000
Anti-pCaMKII α (policlonal)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, p-CaMKII α (Thr 286), sc-12886-R	1:300/1:1000
Anti-sinapsina1 (policlonal)	Conejo	Sigma, código S193 lote 120M1487	1:500/1:1000
Anti- β -Actina (monoclonal)	Ratón	Sigma, código A5441, clon AC-15	-/1:5000
Anti-FMR1 (policlonal)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, FMR1(H-120), sc-28739	1:500/1:1000

Tabla 3. Anticuerpos primarios empleados para la técnica inmunohistoquímica y para Western Blot, detallando las diluciones de trabajo utilizadas en cada caso.

3.1 Pasos importantes de la técnica inmunohistoquímica

3.1.1 Desactivación de la peroxidasa endógena

En este paso se incubaron las secciones en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y metanol al 10% en PBS pH 7.3, 0.1M durante 10 minutos con el fin de evitar una reacción falsa positiva por la actividad de la peroxidasa endógena presente en el tejido.

3.1.2 Preincubación

En este paso se incuban las secciones en una solución de suero al 10% de la especie que dona el anticuerpo secundario, Triton X-100 al 0.3% y azida sódica al 0.1% en PBS pH 7.3, 0.1M durante una hora. Con este proceso se intenta evitar uniones inespecíficas del anticuerpo secundario.

3.1.3 Incubación en anticuerpo primario

La incubación de las secciones en anticuerpo primario se realizaron, en la mayoría de los casos, durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación. Todos los anticuerpos primarios empleados en esta técnica de inmunohistoquímica fueron anticuerpos policlonales desarrollados en conejo, cabra o cobaya, exceptuando el anticuerpo contra calbindina que se trata de un anticuerpo monoclonal de ratón (Tabla 3). La solución del anticuerpo primario se realiza en PBS pH 7.3, 0.1M con 0.3% de Triton X-100, 0.1% de azida sódica y 5% de suero del animal donde esta desarrollado el anticuerpo secundario.

3.1.4 Incubación en anticuerpo secundario biotilnado

Las secciones se incubaron durante una hora en la solución de anticuerpo secundario biotilnado (Tabla 4), actuando de puente entre el anticuerpo primario y el complejo Estreptavidina-peroxidasa. La solución del anticuerpo secundario se realiza en PBS pH 7.3, 0.1M con 0.3% de Triton X-100 y 0.1% de azida sódica.

3.1.5 Incubación en Estreptavidina-peroxidasa

Las secciones fueron incubadas en Estreptavidina-peroxidasa (Sigma, E2886) a una dilución 1:2000 en PBS pH 7.3, 0.1M y Triton X-100 durante 1 hora.

Durante todo el proceso las secciones se mantuvieron en agitación continua y a temperatura ambiente. Se realizaron lavados en PBS pH 7.3, 0.1M entre las distintas incubaciones con excepción del paso entre la preincubación y la incubación en el primer anticuerpo. También se realizaron lavados al finalizar el revelado, antes del montaje de los cortes.

Anticuerpo	Animal de procedencia	Casa comercial y datos	Dilución
Anti-IgG de ratón biotilado	Cabra	Sigma, código B7401	1:500
Anti-IgG de cabra biotilado	Conejo	Sigma, código B7014	1:500
Anti-IgG de conejo biotilado	Cabra	Sigma, código B7389	1:500
Anti-IgG de cobaya biotilado	Cabra	Vector Laboratories , BA-7000	1:500

Tabla 4. Anticuerpos secundarios empleados para la técnica inmunohistoquímica.

3.1.6 Revelado de la peroxidasa

La peroxidasa presente en el complejo Estreptavidina-peroxidasa se reveló en una solución de 3-3'diaminobencidina tetraclorhidrato (DAB; Sigma) al 0.05% y de sulfato amónico de níquel al 0.05%. Las secciones se incubaron en dicha solución durante 10 minutos. Posteriormente se añadió el peróxido de hidrógeno al 0.03% y se controló el tiempo de revelado cada 5 minutos. El sulfato amónico de níquel se utiliza con la intención de intensificar la reacción gracias a la capacidad que tienen los metales pesados para unirse al DAB. Todos los pasos del revelado se realizaron en oscuridad para evitar la fotooxidación del DAB.

Una vez finalizado el revelado las secciones fueron montadas en portaobjetos con la ayuda de un pincel y posteriormente deshidratados mediante una batería de alcoholes de gradación ascendente: 5 minutos en los distintos alcoholes de 50°, 70°, 90°, 96°. Seguidamente se mantuvieron 10 minutos en alcohol de 100° y para terminar fueron sumergidos durante 10 minutos en Xileno. El montaje del cubreobjeto se realizó con DPX.

3.2 Controles

Se realizaron controles para cada anticuerpo utilizado, tanto controles positivos como negativos, para comprobar la especificidad del método.

Como controles positivos se escogieron cortes de regiones del cerebro que se sabía que contenían el antígeno a detectar. Estos se procesaron conjuntamente con los cortes del experimento aplicando la misma técnica inmunocitoquímica para comprobar que existía reacción positiva.

Los controles negativos se utilizaron para asegurar que la reacción se debía exclusivamente a la acción de los anticuerpos específicos y no a una reacción falsa positiva producida por los reactivos utilizados en la técnica, con este fin se procesaron cortes que se sabía que contenían el antígeno a detectar del mismo modo que los cortes de nuestro experimento, pero reemplazando en este caso el anticuerpo primario por solución tampón PBS pH 7.3, 0.1M con 0.3% de Triton X-100 y 0.1% de azida sódica.

3.3 Cuantificación de las células inmunorreactivas

Los estudios cuantitativos de las neuronas inmunorreactivas se realizaron a partir de secciones de cerebro de ratones *Fmr1*-KO y WT entre las coordenadas estereotáxicas que abarca nuestra zona de estudio según Bregman; atlas de Franklin y Paxinos (2007).

Para la cuantificación de las células inmunorreactivas se utilizó la estereología, originalmente definida como “la interpretación espacial de secciones”. Ésta comprende un conjunto de métodos simples que combina la probabilidad geométrica y la estadística para la

cuantificación de características geométricas tridimensionales de objetos, como el volumen, área de superficie, longitud, número y conectividad.

El método empleado para la cuantificación de las células inmunorreactivas fue el del fraccionador óptico, este método se basa en la combinación de un muestreo sistémico de las secciones (Gundersen, 1986) y el conteo del número de células en los cuadrantes (áreas específicas de tejido) mediante el disector óptico (Sterio, 1984), dado como densidad numérica (DN), número de neuronas por volumen (células/mm³).

El uso del disector óptico, como un procedimiento de muestreo, está considerado como el mejor método para una estimación precisa de la densidad numérica de células.

Para la estimación del volumen se empleó el método o principio de Cavalieri, mediante el método de recuento de puntos sobre las secciones del tejido. El principio de Cavalieri demuestra que dos figuras con la misma altura y en las que las secciones que cruzan poseen el mismo área, poseen a su vez el mismo volumen.

Para la aplicación de este método se empleó un microscopio Olympus BX61 y el programa informático NewCAST (Olympus, Glostrup, Denmark).

El programa NewCAST requiere que el muestreo sea uniforme, lo que implica, en nuestro caso, que cada célula inmunomarcada en un área determinada debe tener la misma probabilidad que otra de ser contada.

Se cuantificó una de cada cuatro secciones, cada una separada por 200 μm a través del eje anteroposterior (ya que cada corte era de 50 μm de grosor). Las agrupaciones celulares denominadas núcleos cerebrales fueron delimitados manualmente utilizando el objetivo de 4x y se determinó el porcentaje de muestra a estudiar en un 40%. Una vez hecho esto, el programa realiza un muestreo de la zona seleccionada al azar en regiones equidistantes, siendo el primer punto seleccionado al azar y los consecutivos marcados con una distancia preseleccionada mediante el comando “meander sampling” o muestreo en forma de meandro. El muestreo se realizó con la ayuda del objetivo 60x de inmersión.

El programa emplea cuadrículas o ventanas denominadas “counting frame” o ventanas de conteo, que en nuestro caso tenía un área de $1.585 \mu\text{m}^2$ en todos los núcleos cerebrales, menos para el núcleo talámico intralaminar posterior, en cuyo caso el área fue de $2.535 \mu\text{m}^2$, en combinación con el método del disector óptico, que estima el número de perfiles somáticos en un volumen de referencia de la muestra, que en este caso fue de $10 \mu\text{m}$ de grosor por el área de la ventana de conteo. Se delimitó un área de guarda de $3 \mu\text{m}$ por encima y por debajo del volumen de referencia. La distancia entre cuadrículas se distribuye de forma equidistante y es lo que se denomina “steps lengths” que en este estudio fue de $62.94 \times 62.94 \mu\text{m}$ para todos los núcleos cerebrales, excepto para el núcleo talámico intralaminar posterior que fue de $79.6 \times 79.6 \mu\text{m}$.

Una vez estimados todos los parámetros se realizó el conteo de las células inmunomarcadas (ΣQ^-) dentro del volumen seleccionado, teniendo en cuenta los límites de inclusión y exclusión de la cuadrícula. Fue estimado el número de células inmunorreactivas como: $N = \Sigma Q^- \times fs \times fa \times fh$ (Gundersen y cols., 1988), siendo “fs” la fracción de seriación, que tiene en cuenta la seriación sistémica que ha sufrido el cerebro, “fa” la fracción del área específica a contar y “fh” la fracción de altura, que consiste en la altura que el disector óptico propone para la cuantificación de partículas (Howard y Reed., 1998; Keuker y cols., 2001). Combinado todos estos elementos, el número de partículas contadas por cada objeto (ΣQ^-) podrá representar el número total de partículas que ese objeto posee, aportando una estimación fiable, no sesgada y eficiente. En nuestro caso el coeficiente de error (CE) de cada estimación y de cada animal se encuentra entre 0.02 y 0.1, garantizando la eficiencia del método, puesto que todas las estimaciones están por debajo de 0.1.

Para confirmar que los métodos de contaje empleados fueron imparciales, se calculó el volumen de los núcleos del tálamo dorsal de todas las muestras. Se obtuvo el área de cada núcleo en todas las secciones con el programa ImajeJ (v. 1.44, NIH, Bethesda, MD). Este área fue medida tres veces y se realizó el promedio de las tres mediciones. Una vez obtenido el valor de promedio se convirtió en volumen añadiendo como tercera dimensión, el grosor del grupo de secciones analizadas. El método estadístico utilizado fue el análisis de varianza unidireccional (ANOVA). No se observaron diferencias volumétricas significativas entre los grupos analizados ($p > 0.05$).

3.4 Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos se utilizó SPSS Statistics 22.0 y el programa estadístico SigmaStat (SSPS, Chicago, IL). Las diferencias en el número de células inmunorreactivas se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Para evaluar las diferencias significativas de las medias entre WT y *Fmr1*-KO se empleó la prueba t de Student para muestras independientes y para poblaciones con distribución normal. El nivel de significación fue de $p < 0.05$, por tanto fueron considerados estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$, señalados con un asterisco (*).

3.5 Tratamiento de las imágenes

Las imágenes al microscopio óptico fueron fotografiadas con una cámara digital Nikon DXM 1200 equipado en un microscopio Leica DMCB. Las imágenes definitivas fueron ajustadas en brillo y contraste. No se emplearon ni filtros ni manipulaciones adicionales. Las figuras resultantes fueron compuestas y etiquetadas con el programa OpenOffice Impress.

4. Análisis de proteínas mediante Western Blot



Esta técnica de inmunodetección se usa para identificar y localizar proteínas en base a su capacidad de unión a anticuerpos específicos. Consiste en una combinación de dos técnicas; la electroforesis en gel de poliacrilamida y el inmunoensayo.

Para el análisis de proteínas mediante Wertern Blots se emplearon ejemplares adultos, postnatales P0, P1, P4, P7, P14 y P21 y embriones E18.5. Los ratones adultos y postnatales utilizados para esta técnica fueron sacrificados por dislocación cervical. En el caso de los embriones, en un primer lugar se extrajeron los embriones mediante cesárea, para ello se

anestesió profundamente a la hembra adulta con Ketamina (2 μ l/g) y Xilacina (0.5 μ l/g) y una vez extraídos los embriones, éstos fueron decapitados.

Una vez terminado el proceso de decapitación se extrajo el cerebro y se diseccionó la parte de interés, en nuestro caso el telencéfalo más el diencéfalo. Una vez obtenido el tejido a analizar, se puso en nieve carbónica para una inmediata congelación, evitando la degradación de las proteínas. A continuación las muestras fueron machacadas en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero.

El análisis de Western Blot se llevó a cabo utilizando los mismos anticuerpos primarios que fueron utilizados para la técnica de inmunohistoquímica (Tabla 3; ver página 46).

4.1. Pasos importantes del análisis mediante Western Blots

4.1.1 Extracción de las proteínas

Para la extracción de proteínas se preparó buffer de lisis Tris-HCL 20mM pH 7.4, NaCl 150mM, EDTA 0.5mM, Triton X-100 al 1% y SDS al 10% y se le añadió los inhibidores de proteasas (Sigma P8340), 5 μ l por cada mililitro de buffer de lisis, con esto conseguimos desplegar las proteínas evitando su degradación. En el caso concreto del análisis de la p-CaMKII α se le añadió una serie de inhibidores de fosfatasas (ver página 60) para evitar la acción de las fosfatasas y así poder analizar esta proteína en su forma fosforilada.

Una vez preparado el buffer, se le añadió 1 ml por cada muestra, se homogeneizó pipeteando varias veces y se dejó actuar durante 10 minutos a 4°C. Transcurridos los 10 minutos se centrifugó durante 15 minutos a 15.000 g a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

4.1.2 Cuantificación de proteínas totales

El método utilizado para la determinación de proteínas totales en extracto de tejido se corresponde con el descrito por Bradford, basado en la afinidad que tiene el colorante Azul Coomassie brillante G para unirse a las proteínas. La unión del colorante a las proteínas

produce un aumento de la longitud de onda a la que absorbe el colorante, con un máximo de absorción entre 465 nm y 595 nm; este incremento de absorción es directamente proporcional a la concentración de proteínas. El método tiene una sensibilidad de 1 µg/ml.

Se realizó una curva estándar de albúmina mediante diluciones seriadas a partir de una dilución stock de albúmina sérica bovina (BSA) 10 mg/ml y se representó la densidad óptica (DO595) frente a la concentración (mg/ml) de los estándares para obtener la curva patrón.

De cada extracto se preparó una dilución 1/10 usando agua como diluyente, de esta dilución se cuantificó 2, 4 y 8 µl en un volumen final de 100 µl de agua. A todas las diluciones a cuantificar se le añadió 1 ml del reactivo Bradford, se agitó y se midió la densidad óptica a 595 nm en el lector Shimadzu UV-1603. Los valores DO595 de las diluciones se interpolaron en la recta patrón para obtener la concentración de proteínas de cada muestra. En cada dilución se utilizó como blanco 2, 4 y 8 µl de buffer de lisis en 100 µl de agua respectivamente.

4.1.3 Preparación de los extractos

Teniendo la concentración de la muestra inicial y la concentración y el volumen de la muestra final a la que queremos cargar el gel (60 µg en un volumen de 15 µl), se puede calcular el volumen de la muestra inicial y así poder preparar los extractos para cargar en el gel.

En todos los casos elaboramos un volumen final mayor para poder utilizar los extractos en varios Western Blots. Por cada 80 µl de volumen final que preparamos, se le añadió el volumen calculado de la muestra inicial, 16 µl (80/5) de azul de bromofenol 5x, 1 µl de β-mercaptoetanol y buffer de lisis hasta llegar al volumen final de 80 µl.

Una vez preparadas las muestras se mezclaron bien y se desnaturalizaron 10 minutos a 95-100°C.

4.1.4 Electroforesis y electrotransferencia

Se utilizaron geles de poliacrilamida SDS-PAGE preparados a diferentes concentraciones de acrilamida entre el 10% y el 14% (según el tamaño de la proteína a estudiar). Una vez montado el gel, se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein TM All Blue Standards de Bio-Rad).

En un primer lugar se separó a 15 mA en tampón de electroforesis (ver página 59) hasta que las muestras entraron en el gel, después a 20-25 mA hasta que el frente de azul de bromofenol llegó al fondo, para este proceso se empleó el equipo SE 250 Vertical Unit (Pharmacia Biotech).

Las proteínas son transferidas, usando el equipo Multiphor II (Pharmacia Biotech), a una membrana de nitrocelulosa en semi-seco usando un tampón de transferencia (ver página 59) durante aproximadamente 1 hora en función al grosor del gel y a 37 mA en relación a su tamaño. Una vez transcurrida la transferencia, se bloqueó la membrana con PBS-Tween 0.05% (TPBS) más 5% de leche durante una hora a temperatura ambiente y en agitación.

4.1.5 Incubación de anticuerpos y revelado

Los anticuerpos primarios utilizados en esta técnica fueron los mismos que los empleados en la técnica inmunohistoquímica con distintas diluciones (tabla 3), utilizando como control anticuerpos frente a β -actina.

Se utilizaron como anticuerpos secundarios (Tabla 5), anti IgG de ratón marcado con peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:80.000, anti IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma) a 1:10.000 y anti IgG de cabra y cobaya marcados con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) a 1:10.000 y 1:5.000 respectivamente. Todas las diluciones de anticuerpos fueron elaboradas en TPBS más 5% de BSA.

Anticuerpo	Animal de procedencia	Casa comercial y datos	Dilución
Anti-IgG de ratón HRP	Conejo	Sigma, código A9044	1:80000
Anti-IgG de cabra HRP	Ratón	Santa Cruz Biotechnology sc-2354	1:10000
Anti-IgG de conejo HRP	Cabra	Sigma, código A6154	1:10000
Anti-IgG de cobaya HRP	Cabra	Santa Cruz Biotechnology sc-2438	1:5000

Tabla 5. Anticuerpos secundarios empleados para la técnica Western Blot.

Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo la membrana es lavada ligeramente con TPBS, posteriormente se incubaba en anticuerpo primario durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación. Seguidamente se realizaron tres lavados con TPBS y se incubó la membrana en la dilución de anticuerpo secundario durante 1 hora. Una vez finalizado el tiempo de incubación se volvió a lavar tres veces con TPBS y se realizó un último lavado con agua destilada. Todos los lavados fueron de 10 minutos y con agitación.

Para la visualización de las proteínas se utilizó el método ECL, que consiste en un sustrato quimioluminiscente intensificado para la detección de la peroxidasa, mediante el empleo de un kit apropiado (Thermo Scientific) y con la ayuda de un analizador de imágenes digital luminiscente (BioRad) y del programa informático Image Lab 3.0.

4.2 Cuantificación por densitometría

Una vez obtenidos los resultados en el programa Image Lab 3.0., las imágenes fueron guardadas y exportadas en formato TIFF para su posterior análisis. Todas las imágenes fueron tratadas bajo las mismas condiciones y transformadas a escala de grises de 8 bit. Las bandas fueron cuantificadas mediante densitometría con el programa Image J. Se normalizó cada banda respecto a la banda control para β -actina correspondiente a la misma muestra en el mismo carril del gel.

4.3 Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados usando el programa informático SPSS Statistics 22.0, estimando la media de los valores, la desviación estándar, el error estándar de la media, así como las diferencias estadísticas entre los grupos de ratones WT y *Fmr1*-KO a través de la prueba t de Student para analizar dos grupos no relacionados. Para analizar las posibles diferencias entre tres grupos independientes se empleó el análisis de la varianza ANOVA seguido por el test T2 de Tamhane y el test T3 de Dunnett. Estos test estadísticos analizan los tres grupos independientes dos a dos, para saber entre que dos grupos existen diferencias significativas. En todos los casos se establece como diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

5. Anexo



En la técnica inmunohistoquímica, a la hora de obtener la concentración óptima de trabajo de cada anticuerpo primario se realizaron diluciones seriadas con el fin de seleccionar la dilución más elevada sin incrementar el marcaje inespecífico. La elección de una dilución inadecuada puede dar falsos negativos o aumentar la tinción de fondo (García del Moral, 1993).

Para la elección de la concentración de los anticuerpos en la técnica de Western Blot se tuvo en cuenta las recomendaciones de la casa comercial para cada anticuerpo empezando, en todos los casos, por la dilución menos concentrada hasta obtener los resultados más óptimos.

5.1 Anticuerpos

En la técnica inmunohistoquímica y en la técnica Western Blot se emplearon los mismos anticuerpos primarios (Tabla 3; Pag. 46), para conseguir la detección de la misma molécula en ambas técnicas, ya que en la mayoría de los casos se ha trabajado con anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos secundarios empleados fueron diferentes dependiendo de la técnica, siendo utilizados anticuerpos secundarios biotilados para la técnica inmunohistoquímica y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) para la técnica Western Blot.

5.2 Tampones

Tampón fosfato (PB) pH 7.3 0.2M

NaH₂PO₄ x H₂O 6.9 g

Na₂HPO₄ x H₂O 26.7 g

Agua destilada 1000 ml

Tampón fosfato (PB) pH 7.3 0.1M

PB pH 7.3 0.2M 500 ml

Agua destilada 500 ml

Tampón fosfato salino (PBS) pH 7.3 0.1M

PB pH 7.3 0.2 M 500 ml

NaCl 9 g

Agua destilada 500 ml

Tampón fosfato salino Tween 0.05% (TPBS)

PBS pH 7.3 0.2M 500 ml

250 µl Tween 20 PS

Buffer de lisis

Tris-HCL pH 7.4 20mM 4 ml

NaCl 150mM 3 ml

EDTA 0.5mM 40 μ l

Triton X-100 1% 200 μ l

SDS 10% 200 μ l

Azida sódica 0.02% 4 mg

Buffer de transferencia

Glicina 39mM

Tris 48mM

SDS 0.037%

Metanol 20%

H₂O

Buffer de electroforesis Tris-Glicina 10x

Stris base 0.25M

Glicina 2M

SDS al 1%

TE 1x

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1mM, pH 8.0 \pm 0.2

5.3 Fijadores

Paraformaldehído al 4%

Paraformaldehído 4 g

Agua destilada 50 ml

PB pH 7.3 0.2M 50 ml

En la elaboración del fijador se disuelve paraformaldehído en agua destilada a 60°C y se mantiene en agitación hasta que la disolución se vuelve transparente, para ello se le añaden unas gotas de hidróxido sódico 10% (p/v). A continuación se filtra y una vez la filtración finalice se le añade el tapón fosfato.

5.4 Inhibidores

Inhibidores de fosfatasas

Se añaden las siguientes cantidades por cada mililitro de Buffer de lisis:

Ortovanadato sódico (Na_3VO_4) 100mM (Sigma S6508) 10 μl

β -Glicerofosfato 1M (Sigma G9422) 3.3 μl

Fluoruro Sódico (NaF) 100mM (Sigma S1504) 10 μl

Inhibidores de proteasas

Se le añade la siguiente cantidad por cada mililitro de Buffer de lisis:

Cóctel inhibidor de proteasas (Sigma P8340) 5 μl

RESULTADOS



Estudio quimioarquitectónico y Western Blots

En este trabajo se ha realizado un estudio comparado en ratones machos WT y *Fmr1*-KO desde embriones de 18.5 días (E18.5) hasta adulto de 7 meses, de un conjunto de marcadores neuronales, entre los que se encuentran las proteínas ligadoras de calcio (calbindina, calretinina y parvalbúmina), la sintasa del óxido nítrico, los transportadores vesiculares de glutamato tipo 1 y tipo 2, la proteína quinasa II α dependiente de Ca^{2+} /calmodulina y su forma fosforilada, y la sinapsina 1 (proteína asociada a vesículas sinápticas).

También se ha analizado la proteína FMRP en ratones WT en determinados estadios del desarrollo postnatal (P14, P18, P21 y adulto) para poder aclarar los resultados obtenidos en estos estadios para algunas de las proteínas estudiadas.

A continuación se describen los resultados obtenidos de los estudios quimioarquitectónicos e inmunoensayos de Western Blots realizados para todos los marcadores neuronales nombrados anteriormente.

1. Estudio comparado de las proteínas ligadoras de calcio (calbindina, calretinina y parvalbúmina) y de la sintasa del óxido nítrico neuronal como marcadores de neuronas GABAérgicas en ratones WT y ratones Fmr1-KO

Para evaluar las posibles diferencias en el cerebro anterior (telencéfalo y diencéfalo) entre ratones WT y *Fmr1*-KO de las proteínas CB, CR, PV y nNOS se realizaron estudios empleando la técnica Western Blot y la técnica inmunohistoquímica. En todos los casos se emplearon adultos con edades comprendidas entre 3 y 7 meses.

1.1 Western Blots para CB, CR, PV y nNOS

Para la realización de este estudio se utilizaron extractos del cerebro anterior de ratones adultos. Se utilizaron un total de 6 ratones machos WT y 6 ratones machos *Fmr1*-KO.

Para este estudio de Western Blot se emplearon anticuerpos que reconocían una banda de proteína específica con el peso molecular concreto de cada anticuerpo (Fig. 10). Estos anticuerpos fueron utilizados previamente por otros autores con un marcaje de bandas similar al nuestro (Schwaller y cols., 1993; Dinerman y cols., 1994; Airaksinen y cols., 1997; Schwaller y cols., 1999).

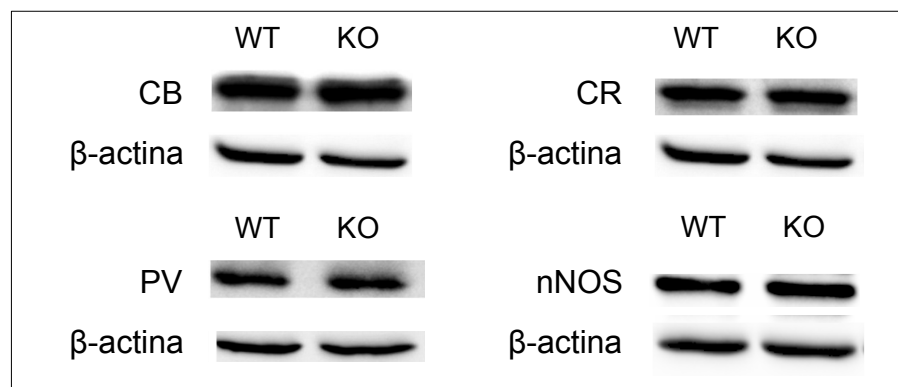


Figura 10 . Niveles de expresión de las proteínas calbindina (CB), calretinina (CR), parvalbúmina (PV) y la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) en extractos de cerebro de ratón WT y *Fmr1*-KO machos. Western Blot utilizando anticuerpos frente a CB, CR, PV y nNOS que mostró una sola banda con peso molecular de 28kDa, 29kDa, 12kDa y 150kDa respectivamente. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. No se observaron diferencias entre los distintos genotipos WT y *Fmr1*-KO.

Una vez cuantificados los datos no encontramos diferencias significativas entre los niveles de expresión de las proteínas calbindina, calretinina, parvalbúmina y la sintasa de óxido nítrico neuronal entre los ratones *Fmr1*-KO y WT.

1.2 Inmunohistoquímicas para CB, CR, PV y nNOS

Nuestros estudios inmunohistoquímicos para estas proteínas se centraron en el hipocampo y en la amígdala, como estructuras esenciales pertenecientes al sistema límbico

dentro del telencéfalo, y en el tálamo dorsal como uno de los principales componentes del diencefalo.

1.2.1 Inmunorreactividad para calbindina en el cerebro anterior de ratones *Fmr1-KO* en comparación a ratones *WT*

Para este estudio se utilizaron 9 ratones machos *WT* y 9 ratones machos *Fmr1-KO*. El anticuerpo utilizado fue el mismo que se empleó para la realización del Western Blot (Tabla 3; Pag. 46).

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias cualitativas en el complejo amigdalino entre ambos genotipos. En cambio, se observaron diferencias tanto en el hipocampo como en el tálamo. A nivel del hipocampo se observaron diferencias en la capa piramidal de CA1 y en la capa granular del giro dentado, mientras que a nivel del tálamo dorsal se observaron diferencias en la mayoría de los núcleos que lo componen.

En la región amígdalina las células inmunorreactivas para calbindina (CB-IR) se localizaron en los distintos núcleos que la conforman, observándose una inmunotinción más intensa en las células de la amígdala lateral (La), basolateral (BLA) y medial (Me) en comparación con las células CB-IR presentes en la amígdala central (Ce) (Fig. 11A, C, D). No se apreciaron diferencias en el patrón de distribución entre ambos genotipos en todo el complejo amigdalino (Fig. 11A-F). Tampoco hemos observado diferencias en la morfología de las células, como se puede apreciar a mayor aumento en el núcleo BLA (Fig. 11D, F).

En el hipocampo las células CB-IR se encontraron principalmente en la capa granular del giro dentado (Fig. 5A, C; Pag. 28), donde era apreciable de forma cualitativa un menor número de células calbindina presentes en los ratones *Fmr1-KO* en relación a los *WT* (Fig. 5A-D; Pag. 28). El menor número de células calbindina en los ratones *Fmr1-KO* a nivel del giro dentado ha sido demostrado cuantitativamente en estudios realizados con anterioridad en nuestro grupo de investigación (Real y cols., 2011). En estos estudios también se cuantificó un menor número de células piramidales CB-IR en la capa CA1 del hipocampo del ratón.

En el tálamo dorsal gran parte de las células CB-IR se distribuyen en los núcleos de la línea media, intralaminares y en algunos núcleos del tálamo posterior (Fig. 12A, C, E), datos que coinciden con estudios realizados en el tálamo de ratas y humanos (Celio, 1990; Frassoni y cols., 1991; Battaglia y cols., 1992; Arai y cols., 1994; Mönkle y cols., 2000).

Los núcleos del tálamo dorsal con mayor inmunorreactividad para calbindina fueron los integrantes del complejo dorsomedial (MD) (Fig. 12A) y los núcleos de la línea media como el núcleo paraventricular (PV), el intermediodorsal (IMD), el romboidal (Rh), el reuniens (Re) y el núcleo paraxifoidal (PaXi) (Fig. 12A, C). Se encontraron también células CB-IR en el núcleo centromedial (CM), el paracentral (PC), el centrolateral (CL) y en el núcleo submedio (Sub) (Fig. 12A, C).

Cuando analizamos de forma comparada la inmunorreactividad para CB entre ambos genotipos (Fig. 12) observamos que existían diferencias cualitativas. En general, los núcleos talámicos de los ratones *Fmr1*-KO presentaban menor número de células calbindina (Fig. 12A-F). Por este motivo se analizaron cuantitativamente todos los núcleos que mostraron diferencias cualitativas (Tabla 6; Pag. 69).

En el complejo ventral y en otros núcleos del tálamo dorsal también se observaron células CB-IR quedando fuera de nuestro estudio por no presentar diferencias cualitativas entre los ratones *Fmr1*-KO y los ratones WT.

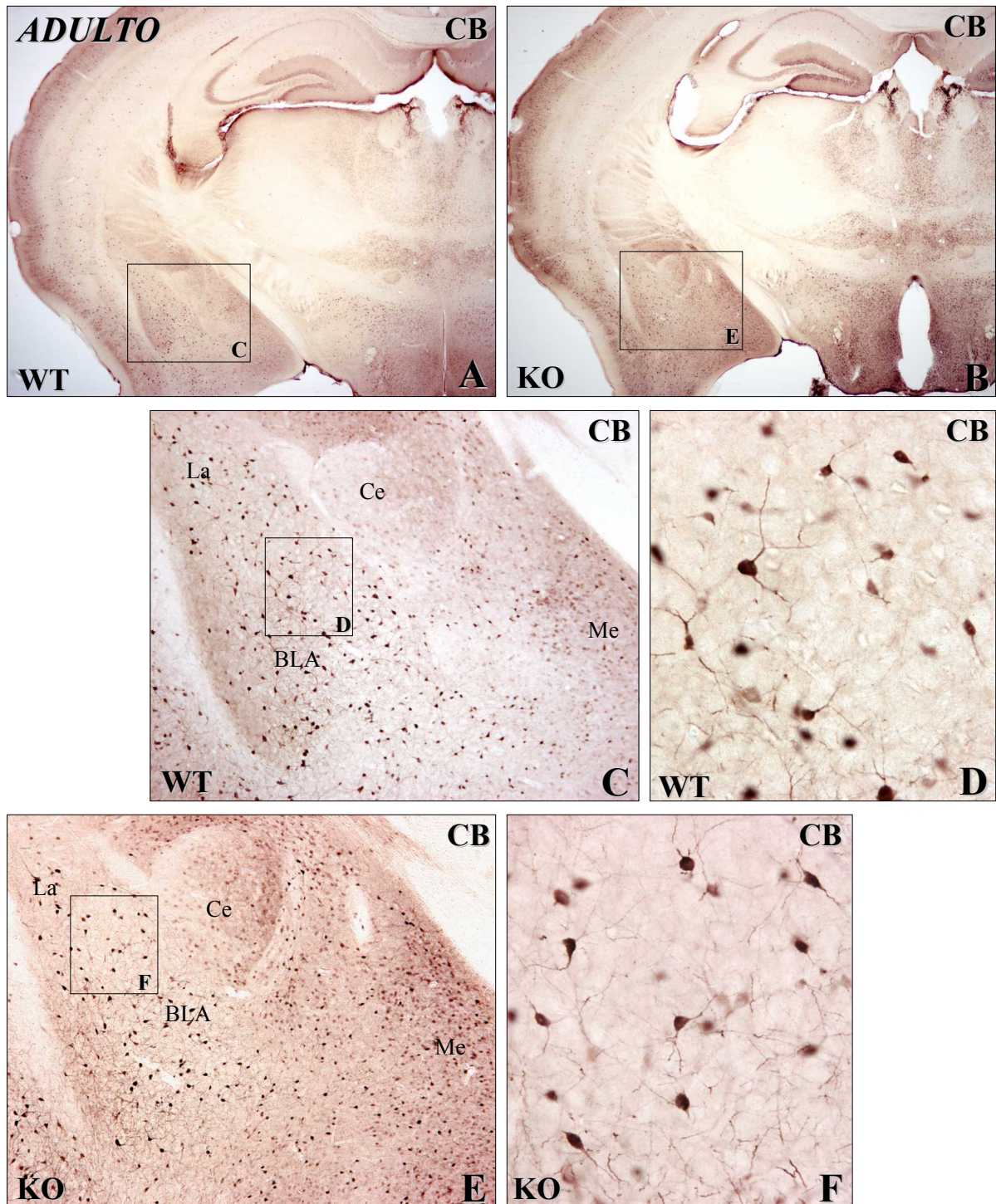


Figura 11. Cortes transversales de cerebro de ratones machos adultos. A, B: Microfotografía panorámica del telencéfalo y diencéfalo de ratones WT y *Fmr1*-KO respectivamente. C, E: Secciones del telencéfalo a nivel del complejo amigdalino. Se observan células CB-inmunoactivas (CB-IR) en los núcleos de la amígdala de ratones silvestres (D) y de ratones knock-out para *Fmr1* (F). El patrón de inmunoreactividad estudiado en estos núcleos de la amígdala es similar para ambos genotipos. La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, B = 25x; C, E = 100x; D, F = 400x.

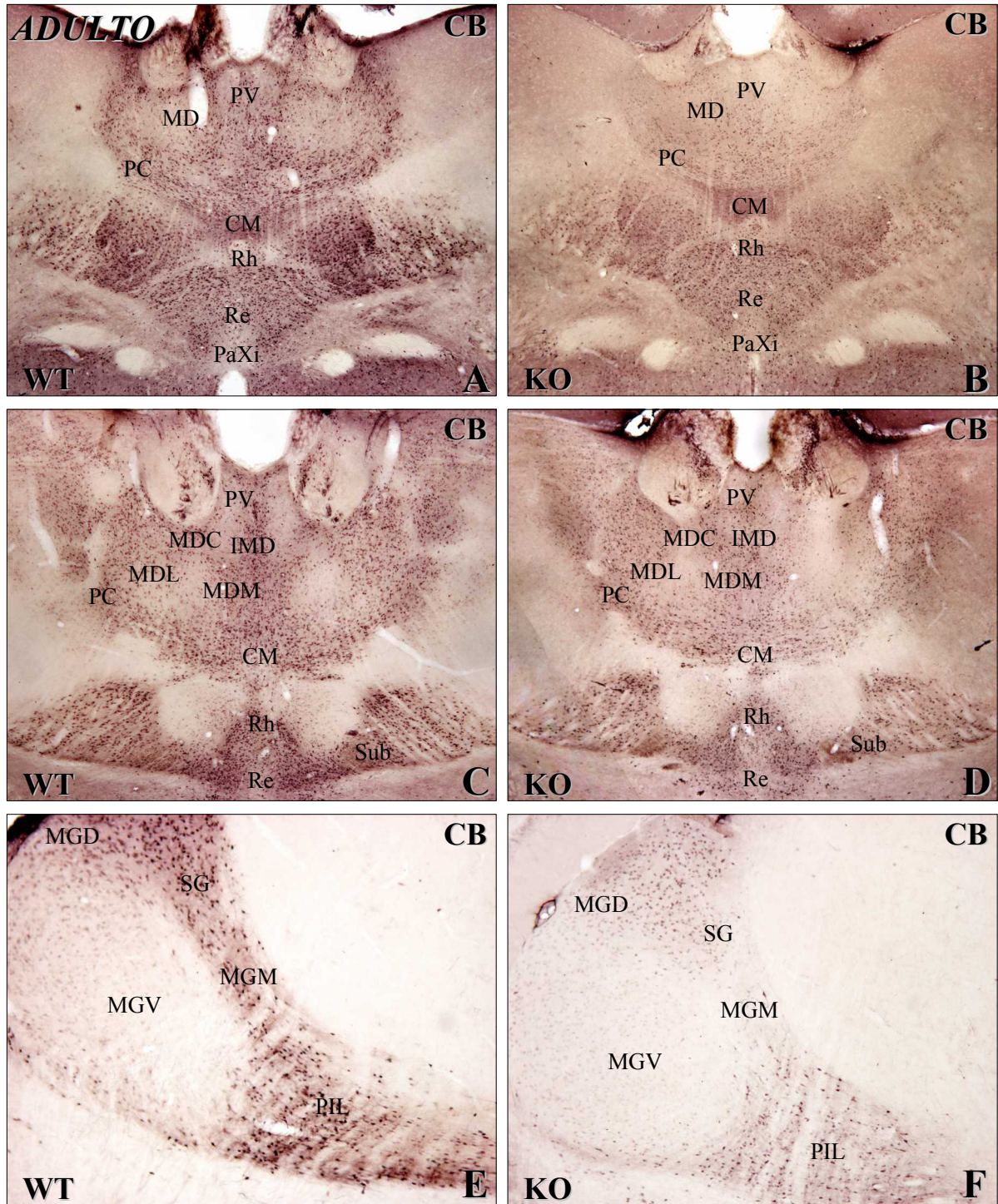


Figura 12. Microfotografías de secciones transversales del diencéfalo de ratones machos adultos. Se observa inmunorreactividad para calbindina (CB) en el tálamo dorsal de ratones WT a la izquierda y de ratones knock-out para *Fmr1* (*Fmr1*-KO) a la derecha. A, C, E: Las imágenes muestran la distribución de las células CB-inmunorreactivas (CB-IR) en los núcleos de la línea media del tálamo, en los núcleos intralaminares y en los núcleos de la parte dorsal del tálamo posterior de ratones WT. B, D, F: Neuronas CB-IR en los mismos núcleos talámicos para ratones *Fmr1*-KO. Se aprecian menos células inmunoteñidas para CB en los ratones *Fmr1*-KO que en los WT. CM, núcleo centromedial; IMD, núcleo intermediodorsal; MD, núcleo dorsomedial; MDM, parte medial del núcleo dorsomedial; MDC, parte central del núcleo dorsomedial; MDL, parte lateral del núcleo dorsomedial; PC, núcleo paracentral; PV, núcleo paraventricular; Rh, núcleo romboidal; Sub, núcleo submedio; Re, núcleo reuniens; PaXi, núcleo paraxifoidal; SG, núcleo supragenicolado; MGD, parte dorsal del núcleo geniculado medial; MGM, parte medial del núcleo geniculado medial; MGV, parte ventral del núcleo geniculado medial; PIL, parte posterior del núcleo intralaminar. Aumentos: A, B, C, D = 50x; E, F = 100x.

1.2.2 Cuantificación y análisis estadístico de la inmunorreactividad para calbindina en el tálamo

Para el estudio cuantitativo de las células CB-IR se emplearon 12 cerebros de ratones machos, 6 ratones WT y 6 ratones *Fmr1*-KO.

La cuantificación de neuronas CB-IR en el tálamo se realizó sobre secciones transversales de cerebro de ratón dentro de las coordenadas estereotáxicas bregma -0,46 mm y -3,34 mm, tomando como referencia el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos del 2007.

Los núcleos del tálamo dorsal intralaminares y de la línea media que fueron estudiados son: el núcleo dorsomedial (MD), que se compone de la parte lateral (MDL), la parte medial (MDM) y la parte central (MDC); el núcleo submedio (Sub); los núcleos de la línea media del tálamo compuesto por el núcleo paraventricular (PV), el núcleo intermediodorsal, el núcleo romboidal (Rh), el núcleo reuniens (Re), la parte ventral del núcleo reuniens (VRe) y el núcleo paraxifoidal (PaXi); los núcleos intralaminares rostrales, como el núcleo centromedial (CM), el núcleo paracentral (PC) y el núcleo centrolateral (CL).

Las zonas del tálamo posterior estudiadas fueron: la parte posterior del núcleo intralaminar (PIL), la parte medial del núcleo geniculado medial (MGM), la parte dorsal del núcleo geniculado medial (MGD), el intergeniculado (IGL) y el núcleo supragenicolado (SG).

Los resultados que obtuvimos de este estudio cuantitativo fueron los siguientes:

En general, el número de células CB-IR en el tálamo dorsal fue menor en ratones *Fmr1*-KO en comparación con ratones WT. El porcentaje de neuronas CB-IR fue un 36-67% menor en ratones *Fmr1*-KO (Giráldez-Pérez y cols., 2013).

En todos los núcleos talámicos analizados el número de células CB-IR fue significativamente menor en los ratones *Fmr1*-KO (Tabla 6).

Resultados

Núcleos	Genotipo	Media	Valor <i>p</i>
CM	WT	2272 ± 197	7.45E-08*
	KO	1140 ± 32	
IMD	WT	1047 ± 208	4.5772E-05*
	KO	455 ± 43	
MDM	WT	1256 ± 198	4.2369E-06*
	KO	505 ± 51	
MDC	WT	846 ± 91	4.92E-08*
	KO	292 ± 21	
MDL	WT	1151 ± 225	1.9682E-05*
	KO	452 ± 29	
PC	WT	1159 ± 61	7.4E-09*
	KO	658 ± 33	
PV	WT	724 ± 82	1.5701E-06*
	KO	368 ± 29	
CL	WT	1057 ± 204	1.4707E-05*
	KO	403 ± 25	
Rh	WT	571 ± 19	0*
	KO	270 ± 10	
Sub	WT	1260 ± 151	2.3877E-06*
	KO	610 ± 70	
Re	WT	3057 ± 349	2.8628E-05*
	KO	1966 ± 124	
VRe	WT	835 ± 80	2.25E-08*
	KO	302 ± 22	
PaXi	WT	466 ± 58	5.054E-07*
	KO	187 ± 16	
SG	WT	899 ± 74	1.86E-08*
	KO	322 ± 49	
MGD	WT	1490 ± 218	6.517E-07*
	KO	490 ± 44	
MGM	WT	850 ± 87	6.84E-08*
	KO	309 ± 38	
IGL	WT	451 ± 56	1.1639E-06*
	KO	195 ± 24	
PIL	WT	1913 ± 104	7E-10*
	KO	780 ± 69	

Tabla 6. Número de células calbindina inmunorreactivas en los núcleos del tálamo dorsal de ratones machos adultos, junto con el valor *p* para la prueba estadística *t* de Student para dos muestras independientes (WT y KO). En todos estos núcleos se observaron diferencias significativas entre sus medias (*).

Como control para descartar que el menor número de células CB-IR fuese debido a una inmunotinción más débil del corte histológico en cuestión, se analizó y se cuantificó el núcleo hipotalámico paraventricular, localizado en los mismos cortes histológicos. En este caso, no se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre los ratones *Fmr1*-KO y WT.

En nuestro grupo de investigación también se llevó a cabo un estudio paralelo utilizando ratones hembras para analizar y cuantificar los mismos núcleos talámicos estudiados en los ratones machos, con la intención de ver si la disminución en el número de células CB-IR presentes en los ejemplares machos también tenían lugar en los ejemplares hembras. En este estudio no se observó ninguna diferencia significativa entre el número de células CB-IR de los ratones hembras WT y los *Fmr1*-KO (Giráldez-Pérez y cols., 2013).

1.2.3 Inmunorreactividad para calretinina en el cerebro anterior de ratones *Fmr1*-KO en comparación con ratones WT

Para este estudio se emplearon 5 ratones machos WT y 5 ratones machos *Fmr1*-KO. El anticuerpo utilizado fue el mismo que se empleó para la realización de los Western Blots (Tabla 3; Pag. 46).

Los resultados obtenidos mediante esta técnica no mostraron diferencias en las 3 zonas analizadas del prosencéfalo, observándose un patrón de distribución para calretinina similar en ambos genotipos.

En el complejo amigdalino se observó inmunorreactividad para calretinina en todos los núcleos que conforman la amígdala (Fig. 13A, B). El mayor número de células positivas se encontraron en el núcleo medial como se describió en estudios anteriores (Guirado y cols., 2008). En el núcleo lateral y basolateral se observaron pocas células positivas para calretinina que se distribuían de manera homogénea por ambos núcleos. En el núcleo central no se encontró ninguna célula CR-IR.

También se observó una fuerte inmunotinción del neuropilo, concretamente en la parte

medial de la amígdala y en el núcleo central. El neuropilo intensamente inmunorreactivo para calretinina de la parte medial y del núcleo central de la amígdala contrasta con la débil tinción que presenta el neuropilo del núcleo lateral y del basolateral (Fig. 13A, B). El patrón de inmunorreactividad en el complejo amigdalino fue similar en ambos genotipos (Fig. 13A-D).

En el hipocampo se apreciaron pocas células CR-IR, algunas se encontraban de manera dispersa en el asta de Amón y en el hilio del giro dentado. La mayor inmunorreactividad para calretinina fue localizada a nivel del neuropilo, concretamente en la parte más interna de la capa molecular del giro dentado (Fig. 13E). No se observaron diferencias en el hipocampo, para esta proteína, entre los ratones *Fmr1*-KO y WT (Fig. 13E, F).

Algunos núcleos de la línea media, intralaminares y del tálamo posterior también presentaban muchas células CR-IR (Fig. 14A, C). Unos de los núcleos del tálamo dorsal con mayor inmunorreactividad para calretinina fue el núcleo paraventricular (PV), donde se observó una fuerte inmunotinción a nivel del soma neuronal (Fig. 14A, C).

En la región posterior del tálamo dorsal se apreciaron abundantes células CR-IR, concretamente en la parte posterior del núcleo intralaminar (PIL), en MGM, en MGD, en SG y en el núcleo IGL. No se observaron variaciones a nivel del tálamo dorsal entre los dos genotipos estudiados (Fig. 14A-F).

1.2.4 Cuantificación y análisis estadísticos de la inmunorreactividad para calretinina en el tálamo

Se emplearon 8 cerebros de ratón, 4 machos WT y 4 machos *Fmr1*-KO, para los estudios cuantitativos del número de células CR-IR en la región del tálamo.

Los estudios cuantitativos de las neuronas CR-IR se realizaron en secciones transversales del tálamo dorsal dentro de las coordenadas estereotáxicas bregma -0,46 mm y -3,34 mm, se ha tomado como referencia el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos

(2007).

El número total de células CR-IR en el tálamo dorsal intralaminar y la línea media fue de 14.429 ± 388 para ratones WT y de 14.397 ± 302 para *Fmr1*-KO ($p= 0.47$). Por tanto, no hubo diferencias significativas en el número de células CR-IR entre ambos genotipos.

Al igual que en el caso del número de células CB-IR, se llevaron a cabo estudios paralelos analizando y cuantificando el número de células CR-IR en el tálamo dorsal intralaminar y en la línea media de ratones hembras no observándose diferencias significativas (Guiráldez-Pérez y cols., 2013).

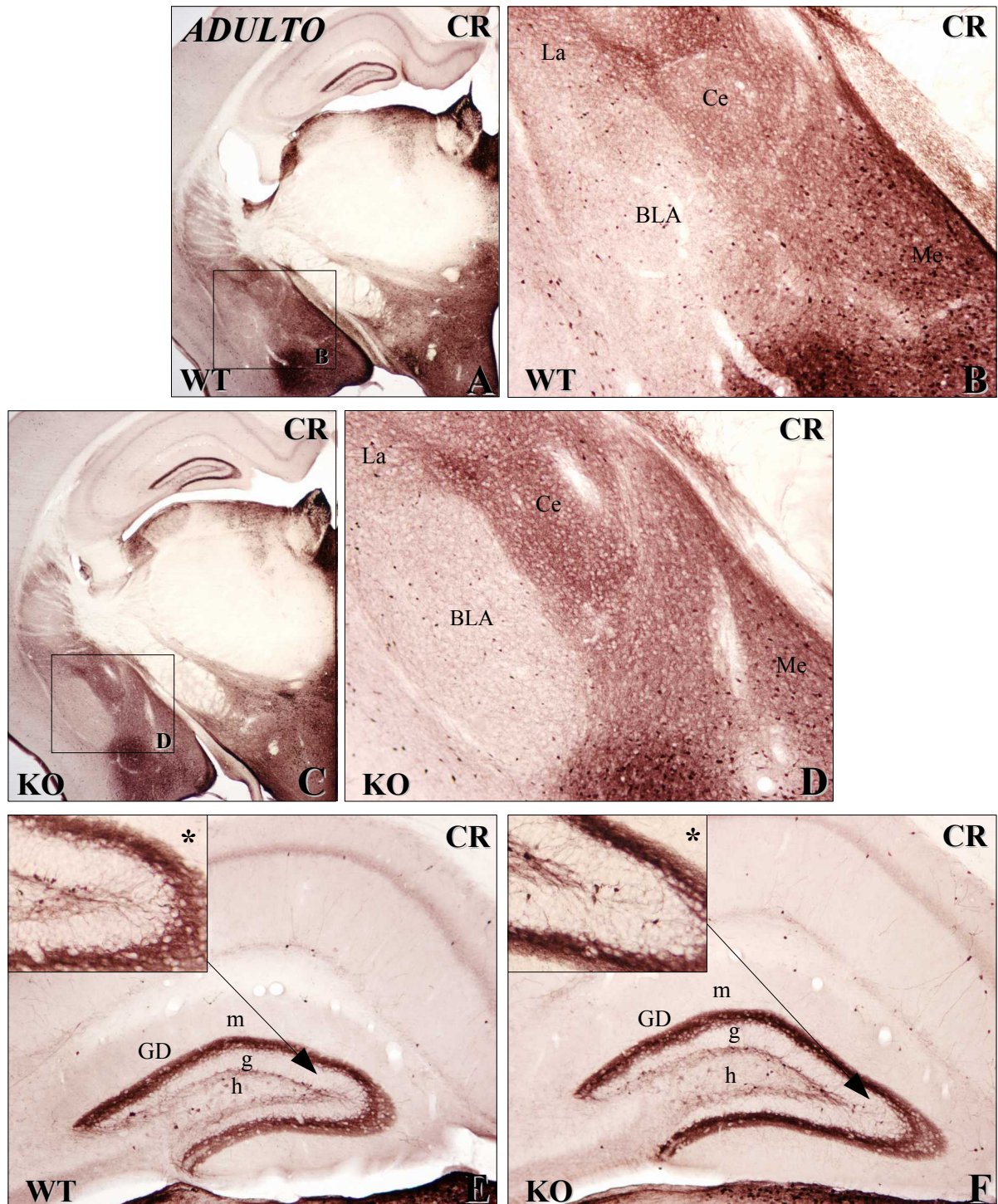


Figura 13. Microfotografías de cortes transversales del telencéfalo a nivel de la amígdala (B, D) y del hipocampo (E, F) de ratones machos adulto. Se observa inmunorreactividad para calretinina (CR) en el telencéfalo de ratones WT en las imágenes A, B y E y en ratones *Fmr1*-KO en las imágenes C, D y F. A, C: Panorámica el telencéfalo a nivel del complejo amigdalino y del hipocampo para WT y *Fmr1*-KO respectivamente. B, D: Se observa inmunorreactividad en todo el complejo amigdalino, siendo más acusada en la parte medial. E, F: Se aprecian células CR-inmunorreactivas (CR-IR) y una fuerte inmunotinción en la parte más interna de la capa molecular del giro dentado, detalle (*) arriba a la izquierda. No se encuentra ninguna diferencia entre los dos genotipos. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, C = 25x; B, D, E, F = 100x; * = 200x.

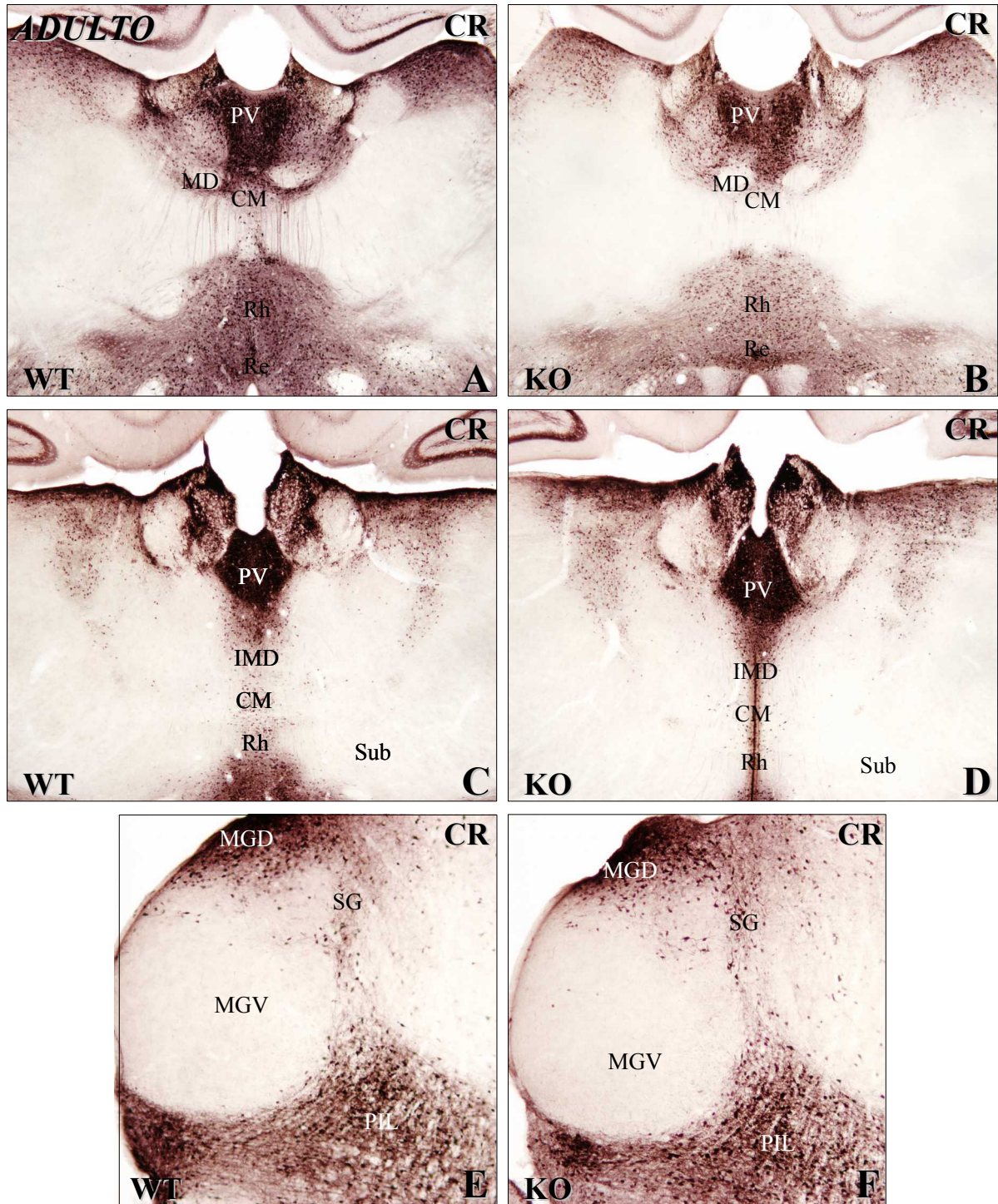


Figura 14. Secciones transversales del tálamo dorsal de ratones WT y *Fmr1*-KO adultos inmunoteñidas para calretinina (CR). A, C, E: Células caretinina inmunoreactivas (CR-IR) en los núcleos del tálamo dorsal de ratones machos WT. B, D, F: Células CR-IR de ratones machos *Fmr1*-KO en los mismos núcleos talámicos que en WT. CM, núcleo centromedial; IMD, núcleo intermediodorsal; MD, núcleo dorsomedial; PV, núcleo paraventricular; Rh, núcleo romboidal; Re, núcleo reuniens; SG, núcleo supragenicular; MGD, parte dorsal del núcleo geniculado medial; MGV, parte ventral del núcleo geniculado medial; PIL, parte posterior del núcleo intralaminar. Aumentos: A, B, C, D = 50x ; E, F = 100x.

1.2.5 Inmunorreactividad para parvalbúmina en el cerebro anterior de ratones *Fmr1-KO* en comparación a ratones *WT*

Para este estudio se utilizaron 3 ratones machos *WT* y 3 ratones machos *Fmr1-KO*. El anticuerpo utilizado fue el mismo que se empleó para la realización de los Western Blots (Tabla 3; Pag. 46).

Nuestros estudios inmunohistoquímicos, en ambos genotipos, para parvalbúmina mostraron un patrón de inmunorreactividad similar en las diferentes zonas analizadas, no encontrándose diferencias en el patrón de distribución para esta proteína (Fig. 15A-F; 16A-F).

Tanto las células como el neuropilo PV-IR se encontraron localizados en los núcleos BLA y La de la amígdala, no apreciándose inmunotinción en el resto de los núcleos que conforman el complejo amigdalino (Fig. 15E). No se observaron diferencias entre los ratones *WT* y *Fmr1-KO* ni en las células PV-IR ni a nivel del neuropilo (Fig. 15E, F).

En el hipocampo se encontraron algunas células PV-IR distribuidas tanto en la capa de células granulares del giro dentado, así como en la capa de células piramidales de CA (Fig. 15A, C), siendo CA3 la región con mayor número de neuronas inmunorreactivas (Fig. 15A). También se observaron ramificaciones dendríticas sobre todo en el hilio del giro dentado entre otras regiones del hipocampo (Fig. 15A, C). Este patrón de distribución de la inmunorreactividad de parvalbúmina fue similar en ambos genotipos (Fig. 15A-D).

No se encontraron células PV-IR en el tálamo dorsal a excepción del núcleo geniculado ventrolateral (VLG) (Fig. 16A, C, D).

Se observaron fibras PV-IR en todos los núcleos rostrales del tálamo dorsal, en los núcleos de la línea media y en los intralaminares.

En el tálamo dorsal posterior se observó un neuropilo fuertemente inmunorreactivo en

Resultados

el núcleo geniculado dorsolateral (DLG) (Fig. 16C) y abundantes células PV-IR en VLG (Fig. 16D). En resumen no se encontraron diferencias en el patrón de distribución para parvalbúmina entre los ratones WT y los ratones *Fmr1*-KO (Fig. 16A-F).

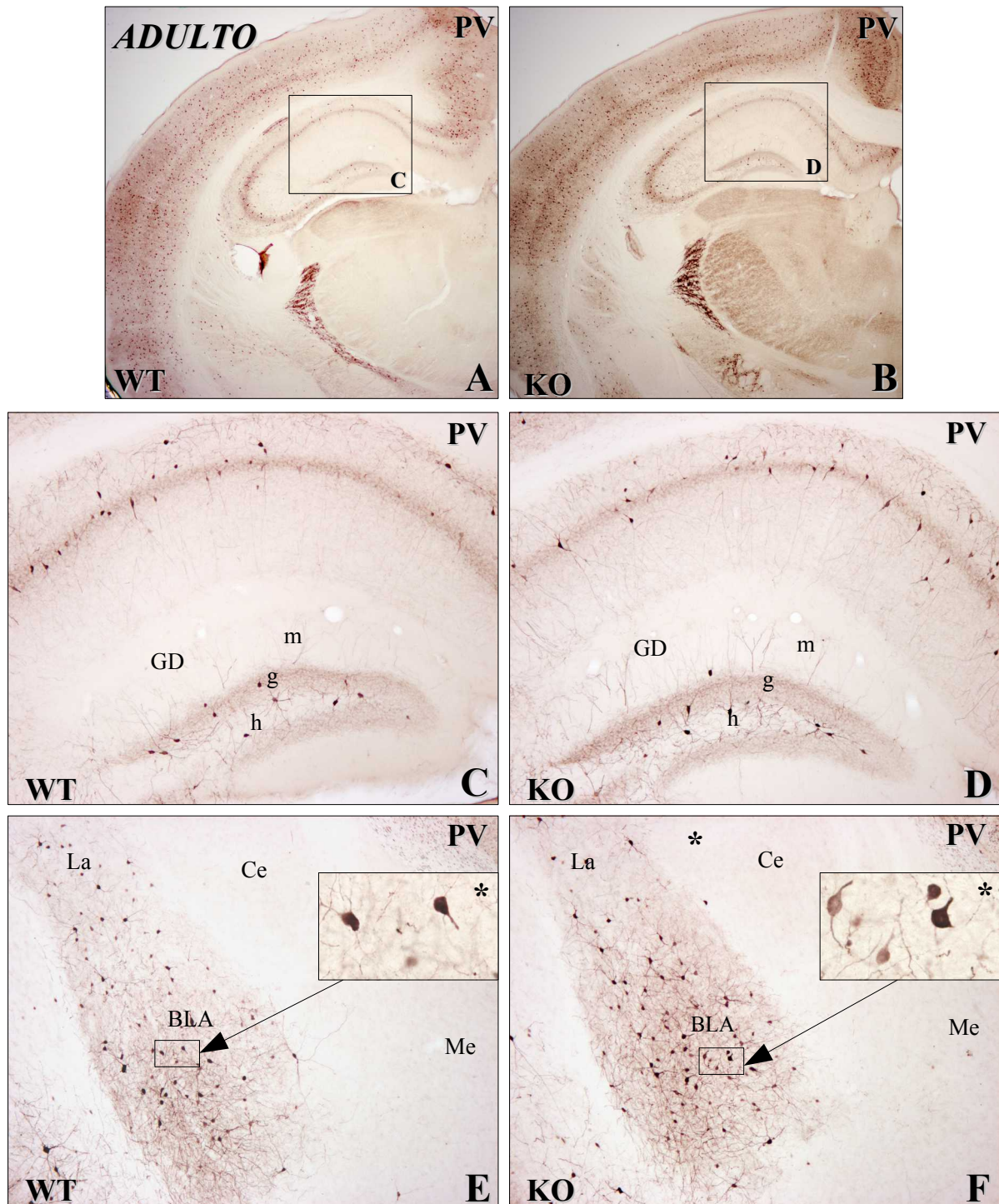


Figura 15. Secciones coronales inmunoteñidas para parvalbúmina (PV) del telencéfalo de ratones machos adultos, donde se observa en A y B una imagen general de parte del telencéfalo y el diencefalo, en C y D parte del hipocampo y en E y F algunos núcleos amígdalinos de ambos genotipos. C, D: En el hipocampo se aprecian células y el neuropilo inmunorreactivo para PV, no encontrándose diferencias entre el genotipo WT y *Fmr1*-KO. E, F: La inmunorreactividad para PV se encuentra localizada en el núcleo lateral y basolateral amígdalino, observándose tanto axones como somas PV-inmunorreactivos (*). En el complejo amígdalino tampoco se aprecia diferencias en cuanto a la distribución de PV. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, B = 25x; C, D, E, F = 100x; * = 400x

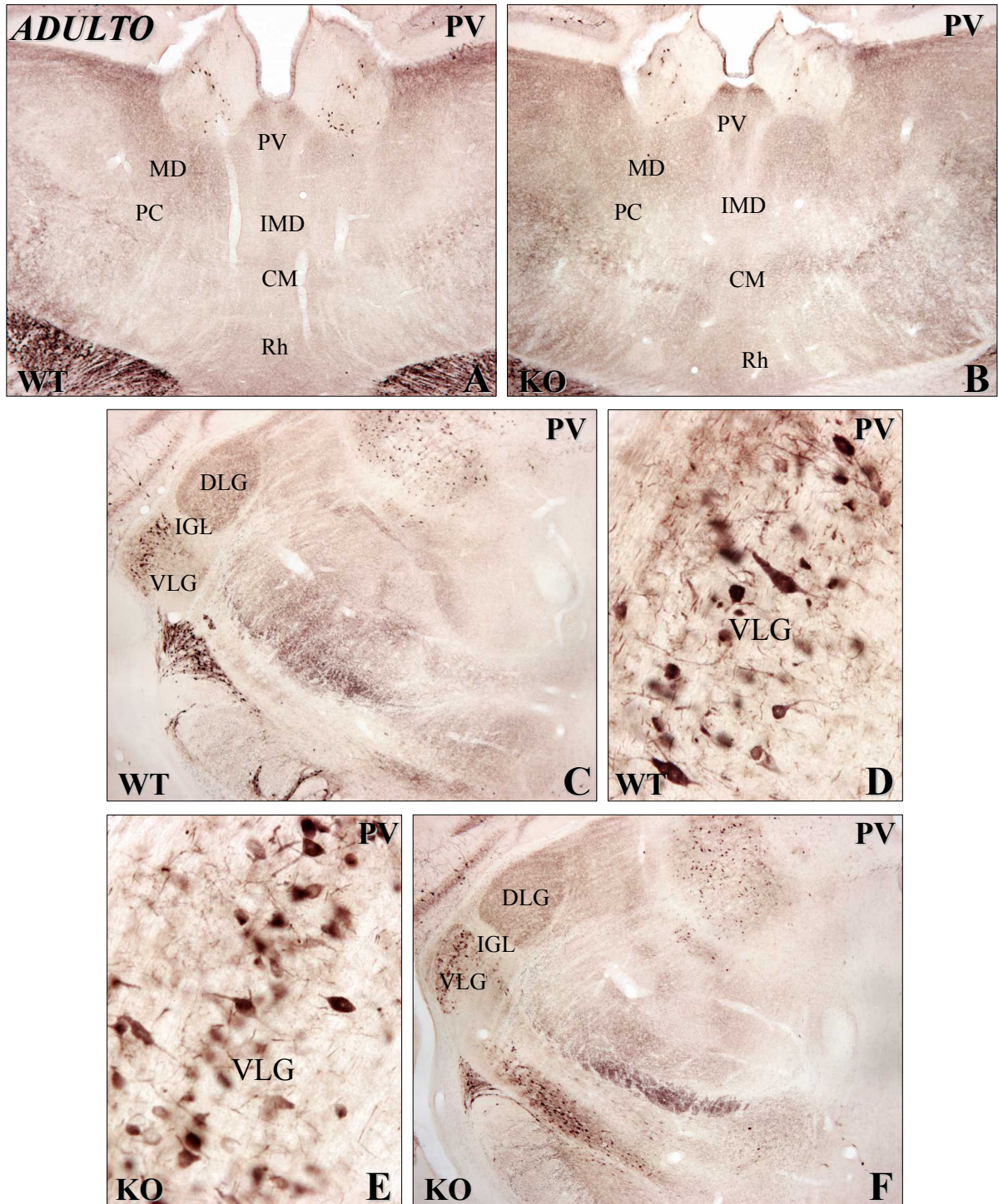


Figura 16. Imágenes de cortes transversales del diencéfalo de ratones machos adultos de ambos genotipos. Se observa inmunorreactividad para parvalbúmina (PV) en el tálamo dorsal de ratones WT en la microfotografía A, C y D y de ratones *Fmr1*-KO en B, E y F. La inmunotición para PV se localiza en el neuropilo, en la parte anterior del tálamo dorsal (A, B). Las células PV-inmunorreactivas (PV-IR) se encuentran en la parte ventrolateral del núcleo geniculado (C, D, E, F). No se aprecian diferencias en la distribución de la inmunorreactividad para PV entre los dos genotipos estudiados (WT y *Fmr1*-KO). IMD, núcleo intermediodorsal; CM, núcleo centromedial; MD, núcleo dorsomedial; PC, núcleo paracentral; PV, núcleo paraventricular; Rh, núcleo romboidal; DLG, núcleo geniculado dorsolateral; IGL, intergeniculado; VLG, núcleo geniculado ventrolateral. Aumentos: A, B, C, F = 50x; D, E = 200x.

1.2.6 Inmunorreactividad para la sintasa del óxido nítrico neuronal en el cerebro anterior de ratones *Fmr1-KO* en comparación a ratones *WT*

Para este estudio inmunohistoquímico se emplearon 4 ratones WT machos y 4 ratones *Fmr1-KO* machos. El anticuerpo empleado fue el utilizado para la realización de los Western Blots (Tabla 3; Pag. 46).

En los experimentos obtenidos mediante la técnica inmunohistoquímica no hemos encontrado diferencias entre ambos genotipos en el patrón de distribución para nNOS en las zonas analizadas, exceptuando la parte interna de la capa molecular del giro dentado del hipocampo (ver más adelante).

En el complejo amigdalino se observó una fuerte inmunorreactividad en la parte medial de la amígdala, observándose gran cantidad de células nNOS-IR y un neuropilo fuertemente inmunorreactivo (Fig. 17A, B). El núcleo lateral y el basolateral presentaron algunas células nNOS-IR dispersas y un neuropilo con una menor inmunorreactividad en comparación con la zona medial amigdalina (Fig. 17A, B). Por último, en el núcleo central no se observaron células nNOS-IR, ni inmunorreactividad a nivel del neuropilo (Fig. 17B). En general, en el complejo amigdalino no encontramos diferencias entre los animales WT y los animales *Fmr1-KO* (Fig. 17A-D).

En todo el hipocampo encontramos células inmunorreactivas para nNOS distribuidas en las distintas regiones que lo conforman, observándose mayor número en el hilio del giro dentado (Fig. 17E). También se observó inmunorreactividad a nivel del neuropilo en todo el hipocampo, excepto en el estrato lacunoso molecular. El estrato oriens de CA3 es el que presenta una mayor inmunotinción de fibras para nNOS de todo el hipocampo (Fig. 17E).

Diferencias cualitativas entre los genotipos estudiados las hemos encontrado en el giro dentado, concretamente en la capa molecular, donde la cantidad de fibras nNOS-IR es menor sobre todo en la parte interna de la misma en todos los animales *Fmr1*-KO observados en relación a los animales WT (Fig. 17E, F).

Los núcleos del tálamo dorsal presentaron muy pocas células nNOS-IR, siendo la inmunorreactividad principalmente a nivel del neuropilo (Fig. 18A, C, E, G). Las fibras nNOS-IR se distribuían por todos los núcleos del tálamo dorsal, aunque en menor medida en el núcleo dorsomedial y de la parte ventral del núcleo geniculado medial (Fig. 18A, C, E, G). No se observó ninguna diferencia en el patrón de distribución de la nNOS entre los ratones WT y los ratones *Fmr1*-KO (Fig. 18A-H).

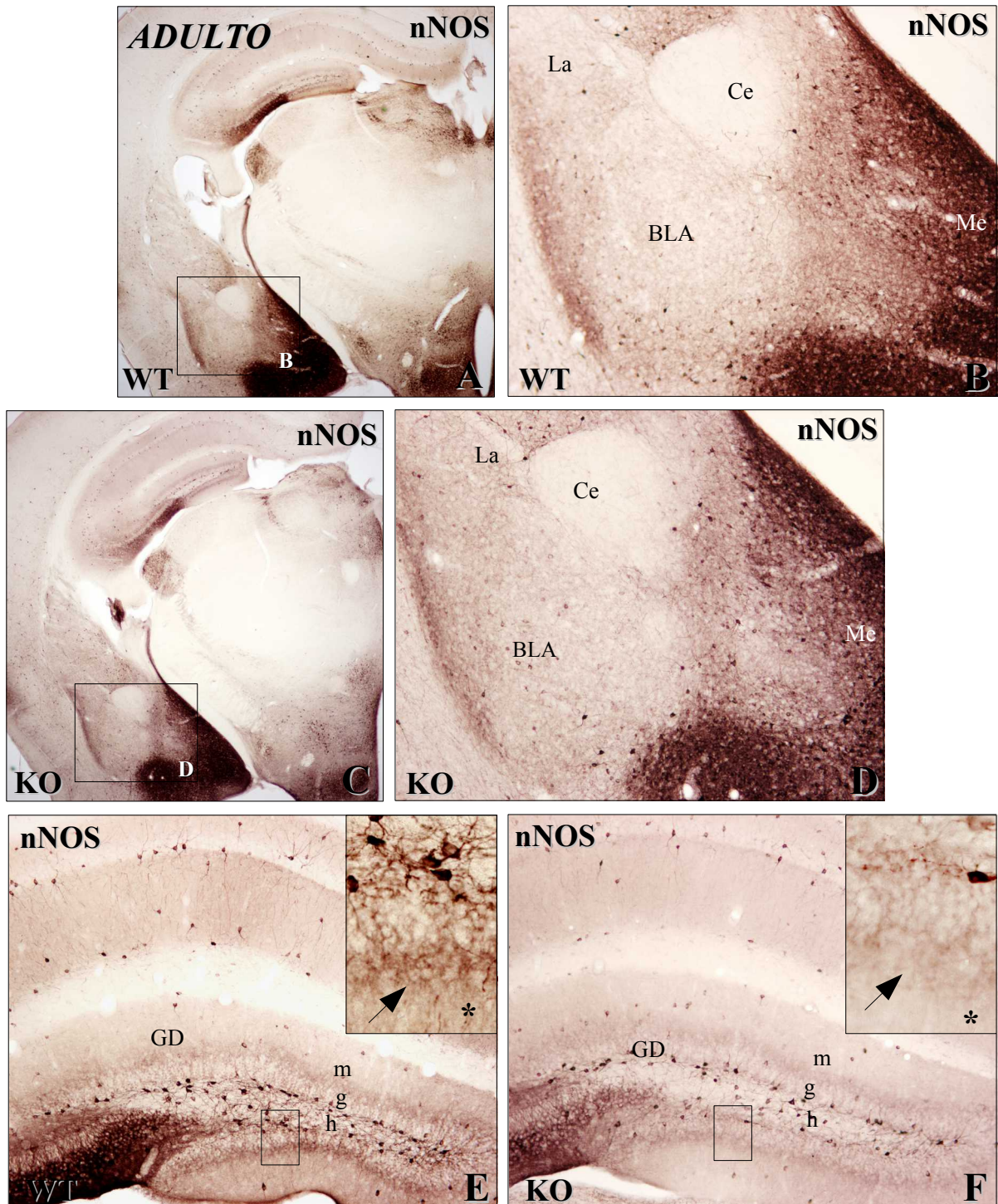


Figura 17. Microfotografías de cortes transversales del telencéfalo de ratones machos adultos. Se observa inmunorreactividad para la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) en el hipocampo y en la amígdala de ratones silvestres en las imágenes A, B, E y de ratones *Fmr1*-KO en las imágenes C, D y F. B, D: Inmunorreactividad para nNOS en el complejo amigdalino en ratón WT y *Fmr1*-KO respectivamente. E, F: Inmunorreactividad para nNOS en hipocampo de ratón WT y *Fmr1*-KO respectivamente. En las imágenes puede apreciarse una disminución de la inmunorreactividad en ratones *Fmr1*-KO en el giro dentado a nivel axonal, esta diferencia es principalmente visible en la parte interna de la capa molecular, señalada con una fecha negra en el detalle (*). GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, C = 25x; B, D, E, F = 100x; * = 400x.

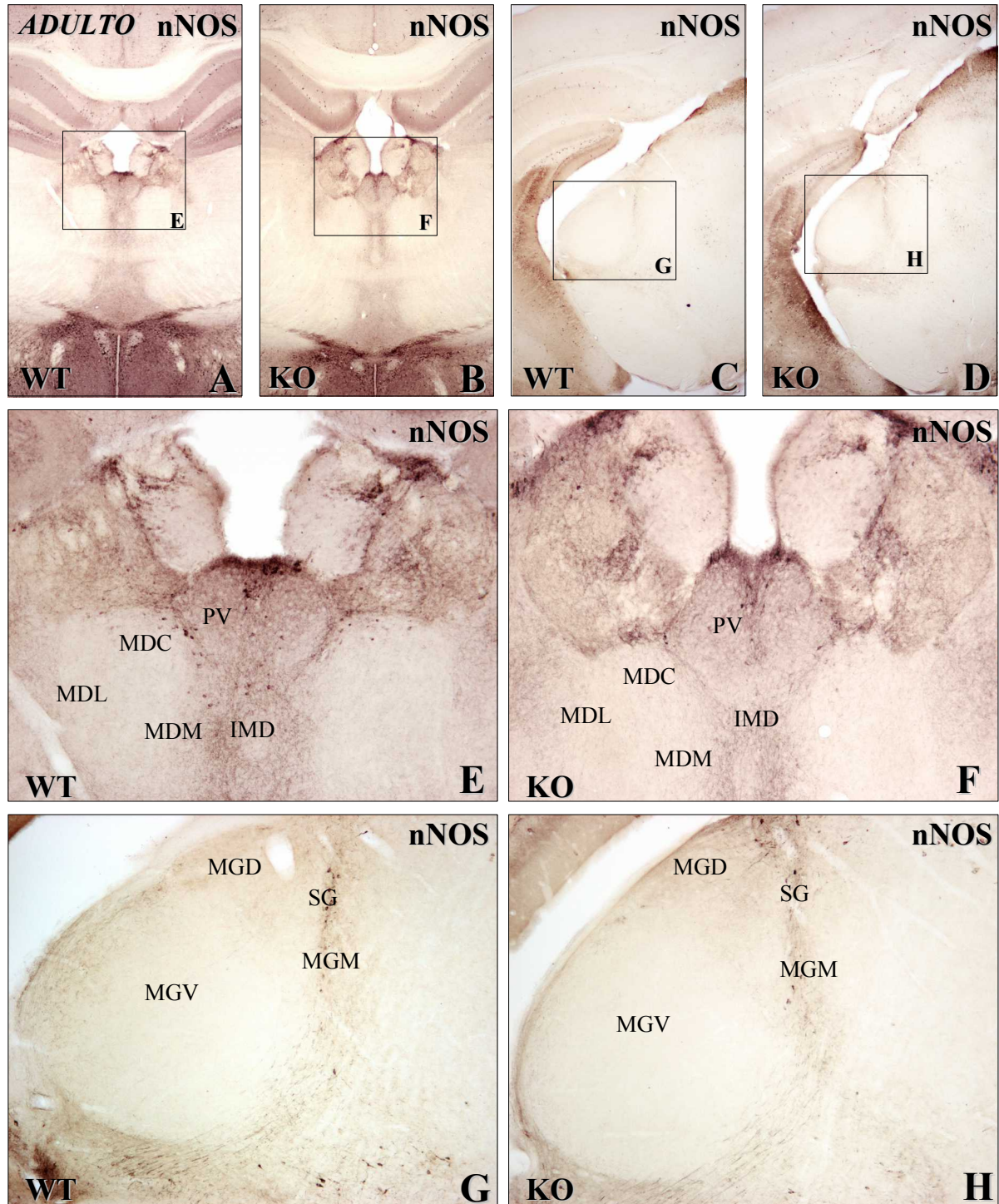


Figura 18. Inmunorreactividad para la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) en secciones transversales del tálamo dorsal de ratones WT y *Fmr1*-KO machos adultos. No se aprecian diferencias en cuanto a la distribución de nNOS entre el genotipo WT y *Fmr1*-KO. PV, núcleo paraventricular; CM, núcleo centromedial; IMD, núcleo intermediodorsal; MDM, parte medial del núcleo dorsomedial; MDC, parte central del núcleo dorsomedial; MDL, parte lateral del núcleo dorsomedial; SG, núcleo supragenicolado; MGD, parte dorsal del núcleo geniculado medial; MGM, parte medial del núcleo geniculado medial; MGV, parte ventral del núcleo geniculado medial; PIL, parte posterior del núcleo intralaminar. Aumentos: A, B, C, D = 25x; E, F, G, H = 100x.

2. Estudio comparado de los transportadores vesiculares de glutamato tipo 1 y 2 (VGLUT1, VGLUT2) como marcadores de neuronas glutamatérgicas en ratones WT y ratones Fmr1-KO

En primer lugar se analizó una serie de marcadores neuronales con el objetivo de realizar un estudio comparado de las células GABAérgicas entre ratones WT y *Fmr1-KO*, como se ha descrito en el apartado anterior.

Y a continuación se analizaron los transportadores vesiculares de glutamato VGLUT1 y VGLUT2 con la intención de realizar un estudio comparado similar al anterior, pero a nivel de las neuronas glutamatérgicas. Para estos estudios se utilizaron ratones machos adultos con edades comprendidas entre los 3 y 7 meses.

En el sistema nervioso central, VGLUT1 y/o VGLUT2 parecen estar presentes en todas las vías glutamatérgicas (Bellocchio y cols., 1998 , Bellocchio y cols., 2000, Takamori y cols., 2000, Fremeau y cols., 2001, Sakata-Haga y cols., 2001, Kaneko y Fujiyama, 2002, Kaneko y cols., 2002). Por tanto hemos considerado a VGLUT1 y VGLUT2 unos buenos marcadores de neuronas glutamatérgicas.

2.1 Western Blots para VGLUT1 y VGLUT2

Para la realización de este estudio se utilizaron extractos de cerebro de ratones machos empleando un total de 6 ratones machos adultos WT y 6 ratones machos *Fmr1-KO*.

Para el Western Blot se emplearon anticuerpos que reconocían una banda de proteína específica con el peso molecular concreto de cada anticuerpo, 62 kDa para VGLUT1 y 52 kDa para VGLUT2 (Fig. 19).

En este estudio no se encontraron diferencias entre los transportadores vesiculares de glutamato tipo 1 y 2 entre los ratones *Fmr1*-KO y WT.

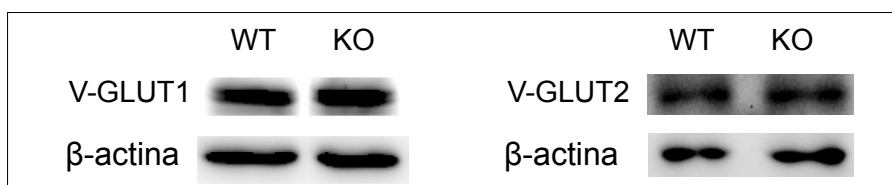


Figura 19. Western Blot donde se observó la expresión de los transportadores vesiculares de glutamato tipo 1 (VGLUT1) y tipo 2 (VGLUT2) en extractos de cerebro de ratones WT y ratones *Fmr1*-KO. Se utilizaron anticuerpos frente a VGLUT1 y VGLUT2 que mostraron una banda con peso molecular de aproximadamente 62kDa y 52kDa respectivamente. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. Como se aprecia en la imagen no se observan diferencias entre los distintos genotipos estudiados.

2.2 Inmunohistoquímicas para *VGLUT1* y *VGLUT2*

Los estudios inmunohistoquímicos para los transportadores vesiculares de glutamato tipo 1 y 2 se realizaron en las mismas regiones analizadas con los marcadores anteriores, con el objetivo de realizar un estudio comparativo entre los ratones WT y *Fmr1*-KO de manera cualitativa a nivel del complejo amigdalino, del hipocampo y del tálamo dorsal, en todas las neuronas glutamatérgicas.

Existen evidencias en ratas en las cuales no se han encontrado ninguna población de neuronas excitadoras que no exprese VGLUT1 o VGLUT2, al mismo tiempo que no se ha detectado ninguna expresión de VGLUT1 o VGLUT2 en neuronas no glutamatérgicas (Fremeau y cols., 2001).

2.2.1 Inmunorreactividad para VGLUT1 y VGLUT2 en el cerebro anterior de ratones *Fmr1-KO* en comparación a ratones *WT*

Para este estudio inmunohistoquímico se utilizaron 4 ratones WT machos y 4 ratones *Fmr1-KO* machos. Los anticuerpos utilizados fueron los mismos usados para la realización del Western Blot (Tabla 3; Pag. 46).

En general la expresión de ambos transportadores vesiculares se encontró localizada en los terminales sinápticos, puesto que es aquí donde realizan su función facilitando el transporte del glutamato al interior de las vesículas de transporte. En nuestros experimentos se observó inmunorreactividad sólo a nivel del neuropilo, no encontrándose ningún soma VGLUT-IR (Fig. 20, 21, 22, 23). Los cuerpos celulares aparecen sin inmunotinción como se aprecia claramente a mayores aumentos (Fig 20F).

No se observaron diferencias en el patrón de distribución entre los ratones WT y *Fmr1-KO* en ninguno de los dos transportadores vesiculares de glutamato (Fig. 20, 21, 22, 23).

El complejo amigdalino presentó inmunorreactividad para ambos transportadores en todos los núcleos que lo conforman, siendo el patrón de distribución diferente según el tipo de transportador (Fig. 20A, B; Fig. 21A, B). La inmunorreactividad para VGLUT1 fue homogénea en todos los núcleos de la amígdala (Fig. 20A, B), sin embargo para VGLUT2 se observó una mayor inmunotinción en la parte medial en relación al núcleo central, basolateral y lateral de la amígdala (Fig 21A, B).

Al igual que en nuestros estudios, existen estudios realizados en rata donde se observa un patrón similar de distribución para ambos transportadores en el complejo amigdalino (Fremeau y cols., 2001).

A nivel amigdalino no hemos encontrado diferencias entre los ratones WT y *Fmr1-KO* para cada uno de los transportadores vesiculares de glutamato (Fig. 20A-D Fig 21A-D).

En el hipocampo, en general, se observó que la inmunorreactividad para ambos transportadores vesiculares es complementaria (Fig. 20A, E; Fig. 21A, E). Esta particular complementariedad en el hipocampo es similar a lo descrito en cerebro de ratas (Fremeau y cols., 2001).

En la región CA hipocampal la inmunotinción para VGLUT2 se localizó principalmente en los terminales axónicos de la capa piramidal CA2. Sin embargo la inmunorreactividad para VGLUT1 se observó en los terminales axónicos localizados en el estrato oriens y radiatum desde CA1 a CA3 y en el estrato lucidum de CA2. Los terminales del estrato oriens y radiatum son los terminales de las células piramidales de CA3 y los terminales del estrato lucidum son los terminales de los axones de las células granulares dentadas respectivamente (Storm-Mathisen y cols., 1983).

En el giro dentado la inmunorreactividad para VGLUT2 se localizó en la capa granular, sobre todo en la parte más superficial (Fig. 21E, G) mientras que la inmunorreactividad para VGLUT1 se localizó preferentemente en la capa molecular y en los terminales de las células musgosas en el hilio (Fig. 20E, F).

Después de analizar el hipocampo en los distintos genotipos no se observó ninguna diferencia en el patrón de distribución de ambos transportadores vesiculares (Fig. 20E-H; Fig. 21E-H).

El tálamo dorsal presentó un patrón de distribución diferente según el tipo de transportador vesicular analizado tal y como se ha descrito en estudios realizados en cerebro de ratas (Fremeau y cols., 2001).

VGLUT2 predominó principalmente en los núcleos intralaminares y de la línea media, siendo menor la inmunorreactividad para VGLUT2 en el núcleo dorsomedial y en el paracentral (Fig. 23A, C), mientras que el patrón de distribución para VGLUT1 en esta zona fue más homogéneo, encontrándose una fuerte inmunotinción en el núcleo dorsomedial y en el paracentral (Fig. 22A).

En la parte posterior del tálamo dorsal la inmunorreactividad para VGLUT2 fue mucho mayor que para VGLUT1, se observaron terminales VGLUT2-IR en toda la parte posterior del tálamo dorsal (Fig. 23E), mientras que VGLUT1 presentó una fuerte inmunorreactividad en los terminales del núcleo geniculado dorsomedial y apenas inmunorreactividad en los terminales del núcleo geniculado ventrolateral (Fig. 22C, E).

Al igual que observamos en la amígdala y en el hipocampo, en el estudio comparativo de ratones WT y ratones *Fmr1*-KO para el tálamo dorsal no se encontraron diferencias cualitativas en la inmunorreactividad para estos dos marcadores de células glutamatérgicas (Fig. 22A-F; Fig. 23A-F).

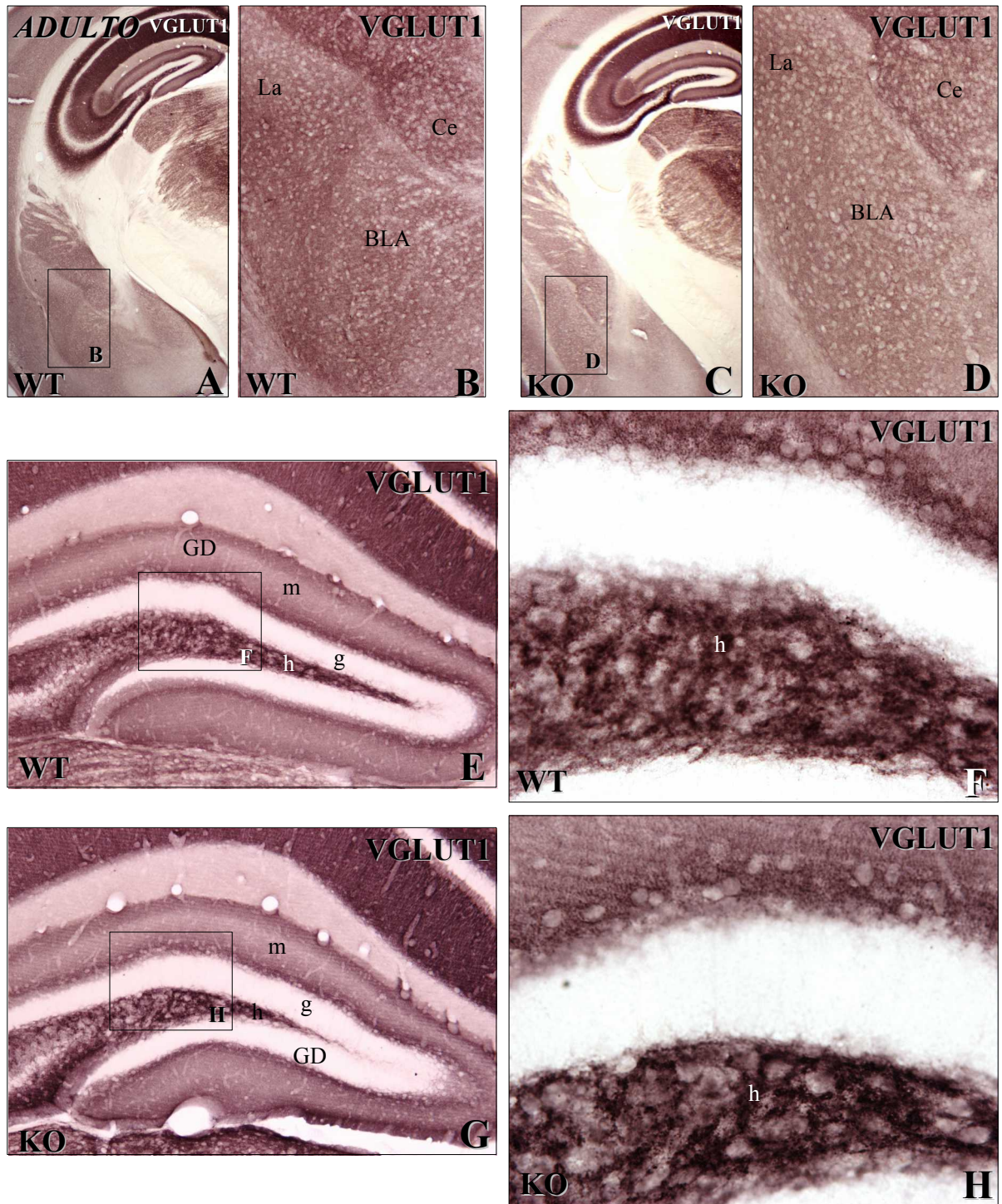


Figura 20. Imágenes de cortes coronales del telencéfalo de ratones machos adulto. Se observa inmunorreactividad para el transportador vesicular de glutamato tipo 1 (VGLUT1) en el complejo amigdalino de ratones WT en las imágenes A y B y de ratones *Fmr1*-KO en las imágenes C y D. En el hipocampo (E, F, G, H) se aprecia una fuerte inmunotinción en el hilio del giro dentado como se observa en las imágenes ampliadas F y H de ratones WT y *Fmr1*-KO respectivamente. No se encuentran diferencias entre los dos genotipos. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, C = 25x; B, D, E, G = 100x; F, H = 400x.

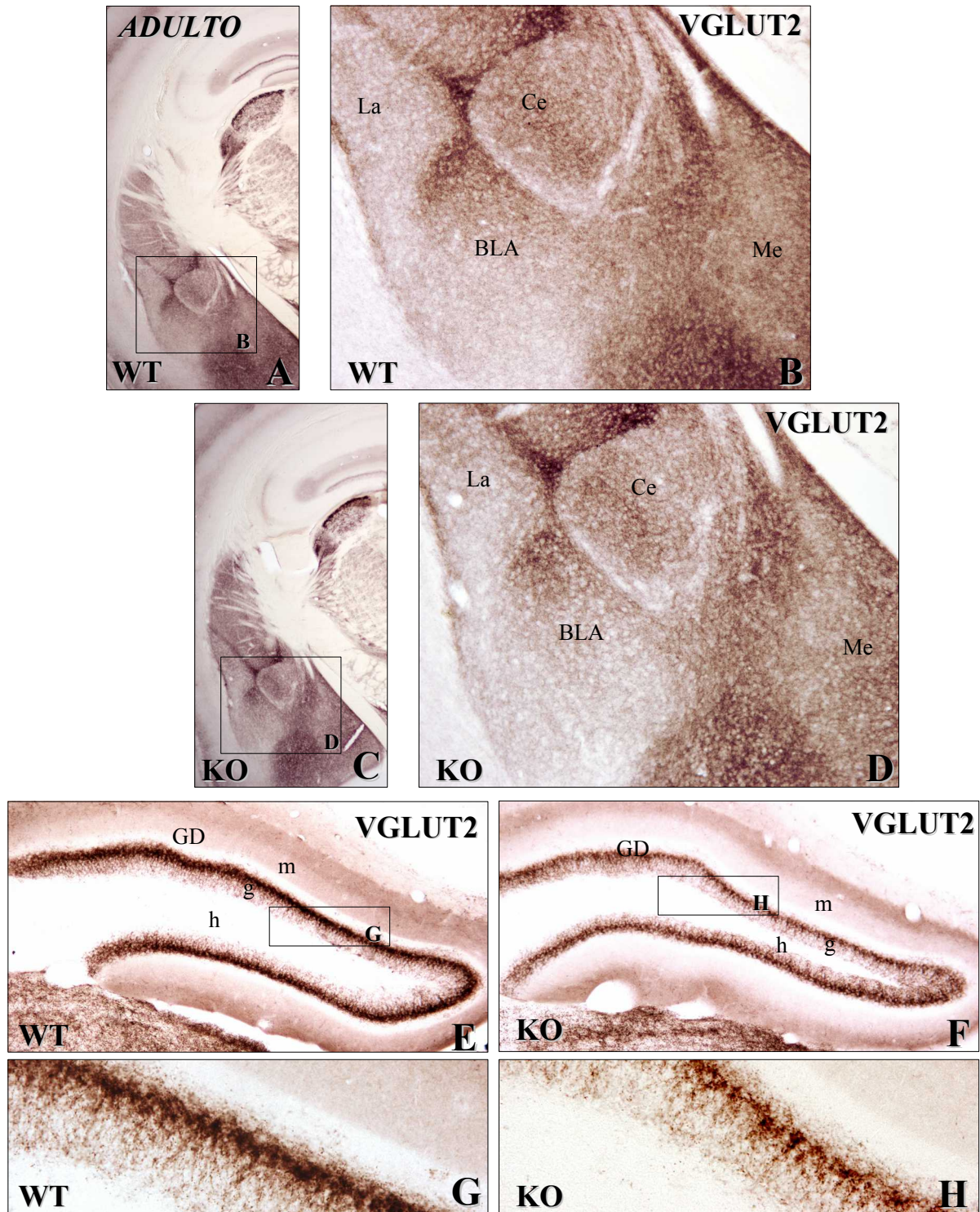


Figura 21. Secciones transversales del telencéfalo de ratones machos adulto. Se observa inmunorreactividad para el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGLUT2) en el neuropilo celular de ratones WT (A, B, E, G) y de ratones *Fmr1*-KO (C, D, F, H). Este transportador se encuentra próximo al lugar de sinapsis por lo que no se encuentra inmunotinción en el soma de las neuronas. La distribución de la inmunorreactividad para VGLUT2 es similar en ambos genotipos. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, C = 25x; B, D, E, F = 100x; G, H = 400x.

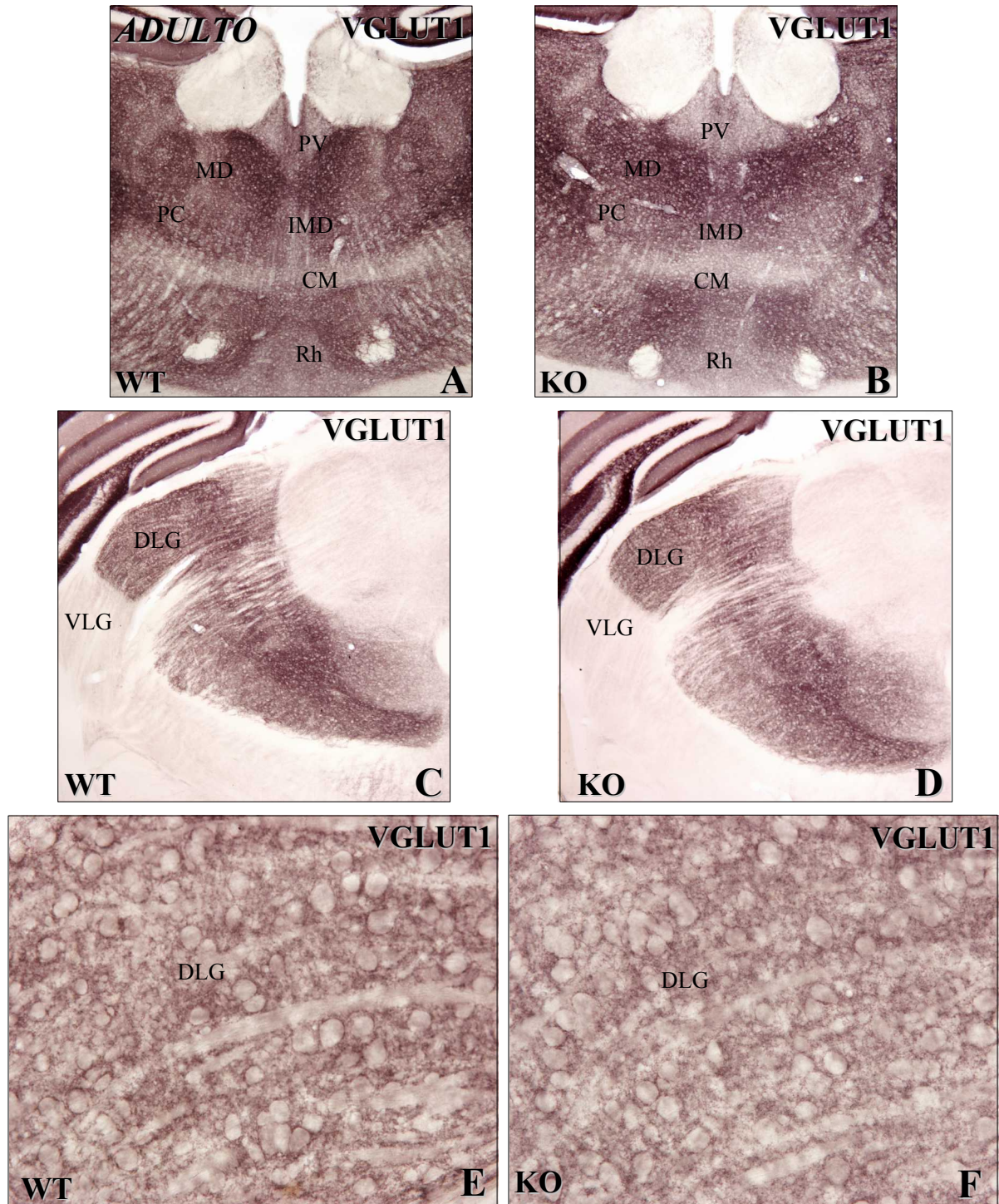


Figura 22. Microfotografías transversales del diencefalo de ratones machos adultos. Se observa inmunorreactividades para el transportador vesicular de glutamato tipo1(VGLUT1) en el tálamo dorsal de ratones WT a la izquierda y de ratones *Fmr1*-KO a la derecha. Es apreciable una alta inmunorreactividad para VGLUT1 en el tálamo dorsal, localizada exclusivamente en el neuropilo neuronal, como se observa a mayor detalle en la imagen E y F, ya que VGLUT1 se encuentra en vesículas de glutamato. La distribución de la inmunorreactividad es similar en ambos genotipos. IMD, núcleo intermediodorsal; CM, núcleo centromedial; MD, núcleo dorsomedial; PC, núcleo paracentral; PV, núcleo paraventricular; Rh, núcleo romboidal; DLG, núcleo geniculado dorsolateral; VLG, núcleo geniculado ventrolateral. Aumentos: A, B, C, D = 50x; E, F = 400x.

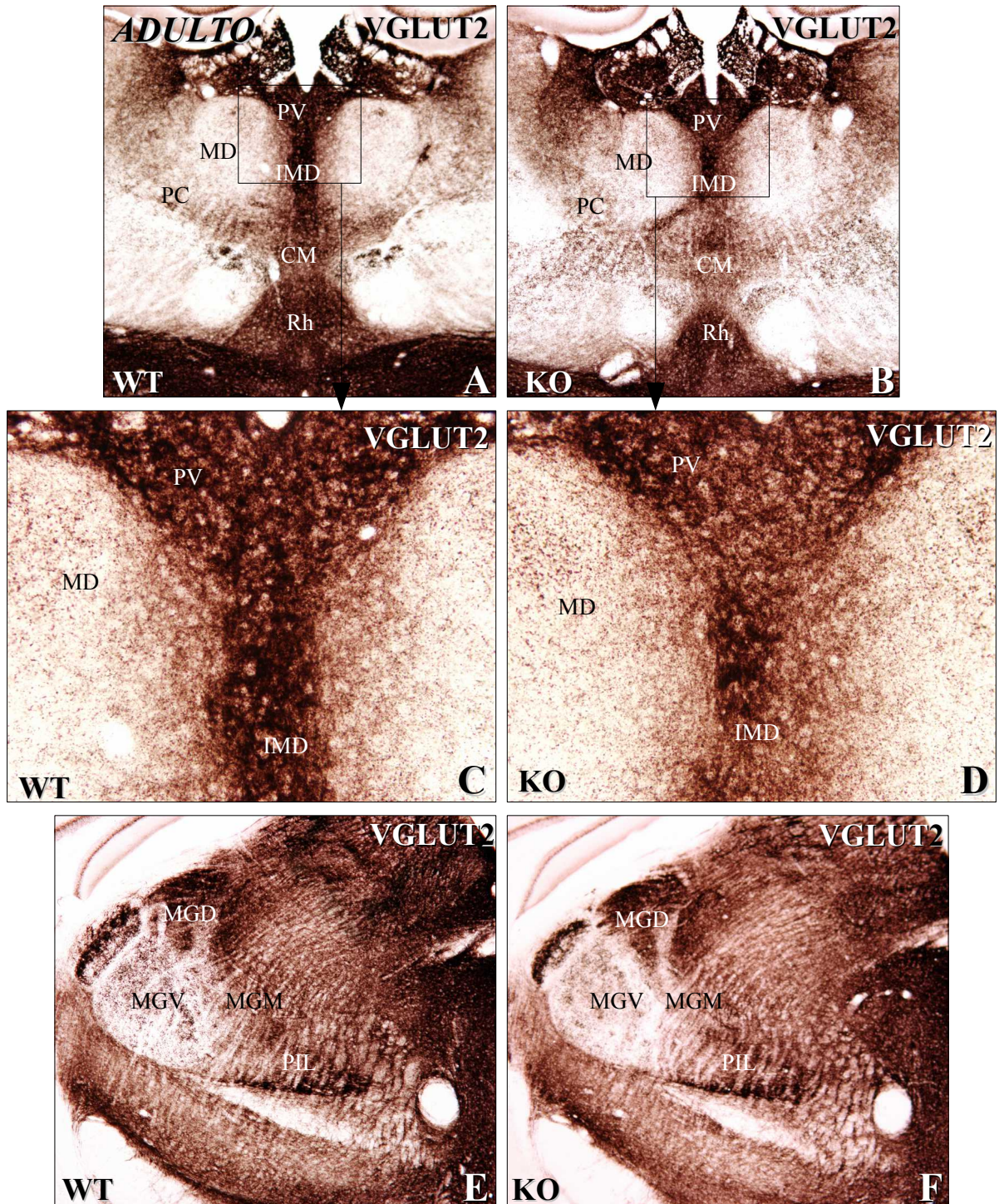


Figura 23. Imagen de secciones coronales del tálamo dorsal de ratones WT y *Fmr1*-KO machos adultos. Se observa inmunoreactividad para VGLUT2, el transportador vesicular de glutamato tipo 2. La inmunotinción esta presente en axones y dendritas, donde se encuentran ubicadas las vesículas de glutamato. A, C, E : VGLUT2-inmunoreactividad en los núcleos del tálamo dorsal de ratones del genotipo WT. B, D, F : Inmunoreactividad de VGLUT2 en ratones *Fmr1*-KO para los mismos núcleos talámicos que en ratones WT. IMD, núcleo intermediodorsal; CM, núcleo centromedial; MD, núcleo dorsomedial; PC, núcleo paracentral; PV, núcleo paraventricular; Rh, núcleo romboidal; MGD, parte dorsal del núcleo geniculado medial; MGM, parte medial del núcleo geniculado medial; MGV, parte ventral del núcleo geniculado medial; PIL, parte posterior del núcleo intralaminar. Aumentos: A, B, E, F = 50x; C, D = 200x.

3. Estudio comparado de la proteína quinasa II alfa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII α) en ratones WT y ratones *Fmr1-KO*

Existen estudios recientes sobre el síndrome X-Frágil cuyo análisis está centrado a nivel presináptico (Christie y cols., 2009; Till y cols., 2010; Deng y cols., 2011; Klemmer y cols., 2011; Akins y cols., 2012). La CaMKII α es una quinasa que podemos encontrar en el terminal presináptico fosforilando a otras proteínas y por tanto pensamos que podría estar relacionada de forma indirecta con la liberación del neurotransmisor. Como dato importante hay que tener en cuenta que la síntesis de CaMKII α esta regulada por FMRP (Darnell y cols., 2011).

Por tanto hemos considerado a esta proteína una buena candidata para realizar un estudio comparado entre ratones WT y *Fmr1-KO* con la intención de evaluar posibles cambios a nivel presináptico.

Hemos estudiado tanto CaMKII α como su forma fosforilada p-CaMKII α mediante el empleo de la técnica Western Blot y la técnica inmunohistoquímica. Este estudio ha sido realizado a lo largo del desarrollo postnatal con la intención de realizar un análisis más completo y evaluar posibles diferencias en el desarrollo de los ratones *Fmr1-KO*.

3.1 Western Blots para CaMKII α durante el desarrollo postnatal en ratones WT

Para la realización de los Western Blots se empleó un anticuerpo frente a CaMKII α que reconocía una banda de proteína específica con un peso molecular aproximado de 50 kDa (Tabla 3; Pag. 46). Este anticuerpo fue utilizado en otros estudios para Western Blot obteniéndose resultados similares (Mouton-Liger y cols., 2011).

Para este estudio se emplearon desde ratones recién nacidos hasta adulto (P0, P4, P7,

P14, P21, Adulto), de cada estadio se analizaron 3 ejemplares. Se utilizó la proteína β -actina como control de carga (Fig. 24). La primera expresión de CaMKII α se observó a partir de los postnatales de 4 días de edad, no observándose expresión para esta proteína en los ratones recién nacidos (Fig. 24). A partir de P4 se observó expresión para esta proteína en todos los estadios analizados como se observa en la siguiente figura.

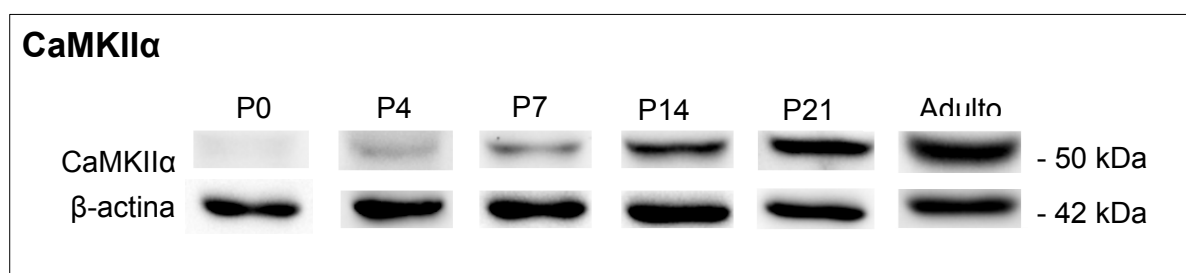


Figura 24. Niveles de expresión de la proteína quinasa II alfa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina (CaMKII α) en extractos de cerebro de ratones, desde recién nacidos (P0) hasta adulto de 7 meses. Western Blot utilizando anticuerpos frente a CaMKII α . Se obtuvo una sola banda con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Se observó expresión para CaMKII α a partir de postnatales de 4 días de edad (P4). La proteína β -actina se utilizó como control de carga.

Existen evidencias que apoyan nuestros resultados donde se aprecia un aumento elevado del ARNm de CaMKII α en ratones postnatales de 5 días de edad. En ese estudio se empleó el análisis de transferencia Northern, analizando ejemplares P1, P3, P5, P8 y adulto (Bayer y cols., 1999). No se observó ARNm de CaMKII α en P1 y P3, mientras que sí hubo expresión en P5, P8 y adulto, siendo en el adulto donde se observó la mayor cantidad de ARNm de CaMKII α (Bayer y cols., 1999).

3.2 Western Blots para p-CaMKII α durante el desarrollo postnatal en ratones WT

El anticuerpo utilizado para esta técnica reconocía una banda específica de aproximadamente 50kDa (Tabla 3; Pag.46) y se usó la proteína β -actina como control de carga. Este anticuerpo ha sido empleado en otros estudios anteriores obteniéndose bandas semejantes (Slonimsky y cols., 2006).

Para este estudio se utilizaron los mismos ejemplares utilizados en el apartado anterior prescindiendo de los P0, ya que observamos que en este estadio no está presente CaMKII α y

por tanto tampoco lo estará su forma fosforilada. El análisis de este Western Blot nos dio como resultado expresión de p-CaMKII α a partir de P7 hasta adulto (Fig. 25). No observamos ninguna expresión de p-CaMKII α en P4 (Fig. 25) a pesar de haber encontrado una leve expresión de CaMKII α en este estadio (Fig. 25). Esto sugiere que es a partir de la primera semana de vida cuando CaMKII α comienza a autofosforilarse y por tanto a realizar su función.

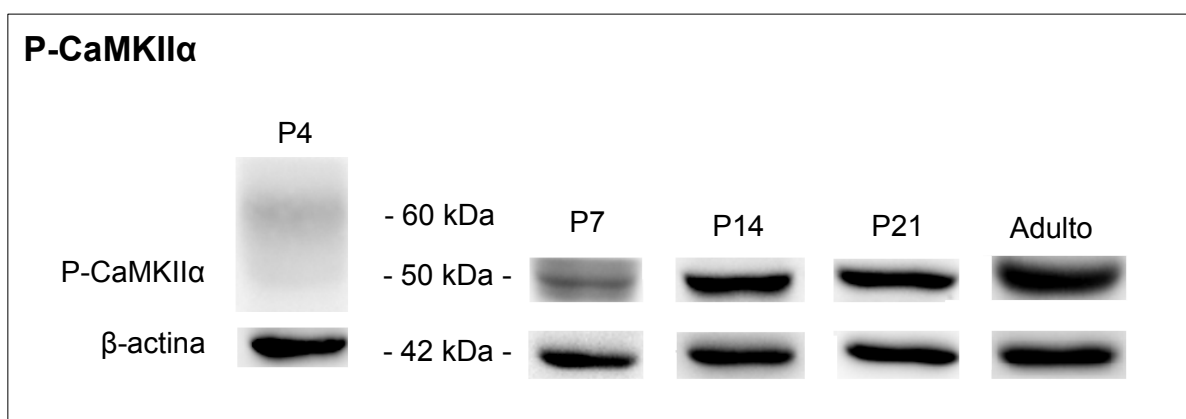


Figura 25. Imágenes obtenidas de Western Blot utilizando anticuerpo contra la proteína quinasa II alfa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina en su estado fosforilado (p-CaMKII α). Se utilizaron extractos de cerebro de ratón desde posnatales de 4 días (P4), edad a partir de la cual se ha observado expresión para CaMKII α , hasta adulto de 7 meses. Se obtuvo expresión para p-CaMKII α a partir de posnatales de 7 días (P7). La proteína β -actina se utilizó como control de carga.

Una vez analizado en qué estadios postnatales se expresa CaMKII α y su forma activa p-CaMKII α en ratones WT, se procedió a realizar Western Blots en ratones *Fmr1-KO* en las mismas etapas postnatales junto con el genotipo WT con el fin de estudiar si existen diferencias entre ambos genotipos (apartado 3.3).

3.3 Western Blots para CaMKII α y p-CaMKII α en ratones WT y ratones *Fmr1-KO* durante el desarrollo postnatal hasta adulto

En todos los estudios de Western Blot para esta quinasa se utilizaron los mismos anticuerpos que en los dos apartados anteriores (Tabla 3; Pag. 46). Hemos estudiado la cantidad de proteína CaMKII α y p-CaMKII α en el cerebro anterior de ratones WT y ratones *Fmr1-KO* a lo largo del desarrollo postnatal utilizando ejemplares P7, P14, P21 y adultos de 3 y 7 meses de edad. En todos los estudios se utilizó la β -actina como proteína de carga.

El estudio comparativo entre los ejemplares WT y los ejemplares *Fmr1*-KO se realizó a partir de P7, ya que partir de este estadio es cuando observamos expresión para p-CaMKII α en el genotipo WT, momento en el que comienza a ser funcional.

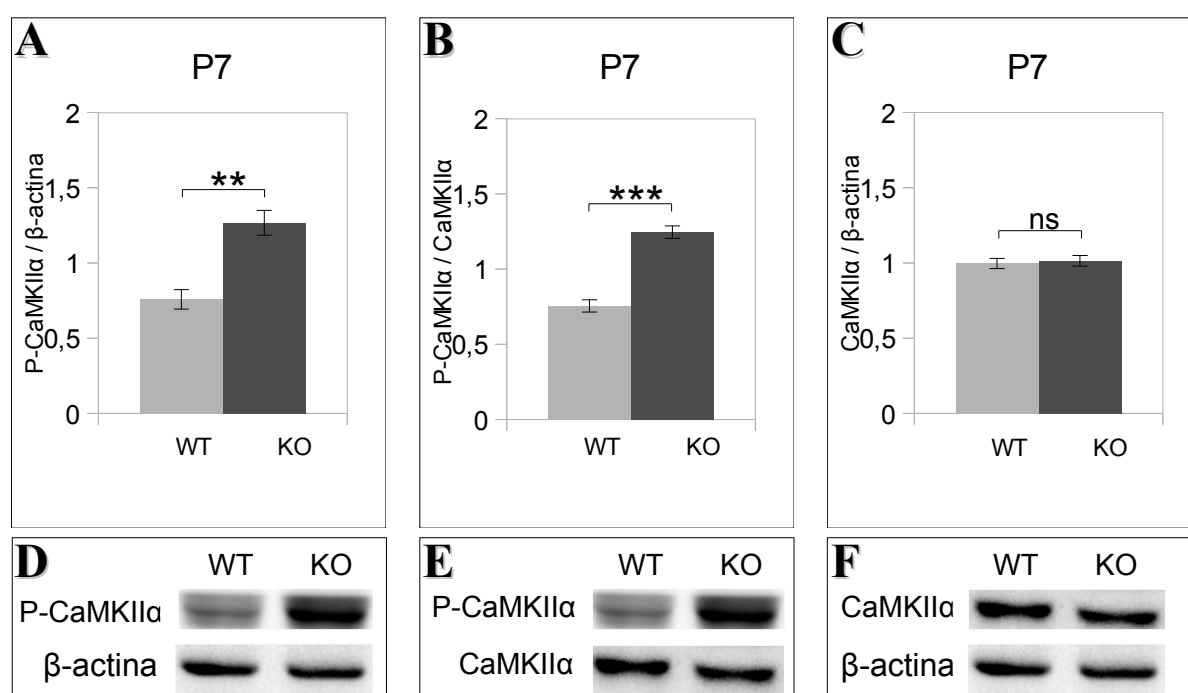


Figura 26. Análisis densitométrico (A, B, C) y niveles de expresión (D, E, F) de la quinasa II alfa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina y de su forma fosforilada en cerebros de ratones WT y *Fmr1*-KO de una semana de edad. A, B, C: Representa la media \pm SEM de 5 ratones WT y 5 ratones *Fmr1*-KO. A, C: Análisis densitométrico para p-CaMKII α y CaMKII α normalizado por β -actina. B: Análisis de p-CaMKII α respecto a CaMKII α , dato que nos ofrece información sobre la actividad de esta quinasa. D, E, F: Niveles de expresión obtenidos por Western Blot para una de las parejas (WT y *Fmr1*-KO) de las 5 utilizadas para el estudio densitométrico representado gráficamente en la parte superior. En este estadio se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de proteína p-CaMKII α y en su actividad (p-CaMKII α /CaMKII α) y ninguna diferencia en la quinasa total. * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001.

En P7 se analizaron 5 ejemplares de cada genotipo y se encontraron diferencias en la cantidad de p-CaMKII α y no en la proteína total CaMKII α entre los ratones WT y los ratones *Fmr1*-KO (Fig. 26D, E, F), por tanto podemos decir que desde la primera semana de vida observamos diferencias relacionadas con la actividad de CaMKII α .

Se realizó un estudio densitométrico para CaMKII α normalizado por β -actina para saber la cantidad de proteína total (Fig 26C), uno para p-CaMKII α normalizado por β -actina

para evaluar la cantidad de proteína fosforilada presente en ambos genotipos (Fig 26A), y uno para p-CaMKII α normalizado por CaMKII α como valor de actividad de dicha proteína (Fig. 26B). Una vez realizado el análisis densitométrico se empleó el análisis estadístico t de Student para dos muestras independientes. Existen diferencias significativas en la cantidad de proteínas p-CaMKII α ($p < 0.01$) y en su actividad (p-CaMKII α /CaMKII α) ($p < 0.001$) entre los ratones WT y los *Fmr1*-KO. Encontramos una mayor cantidad de p-CaMKII α y mayor actividad en los ejemplares P7 *Fmr1*-KO en comparación a los ejemplares WT (Fig. 26A, B). En relación a la cantidad de proteína total CaMKII α no se observaron diferencias entre los dos genotipos (Fig. 26C).

Para el estudio comparativo entre ejemplares P14 WT y *Fmr1*-KO se realizaron los mismos estudios que los empleados para P7, utilizando 6 ratones por cada genotipo. El resultado de los Western Blots fue similar al obtenido para los P7 (Fig. 27D, E, F).

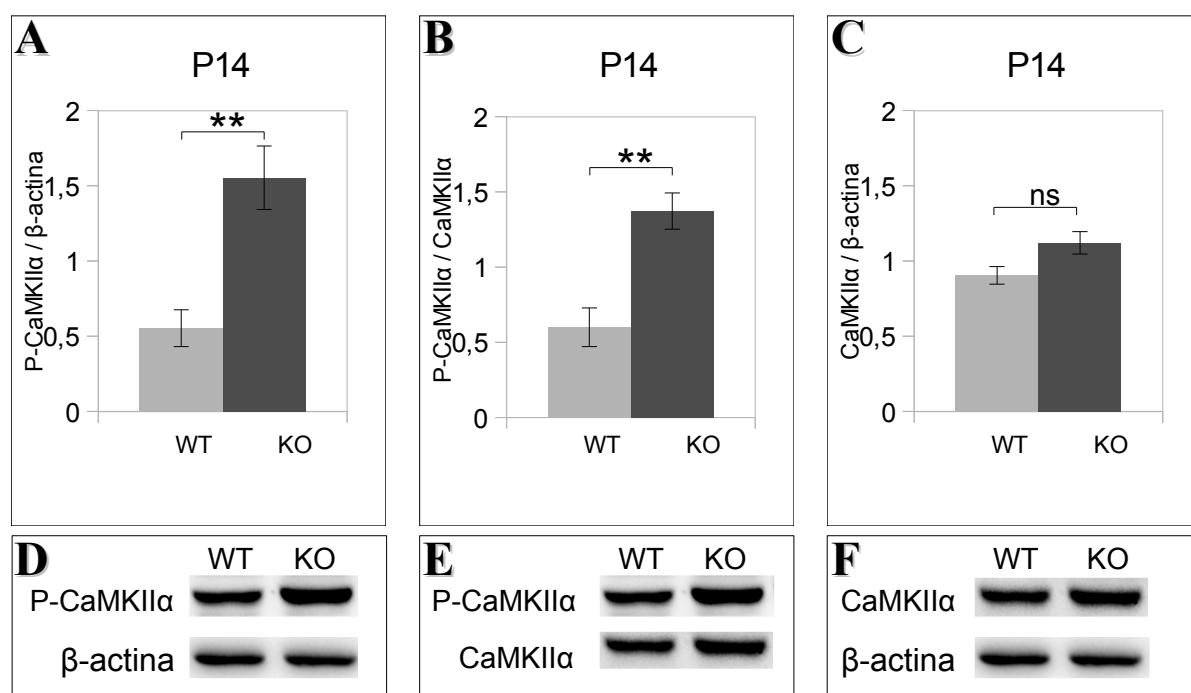


Figura 27. Análisis densitométrico (A, B, C) y niveles de expresión (D, E, F) de la quinasa II alfa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina y de su forma fosforilada en cerebros de ratones P14 WT y P14 *Fmr1*-KO. A, B, C: Representa la media \pm SEM de 6 ratones WT y 6 ratones *Fmr1*-KO. A, C: Análisis densitométrico para p-CaMKII α y CaMKII α normalizado por β -actina. B: Análisis de p-CaMKII α respecto a CaMKII α , dato que nos ofrece información sobre la actividad de esta quinasa. D, E, F: Niveles de expresión obtenidos por Western Blot para una de las parejas (WT y *Fmr1*-KO) de las 6 utilizadas para el estudio densitométrico representado gráficamente en la parte superior. En este estadio se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de proteína p-CaMKII α y en su actividad (p-CaMKII α /CaMKII α) y ninguna diferencia en la quinasa total. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Se observó mayor cantidad de p-CaMKII α en los ejemplares *Fmr1*-KO en relación a los WT, sin encontrar diferencias para CaMKII α (Fig 27D, E, F).

Tras realizar el análisis densitométrico seguido de la prueba estadística t de Student para dos muestras independientes, se encontraron diferencias significativas en p-CaMKII α y en su actividad (p-CaMKII α /CaMKII α) (Fig. 27A, B). De nuevo se observó mayor cantidad de proteína p-CaMKII α (p<0.01) (Fig. 27A) y mayor actividad (Fig. 27B) en los ratones P14 *Fmr1*-KO en relación a los ratones WT. No se encontró ninguna diferencia en la proteína total CaMKII α entre ambos genotipos (Fig. 27C, F).

El siguiente estudio fue realizado en los ejemplares de 21 días de edad, se analizaron 9 ejemplares WT y 9 ejemplares *Fmr1*-KO.

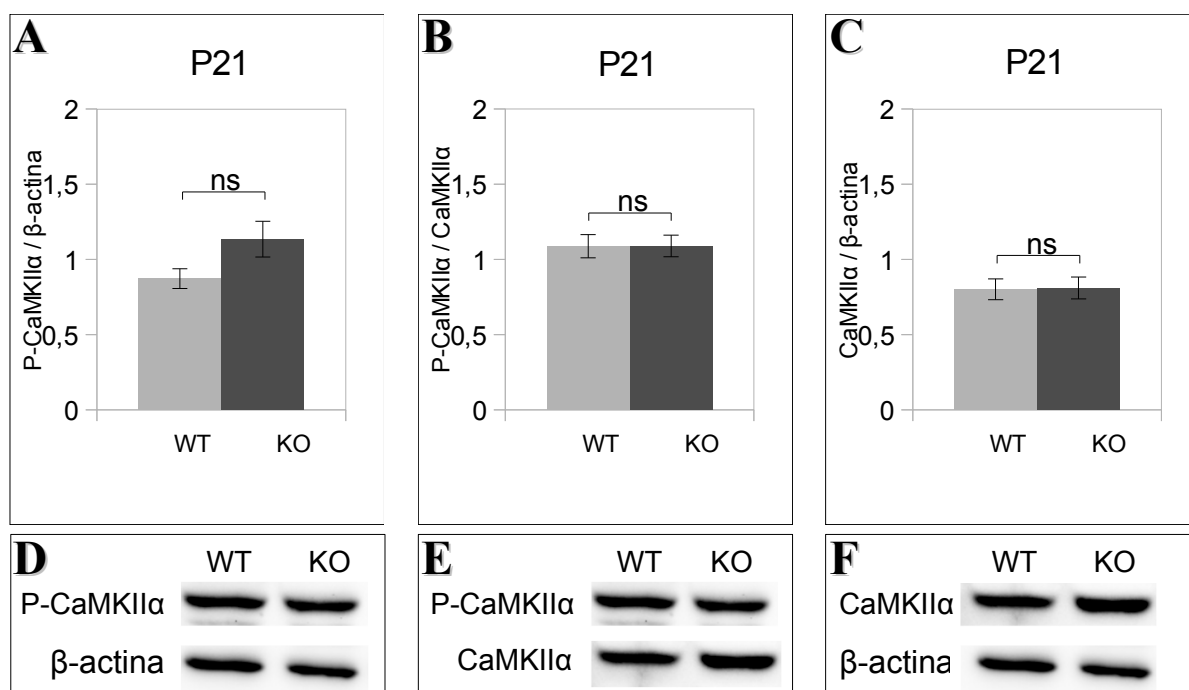


Figura 28. Análisis densitométrico (A, B, C) y niveles de expresión (D, E, F) de la quinasa II alfa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina y de su forma fosforilada en cerebros de postnatales P21 WT y P21 *Fmr1*-KO. A, B, C: Representa la media \pm SEM de 9 ejemplares WT y 9 ejemplares *Fmr1*-KO. A, C: Análisis densitométrico para p-CaMKII α y CaMKII α normalizado por β -actina. B: Análisis de p-CaMKII α respecto a CaMKII α , dato que nos ofrece información sobre la actividad de esta quinasa. D, E, F: Niveles de expresión obtenidos por Western Blot para una de las parejas (WT y *Fmr1*-KO) de las 9 utilizadas para el estudio densitométrico representado gráficamente en la parte superior. En este estadio se no obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los casos. * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001.

En los resultados obtenidos mediante la técnica Western Blot no se observaron diferencias en ninguna de las proteínas analizadas (Fig. 28D, E, F). Tras realizar los análisis densitométricos y estadísticos oportunos no se encontró ninguna diferencia ni en la cantidad de proteína total CaMKII α (Fig. 28C), ni en la fosforilada p-CaMKII α (Fig. 28A), ni en su actividad representada mediante p-CaMKII α /CaMKII α (Fig. 28B).

Una vez realizado el estudio de Western Blot para esta quinasa en el desarrollo postnatal se realizó un estudio similar para ratones machos adultos de 3 meses de edad utilizando 6 ejemplares de ambos genotipos, con la finalidad de analizar si estas diferencias entre genotipos observados en P7 y P14 tienen lugar sólo en determinados períodos postnatales o, si por el contrario, esas u otras diferencias entre ratones WT y *Fmr1*-KO se encuentran en ejemplares adultos.

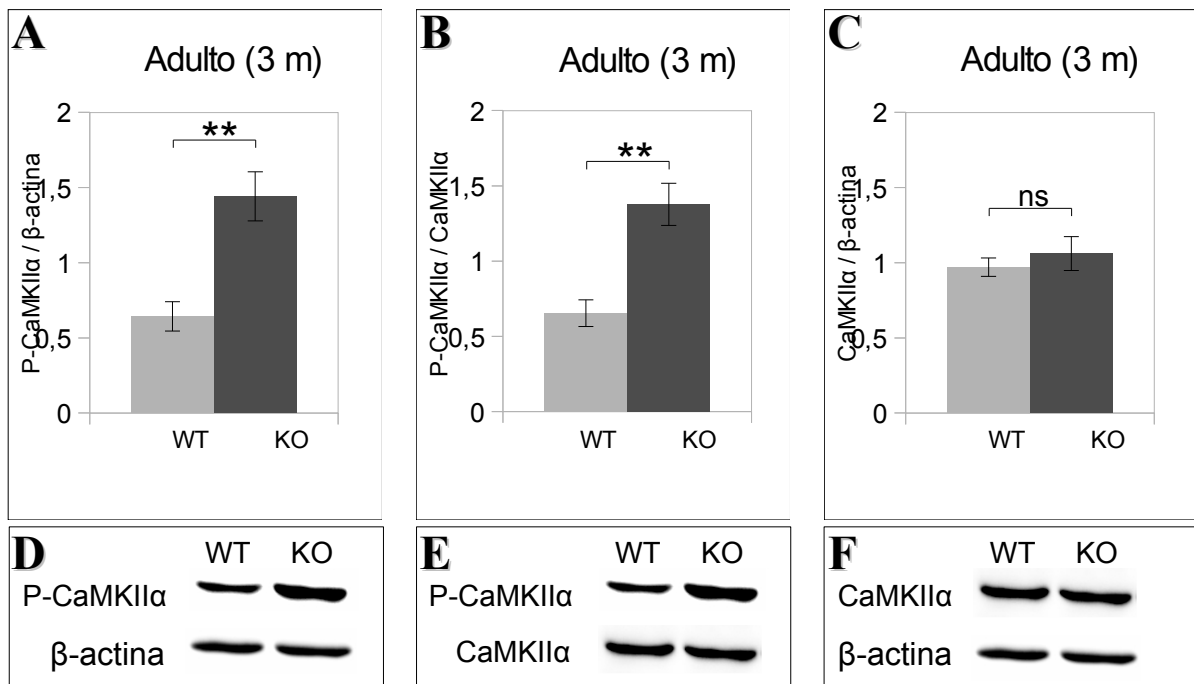


Figura 29. Análisis densitométrico (A, B, C) y niveles de expresión (D, E, F) de la quinasa II alfa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina y de su forma fosforilada en cerebros de ratones machos adultos de 3 meses de edad WT y *Fmr1*-KO. A, B, C: Representa la media \pm SEM de 6 ratones WT y 6 ratones *Fmr1*-KO. A, C: Análisis densitométrico para p-CaMKII α y CaMKII α normalizado por β -actina. B: Análisis de p-CaMKII α respecto a CaMKII α , dato que nos ofrece información sobre la actividad de esta quinasa. D, E, F: Niveles de expresión obtenidos por Western Blot para una de las parejas (WT y *Fmr1*-KO) de las 6 utilizadas para el estudio densitométrico representado gráficamente en la parte superior. En este estadio se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de proteína p-CaMKII α y en su actividad (p-CaMKII α /CaMKII α) y ninguna diferencia en la quinasa total. * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001.

Al igual que en el caso de los postnatales se realizaron Western Blots para CaMKII α y p-CaMKII α en adultos de 3 meses y se observaron diferencias semejantes en la cantidad de proteína fosforilada p-CaMKII α a las observadas en los ejemplares P7 y P14 y ninguna diferencia para CaMKII α (Fig. 29D, E, F).

Una vez analizados los datos y obtenidos los resultados de la prueba t de Student para dos muestras independiente, se observó una diferencia significativa entre los ratones WT y *Fmr1*-KO en la cantidad de p-CaMKII α (Fig 29A) y en su actividad (p-CaMKII α /CaMKII α) (Fig. 29B), siendo estos valores mayores en el caso de los ratones *Fmr1*-KO ($p < 0.01$). Como ocurría en P7 y P14, en adultos de 3 meses de vida tampoco encontramos diferencias significativas en la cantidad de quinasa total (Fig. 29C).

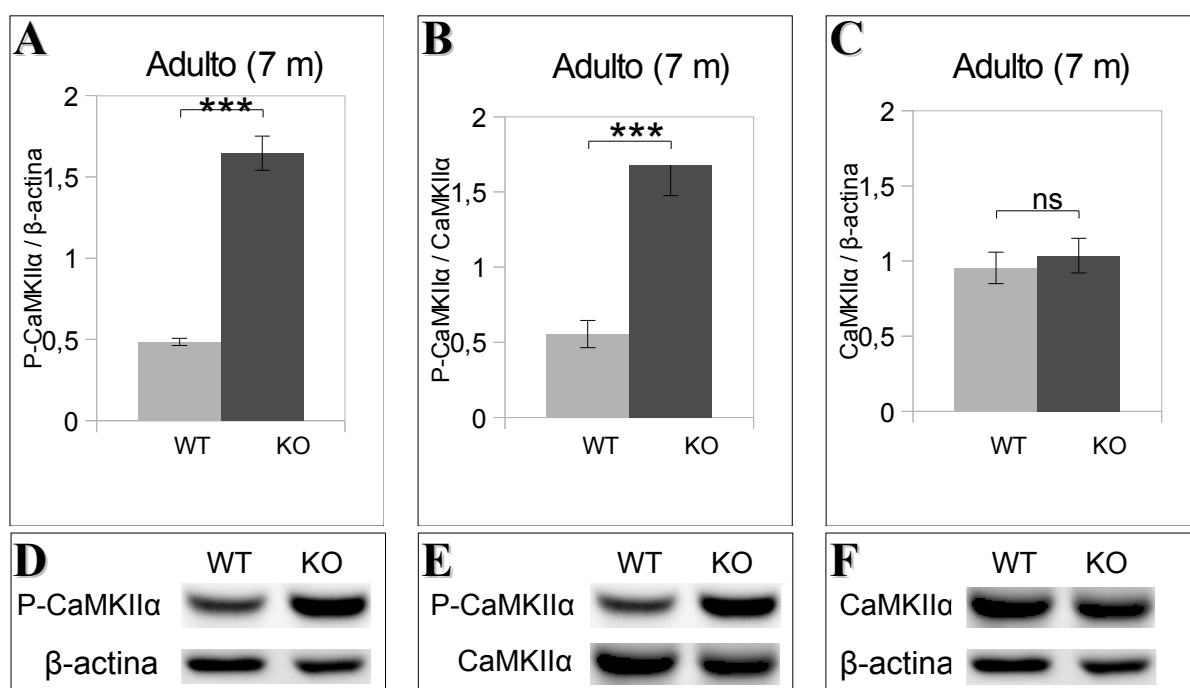


Figura 30. Análisis densitométrico (A, B, C) y niveles de expresión (D, E, F) de la quinasa II alfa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina y de su forma fosforilada en cerebros de ratones machos adultos de 7 meses de edad WT y *Fmr1*-KO. A, B, C: Representa la media \pm SEM de 6 ratones WT y 6 ratones *Fmr1*-KO. A, C: Análisis densitométrico para p-CaMKII α y CaMKII α normalizado por β -actina. B: Análisis de p-CaMKII α respecto a CaMKII α , dato que nos ofrece información sobre la actividad de esta quinasa. D, E, F: Niveles de expresión obtenidos por Western Blot para una de las parejas (WT y *Fmr1*-KO) de las 6 utilizadas para el estudio densitométrico representado gráficamente en la parte superior. En este estadio se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de proteína p-CaMKII α y en su actividad (p-CaMKII α /CaMKII α) y ninguna diferencia en la quinasa total. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Para finalizar el estudio de esta quinasa empleando la técnica de Western Blot se utilizaron 6 ratones machos WT y 6 ratones machos *Fmr1*-KO de 7 meses de edad con la intención de ver si las diferencias entre genotipos observadas en ratones de 3 meses permanecen presentes a mayor edad. Los resultados fueron similares, observándose diferencias en la cantidad de p-CaMKII α (Fig. 30A, D) y en su actividad (Fig. 30B, E) y no encontrándose diferencias en la proteína total (Fig. 30C, F). Los datos obtenidos no solo fueron similares sino que las diferencias encontradas entre los ratones WT y *Fmr1*-KO fueron más significativas que en el caso de los ratones adultos más jóvenes ($p < 0,001$).

En resumen, en el estudio comparativo realizado durante el desarrollo postnatal mediante la técnica Western Blot entre ratones WT y ratones *Fmr1*-KO para CaMKII α hemos observado diferencias en la cantidad de proteína fosforilada p-CaMKII α desde postnatales de 7 días, edad a la cual se observa p-CaMKII α por primera vez, hasta adultos de 7 meses de edad a excepción de los postnatales de 21 días donde no hemos encontrado diferencias en esta proteína. En relación a la cantidad total de CaMKII α no hemos observado diferencias en ninguno de los estadios estudiados desde postnatales de 4 días, edad donde hemos comenzado a observar expresión por primera vez para esta quinasa, hasta adulto de 7 meses.

3.4 Inmunohistoquímica para CaMKII α y p-CaMKII α

El estudio inmunohistoquímico para CaMKII α y p-CaMKII α en el cerebro anterior de ratones WT y ratones *Fmr1*-KO se centró en el complejo amigdalino, en el hipocampo y en el tálamo dorsal como en todos los estudios inmunohistoquímicos realizados con anterioridad. Se analizó la proteína CaMKII α y p-CaMKII α con el fin de observar posibles diferencias entre ambos genotipos que reflejaran los valores tan significativos obtenidos mediante Western Blot.

3.4.1 Inmunorreactividad para CaMKII α en el cerebro anterior de ratones *Fmr1-KO* en comparación a ratones *WT*

Nuestros estudios inmunohistoquímicos para CaMKII α mostraron un patrón de inmunotinción similar en ambos genotipos en todo el cerebro anterior (Fig. 31, Fig. 32). Se observó inmunorreactividad en todos los núcleos que conforman el complejo amigdalino, en todas las capas que forman parte del hipocampo y en todos los núcleos del tálamo dorsal. La inmunotinción se localizó a nivel del soma y del neuropilo.

En el complejo amigdalino se observaron más células CaMKII α -IR en los núcleos lateral, basolateral y central en relación a la parte medial (Fig. 31A, C). Este hecho se observó tanto en ratones *WT* como en *Fmr1-KO* (Fig. 31A, B, C, D).

A nivel del hipocampo observamos inmunorreactividad en todas las regiones y las capas que lo conforman (Fig. 31E), siendo ésta similar en ambos genotipos (Fig. 31E, F).

El tálamo dorsal presentó una inmunorreactividad para CaMKII α prácticamente homogénea en todos sus núcleos, tanto a nivel celular como a nivel del neuropilo (Fig. 32A, C, D), siendo este patrón de distribución similar en ratones *WT* y *Fmr1-KO* (Fig. 32).

Del estudio inmunohistoquímico realizado para esta proteína se ilustramos de forma detallada la expresión encontrada a nivel del hipocampo y de la amígdala como estructuras esenciales pertenecientes al sistema límbico dentro del telencéfalo y la expresión a nivel del tálamo dorsal como uno de los principales componentes del diencefalo, a pesar de presentar sólo la expresión de esta proteína en estas regiones se ha analizado todo el cerebro anterior no encontrándose diferencias cualitativas en todo el prosencéfalo.

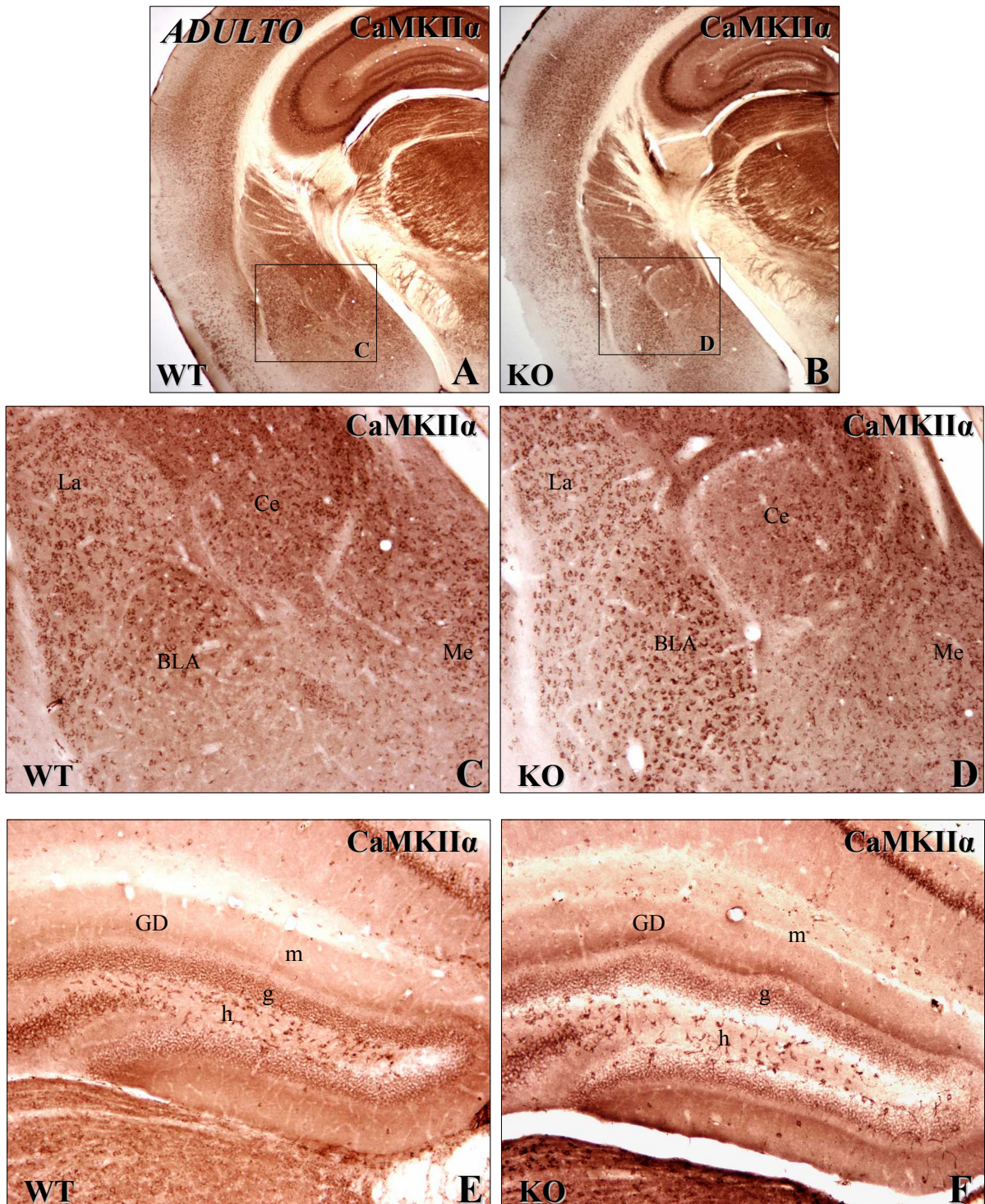


Figura 31. Secciones transversales del telencéfalo de ratones machos adultos. Se observa inmunorreactividad para la quinasa II alfa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMKII α) en el hipocampo y la amígdala de ratones WT a la derecha y de ratones *Fmr1*-KO a la izquierda. Se observan cuerpos celulares con inmunorreactividad para esta quinasa en todo complejo amigdalino (C, D). En el hipocampo se observan células positivas principalmente en el hilio (E, F). La distribución de la inmunorreactividad para CaMKII α es similar en ambos genotipos. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, B = 25x; C, D, E, F = 100x.

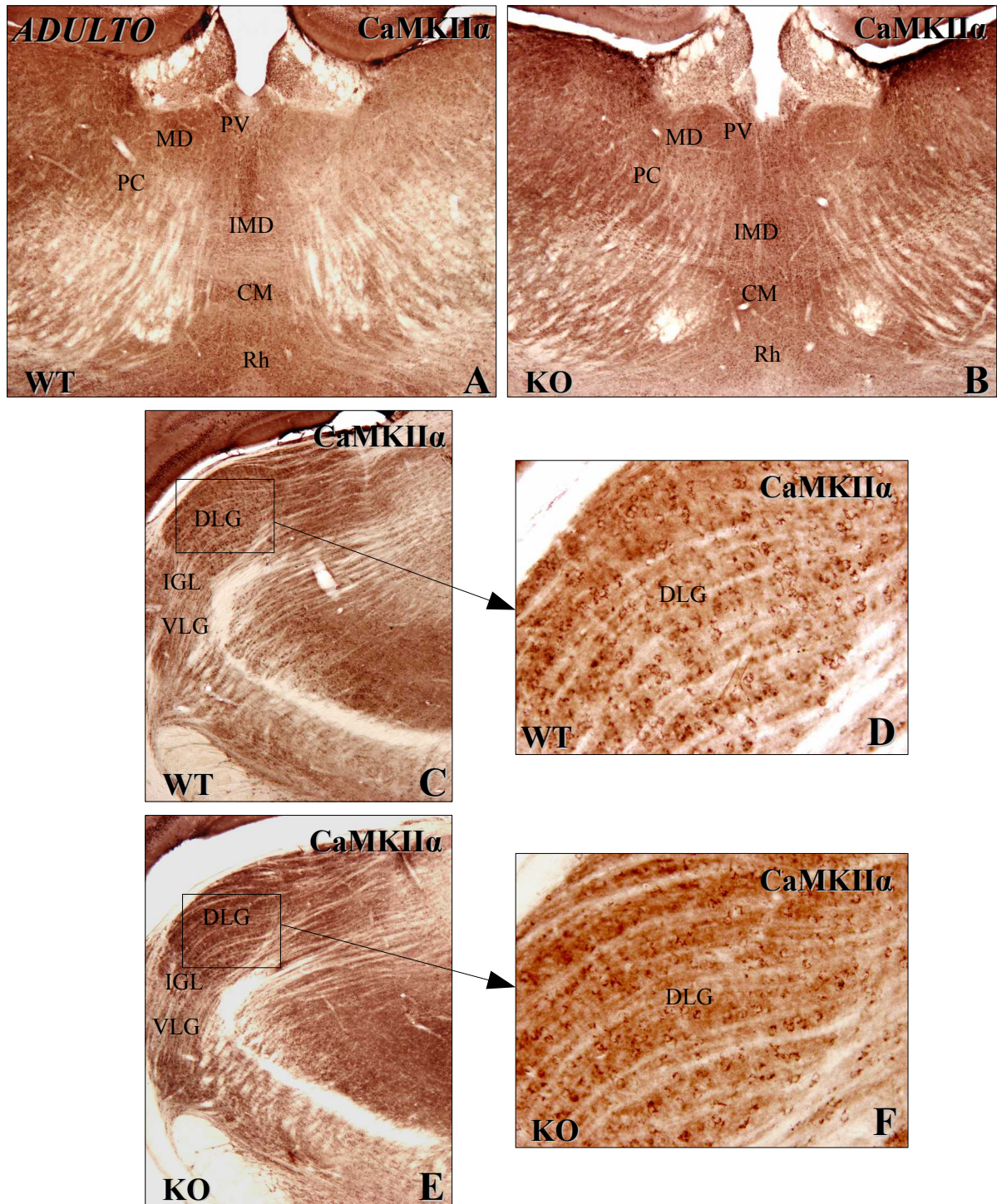


Figura 32. Cortes transversales de ratones machos adultos a nivel del diencéfalo. Se observa algunos de los núcleos que conforman en tálamo dorsal. Se aprecia inmunorreactividad para la quinasa II α dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKII α) en todo el diencéfalo. A, B: Núcleos del tálamo anterior de ratones WT (izquierda) y *Fmr1*-KO (derecha). C, E: Parte posterior de tálamo dorsal de ratones WT y *Fmr1*-KO. D, F: Microfotografías a mayores aumentos del núcleo geniculado dorsolateral del tálamo, donde se observa esta quinasa en la periferia del soma neuronal. No se observan diferencias en la inmunorreactividad para CaMKII α entre los dos genotipos estudiados. IMD, núcleo intermediodorsal; CM, núcleo centromedial; MD, núcleo dorsomedial; PC, núcleo paracentral; PV, núcleo paraventricular; Rh, núcleo romboidal; DLG, núcleo geniculado dorsolateral; IGL, intergeniculado; VLG, núcleo geniculado ventrolateral. Aumentos: A, B, C, E = 50x; D, F = 200x.

3.4.2 Inmunorreactividad para p-CaMKII α en el cerebro anterior de ratones P14, P21 y adultos *Fmr1-KO* en comparación con ratones *WT*

Tras obtener los resultados del estudio de Western Blot para p-CaMKII α se realizaron estudios inmunohistoquímicos en algunos estadios postnatales y en adultos con la intención de comparar la expresión de p-CaMKII α entre ratones *WT* y ratones *Fmr1-KO* mediante la técnica inmunohistoquímica.

En P14 fueron analizados 3 ejemplares *WT* y 3 ejemplares *Fmr1-KO*. Se observaron células inmunorreactivas en todos los núcleos del complejo amigdalino, en todas las capas del hipocampo y en todos los núcleos del tálamo dorsal, no observándose diferencias en cuanto al patrón de distribución entre los ejemplares *WT* y los *Fmr1-KO* (Fig. 33; Fig. 34).

En el complejo amigdalino se observó una gran cantidad de células p-CaMKII α -IR distribuidas por toda la amígdala (Fig. 33A, B, C). En el núcleo central se observó una fuerte inmunotinción en el soma neuronal que contrasta con la observada en el núcleo basolateral (Fig. 33C). La inmunorreactividad para estos ejemplares *WT* fue similar a la observada en los ejemplares *Fmr1-KO* (Fig. 33A-F).

En el hipocampo la inmunotinción para p-CaMKII α estuvo presente en todos los tipos celulares (Fig. 33G), siendo el mismo patrón en el caso de los ratones *Fmr1-KO* (33G, H).

En el tálamo dorsal también se observaron células inmunorreactivas en todos los núcleos que lo conforman (Fig. 34A, B, E). Se observó mayor inmunorreactividad en el soma de las células del núcleo paraventricular (Fig. 34B). En la parte posterior del tálamo se observó mayor inmunorreactividad en el núcleo intergeniculado y en el núcleo geniculado ventrolateral en comparación con el núcleo geniculado dorsolateral (Fig. 34E). La inmunorreactividad en los ejemplares *WT* fue similar a la observada en el tálamo dorsal de los ejemplares *Fmr1-KO* (Fig. 34A-F).

También se realizaron estudios inmunohistoquímicos en P21 con el fin de evaluar el patrón de distribución entre ambos genotipos. Se emplearon 3 ejemplares WT y 3 *Fmr1*-KO. En las tres regiones analizadas, el complejo amigdalino, el hipocampo y el tálamo dorsal se observó una inmunorreactividad semejante a la encontrada en los P14 (Fig. 35A, B, E; Fig. 36A, C, E) y no se encontraron diferencias entre los ejemplares WT y los *Fmr1*-KO (Fig. 35; Fig. 36).

Para terminar el estudio inmunohistoquímico de la p-CaMKII α se realizaron experimentos con ratones machos adultos WT y *Fmr1*-KO con edades comprendidas entre 3 y 7 meses y en ninguno de los casos se encontraron diferencias entre ambos genotipos en las regiones analizadas (amígdala, hipocampo y tálamo dorsal; Fig. 37; Fig. 38).

Los resultados para p-CaMKII α realizados en adultos fueron semejantes a los observados en postnatales.

En el complejo amigdalino se observó una mayor inmunorreactividad en el núcleo central (Fig. 37A-C), en el hipocampo se observó inmunorreactividad en los distintos tipos celulares que lo forman (Fig. 37G) y en el tálamo dorsal se observaron las células más inmunorreactivas en el núcleo paraventricular (Fig. 38A, B). No se encontraron diferencias entre los ratones WT y los ratones *Fmr1*-KO (Fig. 37; Fig. 38).

La expresión de p-CaMKII α fue analizada en todo el cerebro anterior de los ejemplares estudiados, no observándose diferencias entre genotipos en ninguna de las regiones que lo conforman.

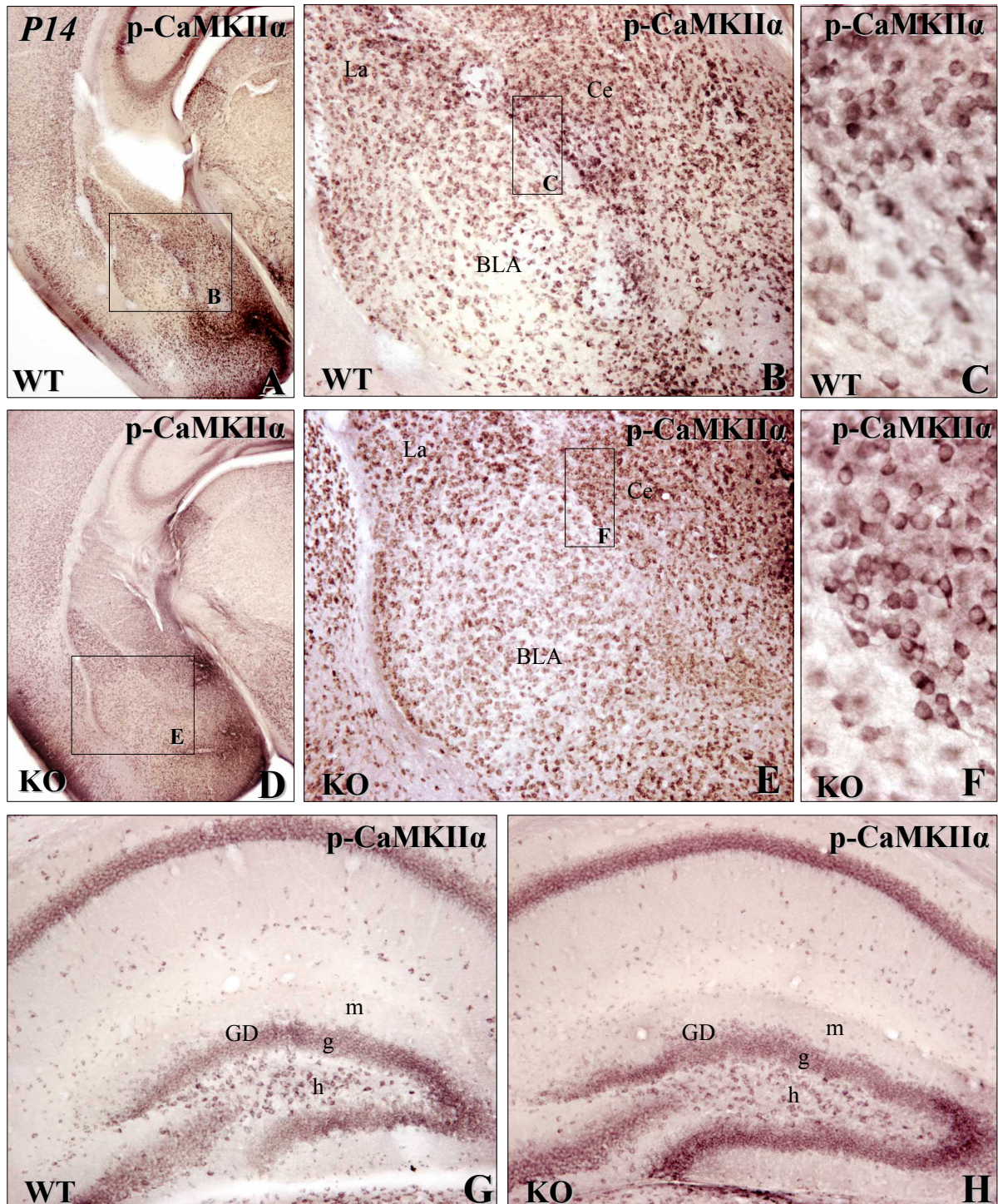


Figura 33. Secciones coronales del telencéfalo de ratones posnatales de 14 días (P14) a nivel de la amígdala (A, B, C, D, E, F) y del hipocampo (G, H). Se observan células pCaMKII α -inmunorreactivas (pCaMKII α -IR) en el giro dentado y en los núcleos de la amígdala de ratones WT (A, B, C, G) y de ratones *Fmr1*-KO (D, E, F, H). El patrón de inmunoreactividad observado en el telencéfalo de los ejemplares P14 no difiere entre el genotipo WT y *Fmr1*-KO. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central. A, D = 25x; B, E, G, H = 100x; C, F = 400x.

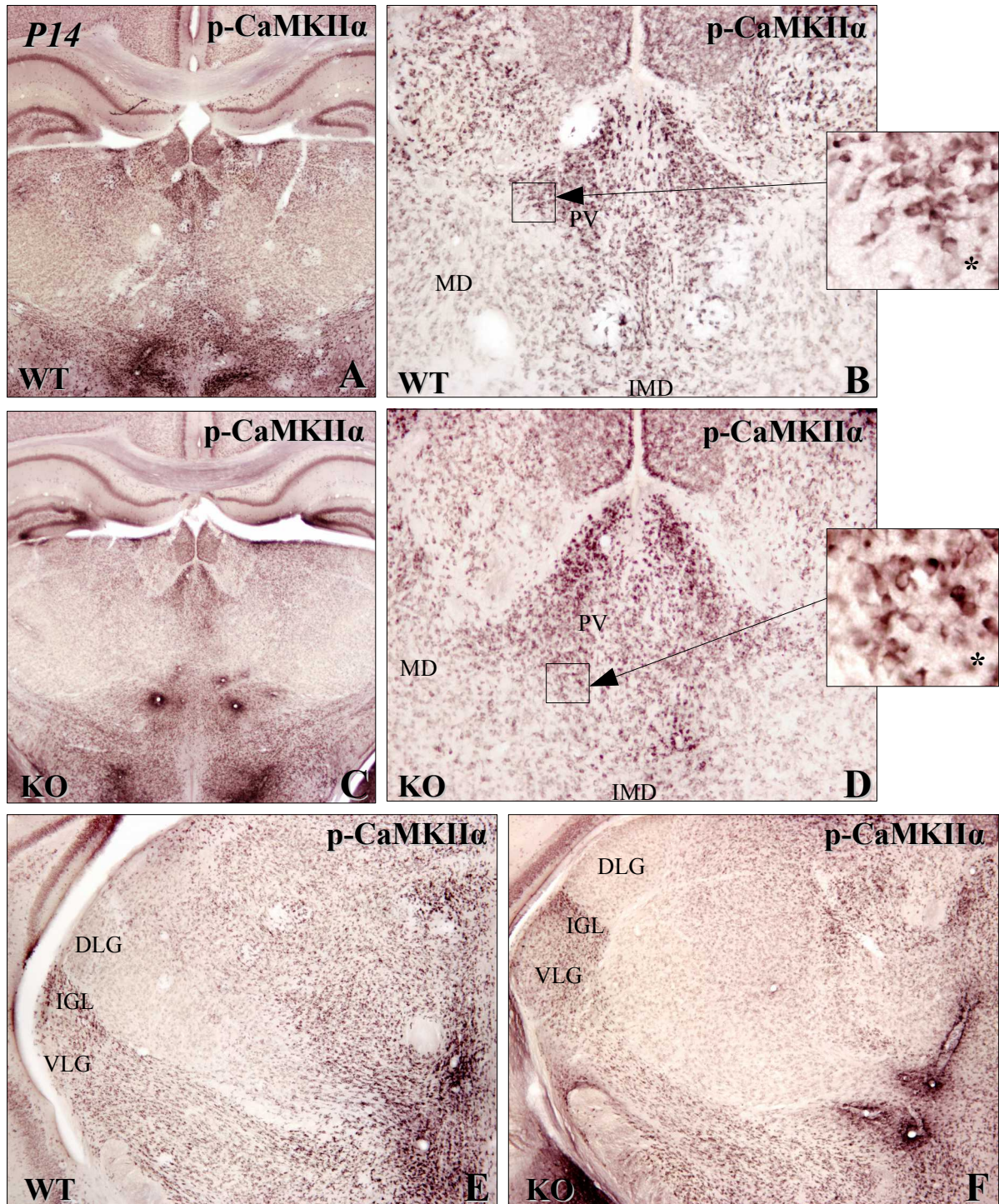


Figura 34. Imágenes de cortes transversales del tálamo dorsal de ratones posnatales de 14 días (P14). Se observa inmunorreactividad para la quinasa II alfa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina fosforilada (p-CaMKII α) en el diencéfalo de estos ejemplares, observándose células inmunorreactivas para p-CaMKII α en ratones P14 WT en las microfotografías A, B y E y en P14 *Fmr1*-KO en las microfotografías C, D y F. No se aprecian diferencias en la distribución de la inmunorreactividad para p-CaMKII α entre genotipos para P14. IMD, núcleo intermediodorsal; MD, núcleo dorsomedial; PV, núcleo paraventricular; DLG, núcleo geniculado dorsolateral; IGL, intergeniculado; VLG, núcleo geniculado ventrolateral. Aumentos: A, C = 25x; B, D = 100x; E, F = 50x; * = 200x.

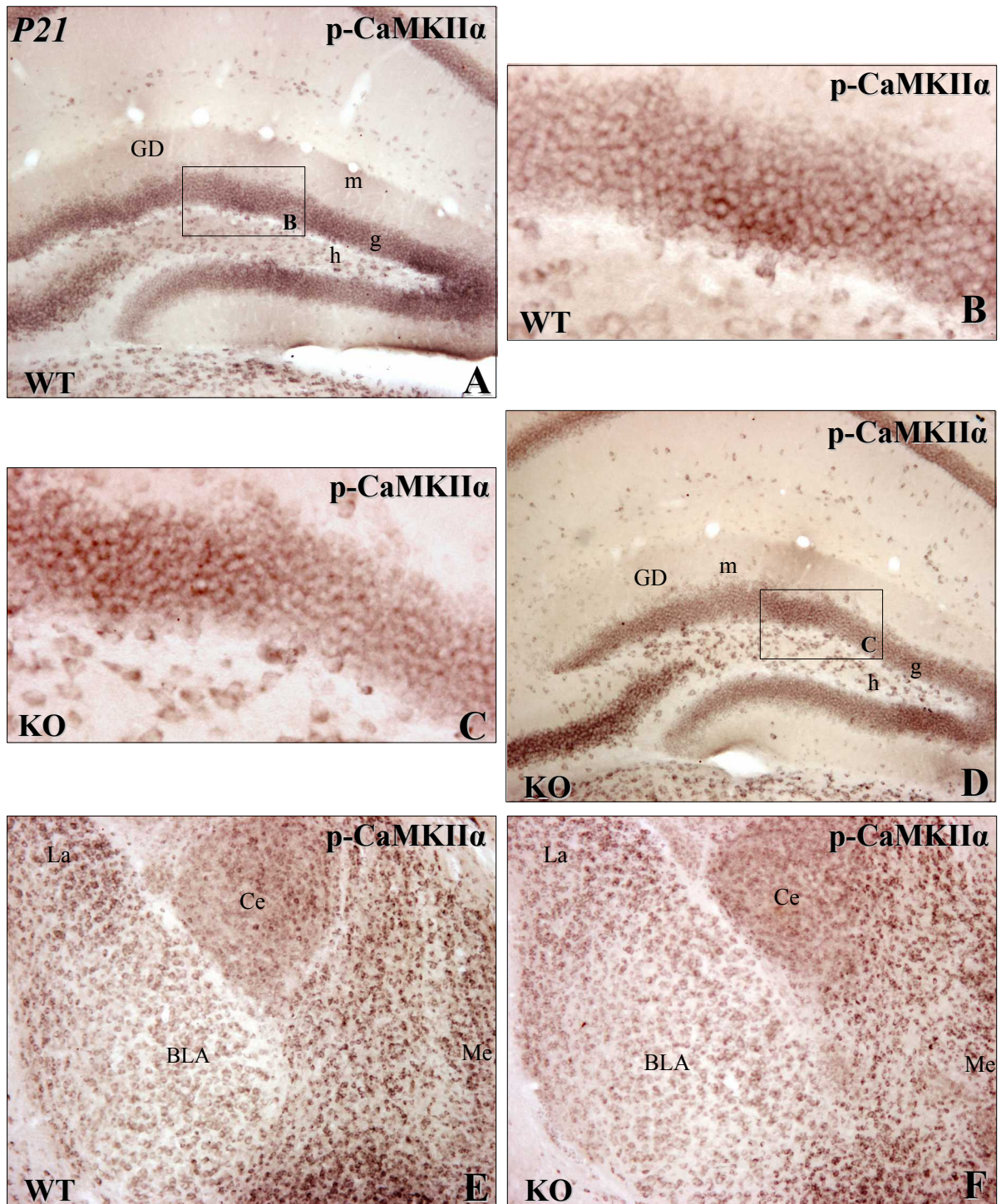


Figura 35. Microfotografía de cortes coronales de ratones posnatales de 21 días (P21) a nivel del hipocampo (A, B, C, D) y del complejo amigdalino (E, F). Se observan células pCaMKIIα inmunorreactivas (pCaMKIIα-IR) en el giro dentado de ratones WT en las imágenes A y B y en los núcleos de la amígdala en la imagen E. También se aprecian células pCaMKIIα-IR en el giro dentado de ratones *Fmr1*-KO en las imágenes C y D y en la amígdala de ratones *Fmr1*-KO en la imagen F. El patrón de inmunorreactividad observado en el telencéfalo de los ejemplares P21 es similar en ambos genotipos. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, D, E, F = 100x; B, C = 400x.

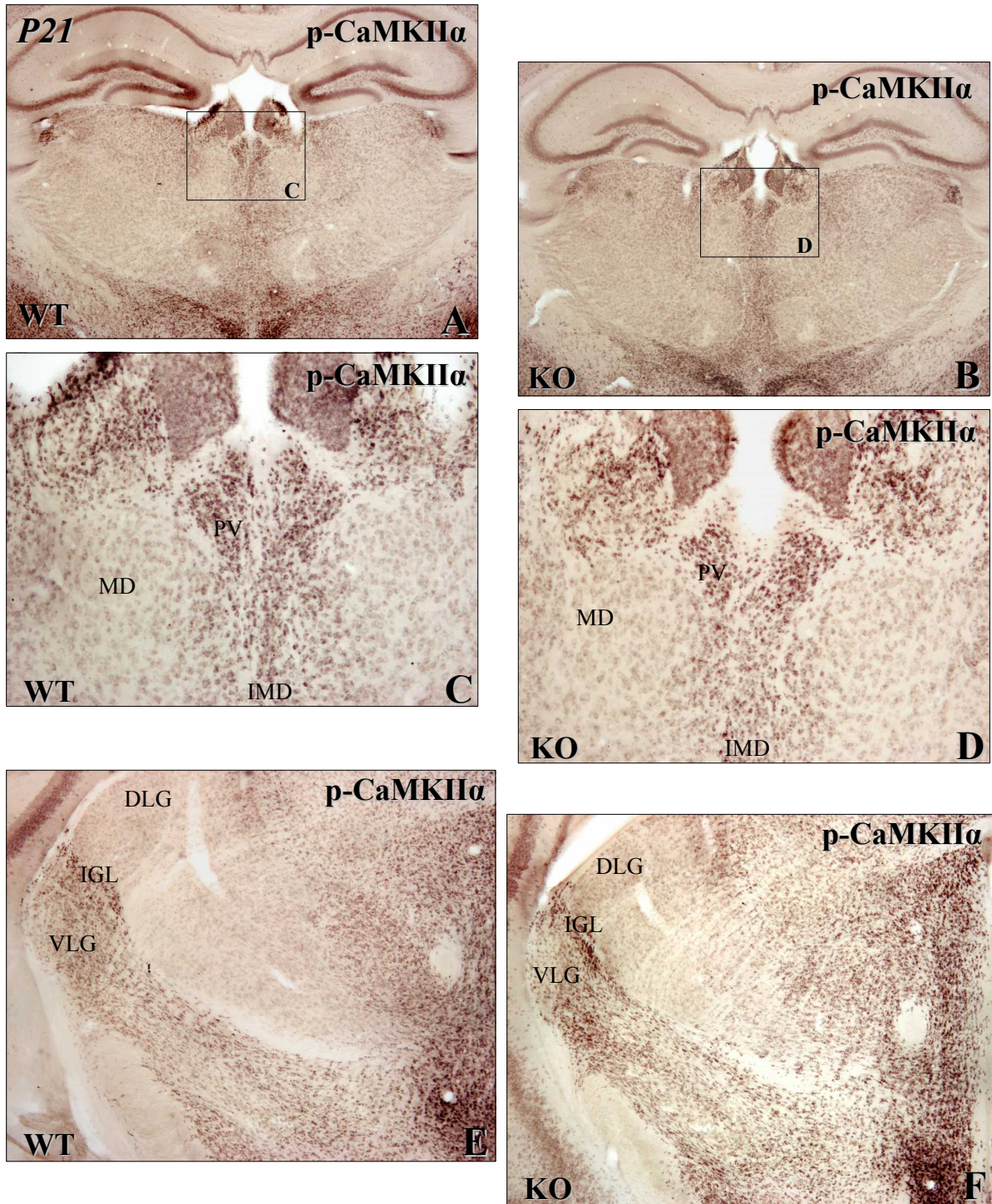


Figura 36. Secciones transversales del diencefalo de ratones posnatales de 21 días (P21). Se observa células inmunorreactivas para p-CaMKII α en P21 WT a la izquierda y en P21 *Fmr1*-KO a la derecha en todos los núcleos del tálamo dorsal. No se observan diferencias en la distribución de la inmunorreactividad para p-CaMKII α entre ambos genotipos. IMD, núcleo intermediodorsal; MD, núcleo dorsomedial; PV, núcleo paraventricular; DLG, núcleo geniculado dorsolateral; IGL, intergeniculado; VLG, núcleo geniculado ventrolateral. Aumentos: A, B = 25x; C, D = 100x; E, F = 50x.

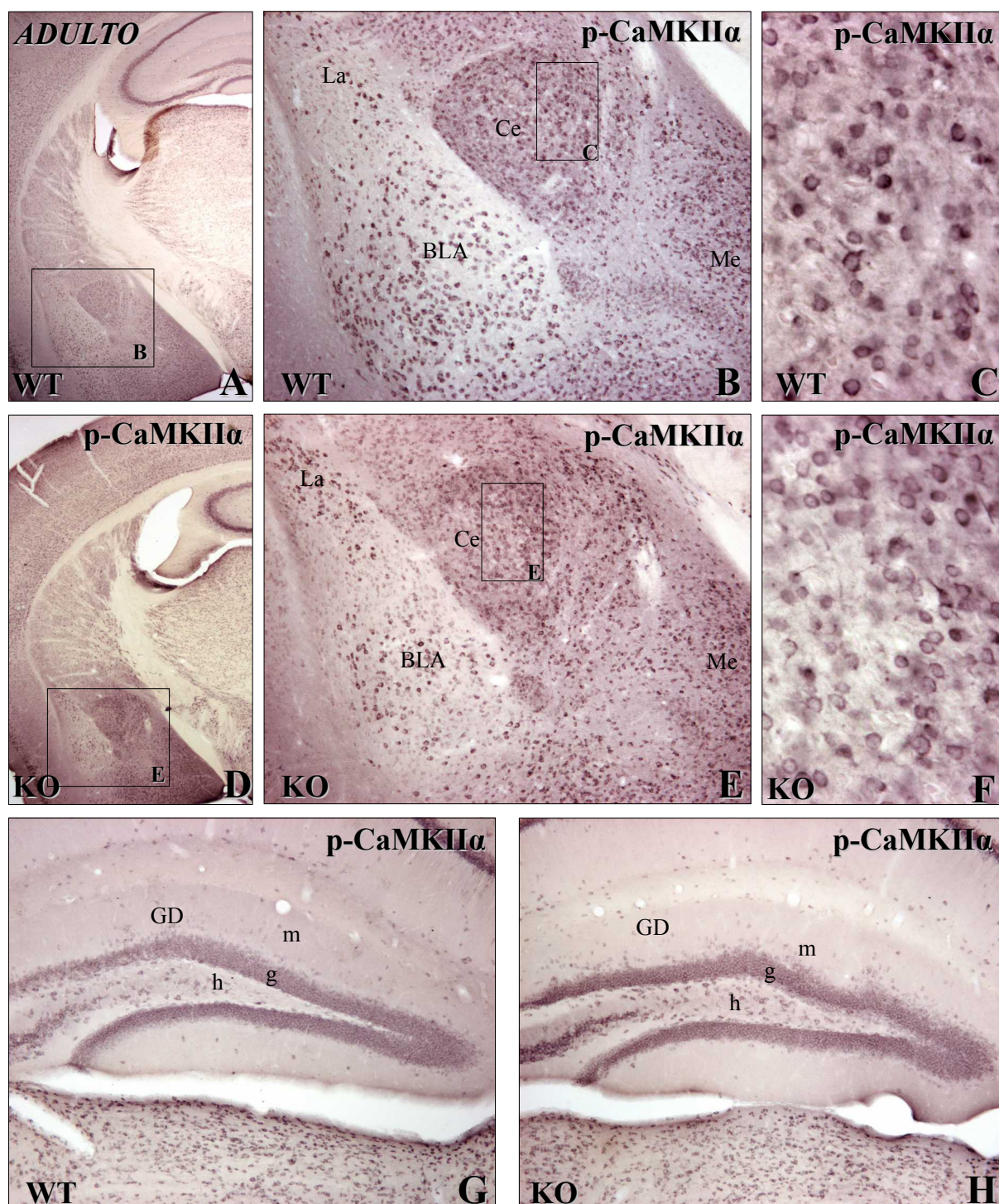


Figura 37. Cortes transversales del telencéfalo de ratones machos adultos a nivel del complejo amigdalino (A, B, C, D, E, F) y del hipocampo (G, H). Se observan células pCaMKII α inmunorreactivas en el giro dentado y en los núcleos de la amígdala de ratones WT y *Fmr1*-KO. C, F: Células positivas para esta quinasa en el núcleo central de la amígdala de ratones WT y *Fmr1*-KO respectivamente. El patrón de inmunorreactividad estudiado en el telencéfalo es similar para ambos genotipos. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, D = 25x; B, E, G, H = 100x; C, F = 400x.

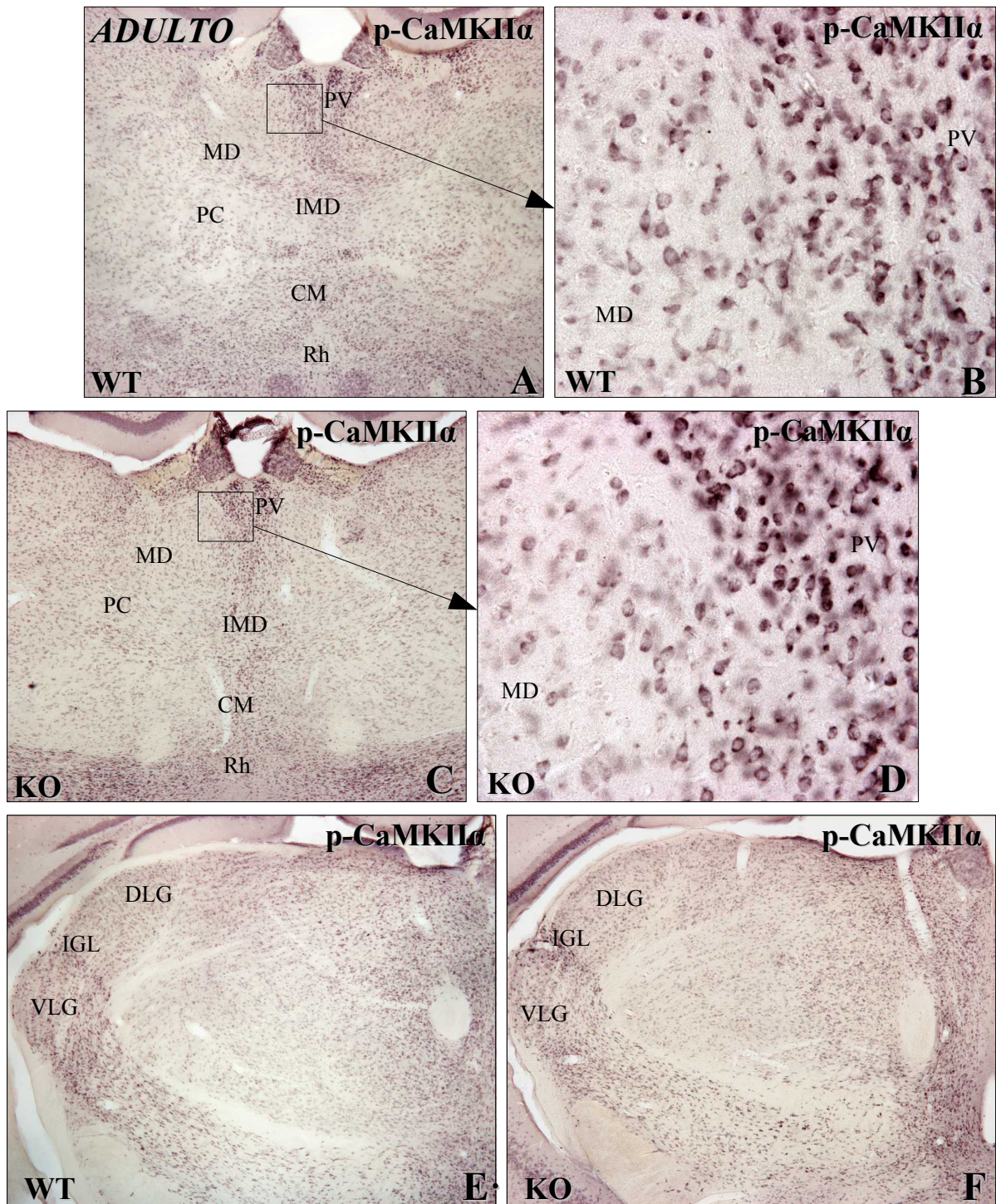


Figura 38. Microfotografías de secciones transversales del tálamo dorsal de ratones machos adultos. Se observa células inmunorreactivas para p-CaMKII α de ratones WT en las imágenes A, B y E y de ratones *Fmr1*-KO en las imágenes C, D y F en todos los núcleos del tálamo dorsal, no observándose diferencias en la distribución de la inmunorreactividad para la forma fosforilada de CaMKII α entre los dos genotipos estudiados. B, D: Imágenes a mayores aumentos de secciones de ratones WT y *Fmr1*-KO respectivamente, donde se aprecia la diferencia en la cantidad de esta quinasa, dentro del soma, entre dos núcleos distintos del tálamo dorsal. IMD, núcleo intermediodorsal; CM, núcleo centromedial; MD, núcleo dorsomedial; PC, núcleo paracentral; PV, núcleo paraventricular; Rh, núcleo romboidal; DLG, núcleo geniculado dorsolateral; IGL, intergeniculado; VLG, núcleo geniculado ventrolateral. Aumentos: A, C, E, F = 50x; B, D = 400x.

4. Estudio comparado de la proteína sinapsina 1 en ratones WT y ratones *Fmr1-KO*

Siguiendo con el estudio en el desarrollo postnatal hasta adulto a nivel presináptico hemos decidido analizar la sinapsina 1, una proteína clave en el terminal presináptico.

Sinapsina 1 es una proteína asociada a vesículas sinápticas y es el principal sustrato de CaMKII dentro del terminal presináptico (Greengard y cols., 1993). Este hecho unido a la existencia de numerosos estudios experimentales que afirman que CaMKII y sinapsina 1 están implicadas en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Llinás y cols., 1985; Nichols y cols., 1990; Llinás y cols., 1991), hace a sinapsina 1 una proteína clave en el estudio del desarrollo postnatal de los ratones *Fmr1-KO* a nivel presináptico.

Teniendo en cuenta las diferencias significativas observadas para p-CaMKII α durante el desarrollo postnatal y en adultos entre los ratones WT y los ratones *Fmr1-KO* hemos considerado clave el estudio comparativo de la sinapsina 1 también durante el desarrollo postnatal entre ambos genotipos.

4.1 Western Blots para sinapsina 1 en ratones WT durante el desarrollo

Para el Western Blot se empleó un anticuerpo frente a sinapsina 1 que reconocía a sus dos isoformas, la sinapsina 1a de 80 kDa y la sinapsina 1b de 77 kDa. Con este anticuerpo en determinadas ocasiones se apreciaba claramente una doble banda y en la mayoría de los casos una única banda resultado de la unión de las dos isoformas. Este mismo anticuerpo fue empleado con anterioridad en otros estudios en los que se utilizaban esta técnica observándose resultados similares (Fletcher y cols., 1991; Stone y cols., 1994).

Para el estudio de sinapsina 1 en el desarrollo postnatal de ratones WT se emplearon

desde ejemplares recién nacidos hasta adulto (P0, P7, P14, P21, adulto), usando 3 ejemplares por estadio. También se analizaron 4 embriones de 18,5 días (E18,5) para demostrar la presencia de sinapsina 1 en el estadio embrionario como quedaba reflejado en estudios anteriores (Fletcher y cols., 1991). Se utilizó la proteína β -actina como control de carga (Fig. 39).

Se observó expresión de sinapsina 1 en todos los estadios estudiados incluido los embriones analizados (Fig. 39).

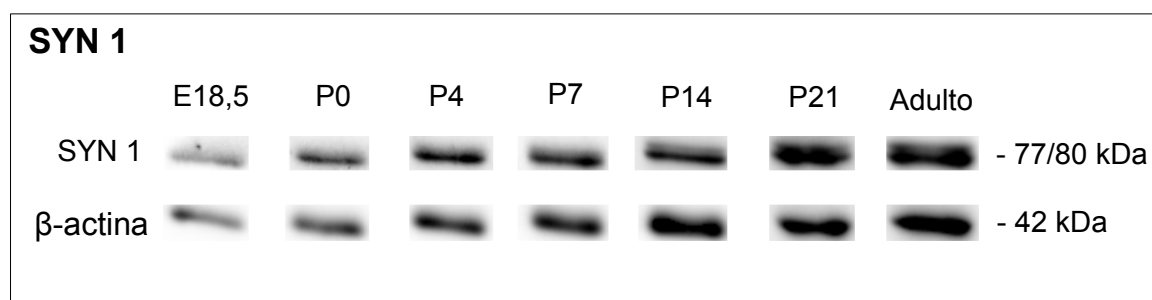


Figura 39. Niveles de expresión de la proteína sinapsina 1 en extractos de cerebro de ratones WT, desde recién nacidos (P0) hasta adulto de 7 meses. Western Blot utilizando anticuerpos frente a sinapsina 1. Se obtuvo una doble banda que pertenecían a sus dos isoformas, sinapsina 1a y sinapsina 1b, con un peso molecular de aproximadamente de 77 kDa y 80 kDa respectivamente. En la mayoría de los casos sólo aparecía una única banda. Se observó expresión para sinapsina 1 en todos los estadios incluido embriones. La proteína β -actina se utilizó como control de carga.

4.2 Western Blots para sinapsina 1 en ratones WT y ratones Fmr1-KO durante el desarrollo postnatal hasta adulto

En todos los estudios realizados de Western Blot para la sinapsina 1 se empleó el mismo anticuerpo que el apartado anterior (Tabla 3; Pag.46). Se ha estudiado la cantidad de sinapsina 1 en el cerebro anterior de ratones WT y *Fmr1*-KO a lo largo del desarrollo postnatal utilizando P0, P7, P14, P21 y adultos. En todos los estudios se empleó β -actina como proteína de carga.

El estudio comparativo entre los ejemplares postnatales WT y los ejemplares *Fmr1*-KO se realizó desde postnatales recién nacidos, puesto que observamos expresión para sinapsina 1 en todos los estadios postnatales. En cada estadio analizado se utilizaron 5

ejemplares WT y 5 ejemplares *Fmr1*-KO (Fig. 40F).

En P0 se observó una baja expresión de sinapsina 1 en ambos genotipos, no encontrándose diferencias en la cantidad de esta proteína entre los ratones WT y los ratones *Fmr1*-KO. Se realizó un estudio densitométrico para sinapsina 1 normalizado por β -actina para evaluar la cantidad de proteína presente (Fig. 40A). Una vez realizado el análisis densitométrico se empleó el análisis estadístico t de Student para dos muestras independientes y no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de sinapsina 1 en los ejemplares recién nacidos ($p > 0.05$) (Fig. 40A).

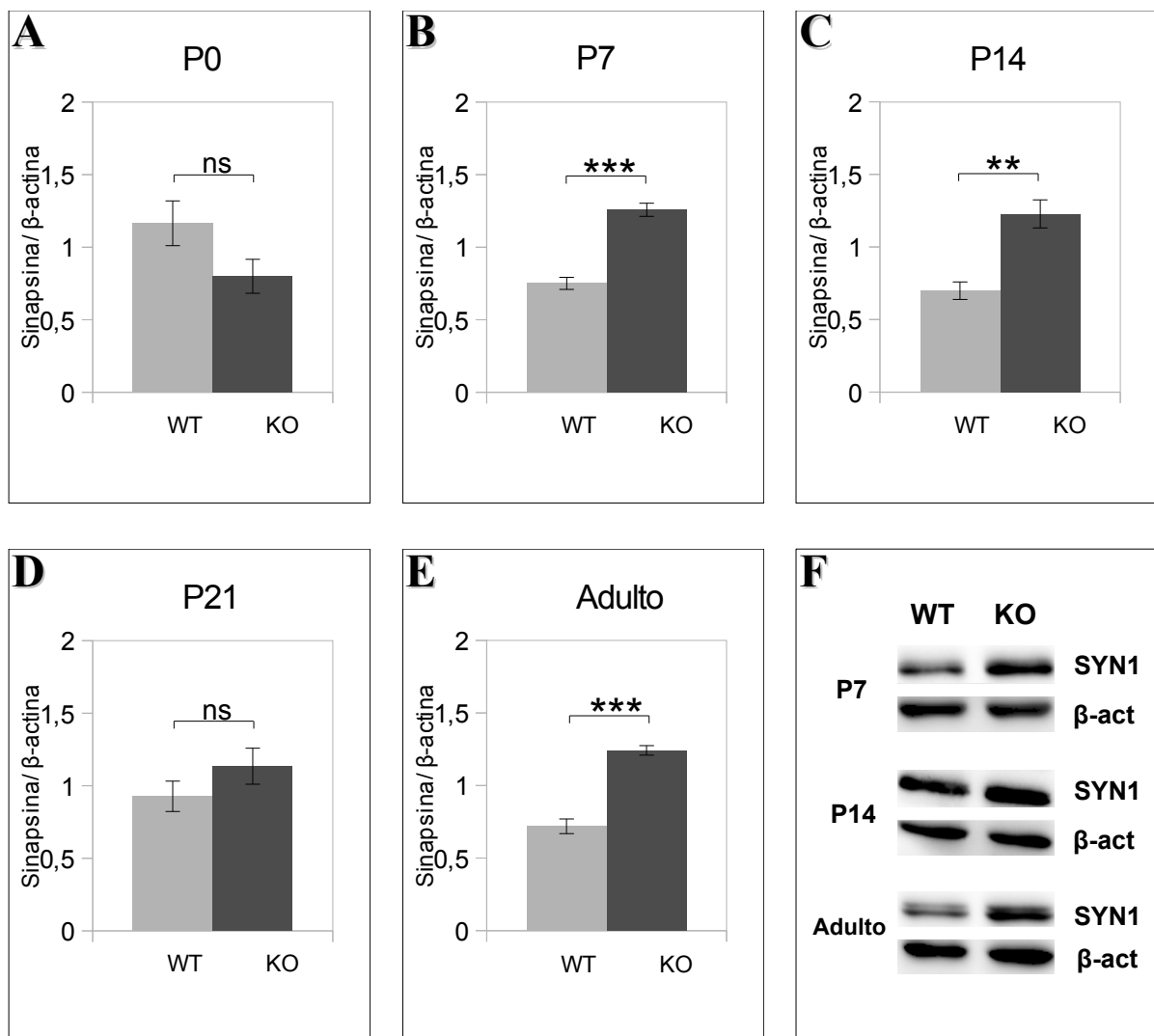


Figura 40. Análisis densitométrico (A, B, C, D, E) y niveles de expresión (F) de la sinapsina 1 (SYN1) en cerebros de ratones WT y *Fmr1*-KO a distintas edades desde posnatales recién nacidos (P0) hasta adultos de 7 meses. A, B, C, D, E: Representa la media de SYN1 \pm SEM para n = 5 en P0, P7, P14, P21 y adulto respectivamente. En todos los casos se normalizó utilizando β -actina. F: Niveles de expresión obtenidos por Western Blot para una de las parejas de P7, P14 y adulto utilizadas en el estudio densitométrico. Se realizó la prueba estadística t de Student para muestras independientes. Se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de proteína SYN1 en P7, P14 y adulto. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Es a partir de P7, como ocurría con la p-CaMKII α , cuando encontramos diferencias en la cantidad de sinapsina 1 entre ambos genotipos (Fig 40F). En este estadio se observó una alta expresión de sinapsina 1 en relación a la observada en recién nacidos. Se realizaron los mismos estudios que en los ejemplares P0 y tras realizar el análisis densitométrico seguido de la prueba estadística t de Student para dos muestras independientes se observaron diferencias significativas en sinapsina 1 entre los dos genotipos estudiados, observándose mayor cantidad de proteína en los ejemplares *Fmr1*-KO en relación los WT ($p < 0.001$) (Fig. 40B).

El siguiente estadio a analizar fueron los P14 y también encontramos diferencias entre los ratones WT y los *Fmr1*-KO (Fig. 40F). Una vez realizados los estudios estadísticos, estos nos indicaban diferencias significativas entre los dos genotipos, existiendo mayor cantidad de proteína en los ejemplares *Fmr1*-KO que en los WT ($p < 0.01$) (Fig. 40C).

En los P21 no había diferencias significativas entre los ratones WT y *Fmr1*-KO una vez realizada la prueba estadística t de Student para muestras independientes ($p > 0.05$) (Fig. 40D).

Para terminar el estudio mediante Western Blots para sinapsina 1 se realizaron los mismos análisis utilizando ejemplares adultos con una edad de entre 3 y 5 meses. Se observaron diferencias entre los ratones WT y los *Fmr1*-KO (Fig. 40F) y una vez finalizado el análisis densitométrico y el análisis estadístico t de Student para muestras independientes se obtuvieron diferencias significativas entre los genotipos, presentando mayor cantidad de sinapsina 1 los ratones *Fmr1*-KO en relación a los ratones WT ($p < 0.001$) (Fig. 40E).

En general los resultados para sinapsina 1 fueron similares a los obtenidos para p-CaMKII α , mayor cantidad de ambas proteínas en los ratones *Fmr1*-KO desde el estadio P7 hasta adulto. Sin embargo, en postnatales de 21 días no aparecían diferencias significativas ni para p-CaMKII α ni para sinapsina 1.

Este es el primer estudio que presenta diferencias en la cantidad de sinapsina 1 en

ratones *Fmr1*-KO frente a ratones WT y por tanto es el primer estudio que relaciona los desequilibrios en la cantidad de sinapsina 1 con el síndrome X-Frágil.

4.3 Inmunorreactividad para sinapsina 1 en el cerebro anterior de ratones *Fmr1*-KO en comparación a ratones WT

El estudio inmunohistoquímico para sinapsina 1 se realizó a nivel del complejo amigdalino, el hipocampo y el tálamo dorsal en ratones machos adultos *Fmr1*-KO y WT con el fin de encontrar de manera cualitativa alguna posible diferencia entre ambos genotipos. Para este estudio se emplearon 3 ratones de cada genotipo.

En el patrón de distribución para sinapsina 1 no se observaron diferencias entre los ratones WT y los *Fmr1*-KO en las distintas zonas analizadas (Fig. 41; Fig. 42).

La expresión de esta proteína tiene lugar a nivel del neuropilo, ya que es sabido que esta proteína se encuentra situada en el terminal presináptico junto a las vesículas sinápticas (Fletcher y cols., 1991). Por tanto no se observan somas inmunorreactivos en ninguna región del cerebro anterior.

Se observó inmunorreactividad para sinapsina 1 en todo el complejo amigdalino (Fig. 41A, B), presentando una inmunorreactividad prácticamente homogénea en todos los núcleos que conforman la amígdala. No se encontró ninguna diferencia entre los ratones WT y los ratones *Fmr1*-KO (Fig. 41A-D).

A nivel del hipocampo se observó inmunorreactividad para sinapsina 1 en toda la región exceptuando las capas formadas por los cuerpos celulares, por tanto no se observó inmunorreactividad ni en la capa piramidal de CA ni en la capa granular del giro dentado (Fig. 41E). El hilio del giro dentado es la región que presenta mayor inmunorreactividad para sinapsina 1, quedando restringida a las fibras musgosas y a las fibras de las interneuronas presentes dentro del hilio y en ningún momento a nivel del soma celular (Fig. 41E). No se observaron diferencias en el hipocampo entre ambos genotipos (Fig. 41E, F).

En el tálamo dorsal se observa inmunorreactividad para sinapsina 1 en todos los núcleos que lo componen (Fig. 42A, C). La inmunorreactividad observada es bastante homogénea entre los núcleos del tálamo dorsal, aunque se observó en la parte posterior una mayor inmunorreactividad a nivel del núcleo geniculado dorsolateral (Fig. 42C). Estos resultados fueron observados de forma similar en los ratones *Fmr1*-KO (Fig. 42A-D).

Como acabamos exponer, con la técnica inmunohistoquímica no hemos podido observar diferencias para sinapsina 1 entre ambos genotipos, mientras que con la técnica de Western Blot sí lo hemos observado y cuantificado. Es por tanto el estudio de Western Blot del hipocampo aislado para la sinapsina 1 de ratones *Fmr1*-KO uno de nuestros objetivos actuales, ya que es en el hipocampo donde se observan más cantidad de fibras inmunorreactivas para sinapsina 1.

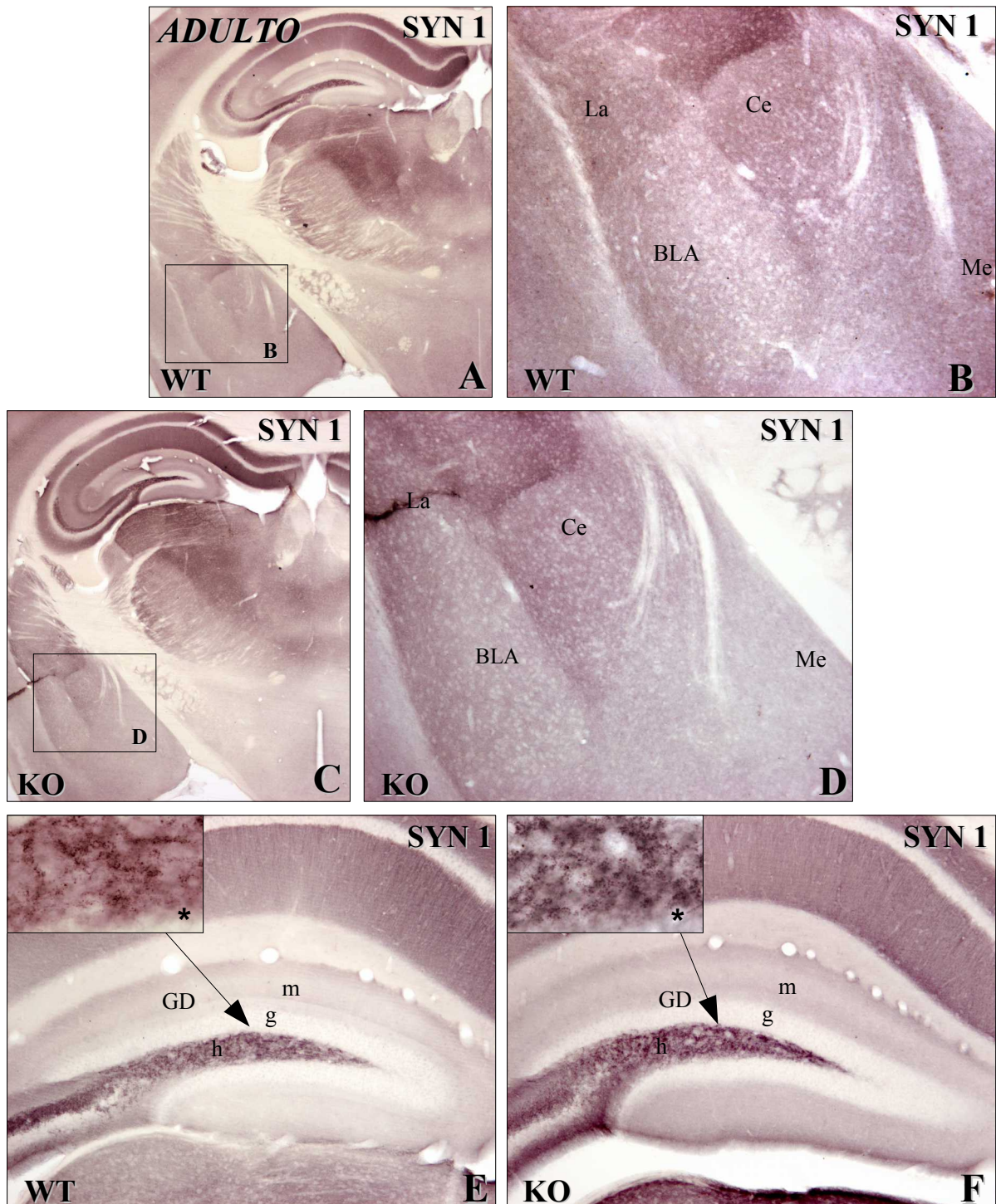


Figura 41. Secciones coronales del telencéfalo de ratones machos adultos. Se observa inmunorreactividad para la proteína sinapsina 1 (SYN1) en el neuropilo de ratones WT en las imágenes A, B y E y de ratones *Fmr1*-KO en las imágenes C, D y F. No se encuentra somas inmunorreactivos. Se observa la mayor expresión para SYN1 en el hilio del giro dentado, como se aprecia a mayor detalle (*) en la imagen E para el WT y en la imagen F para el *Fmr1*-KO. La distribución de SYN1 es similar en ambos genotipos. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, C = 25x; B, D, E, F = 100x; * = 400x.

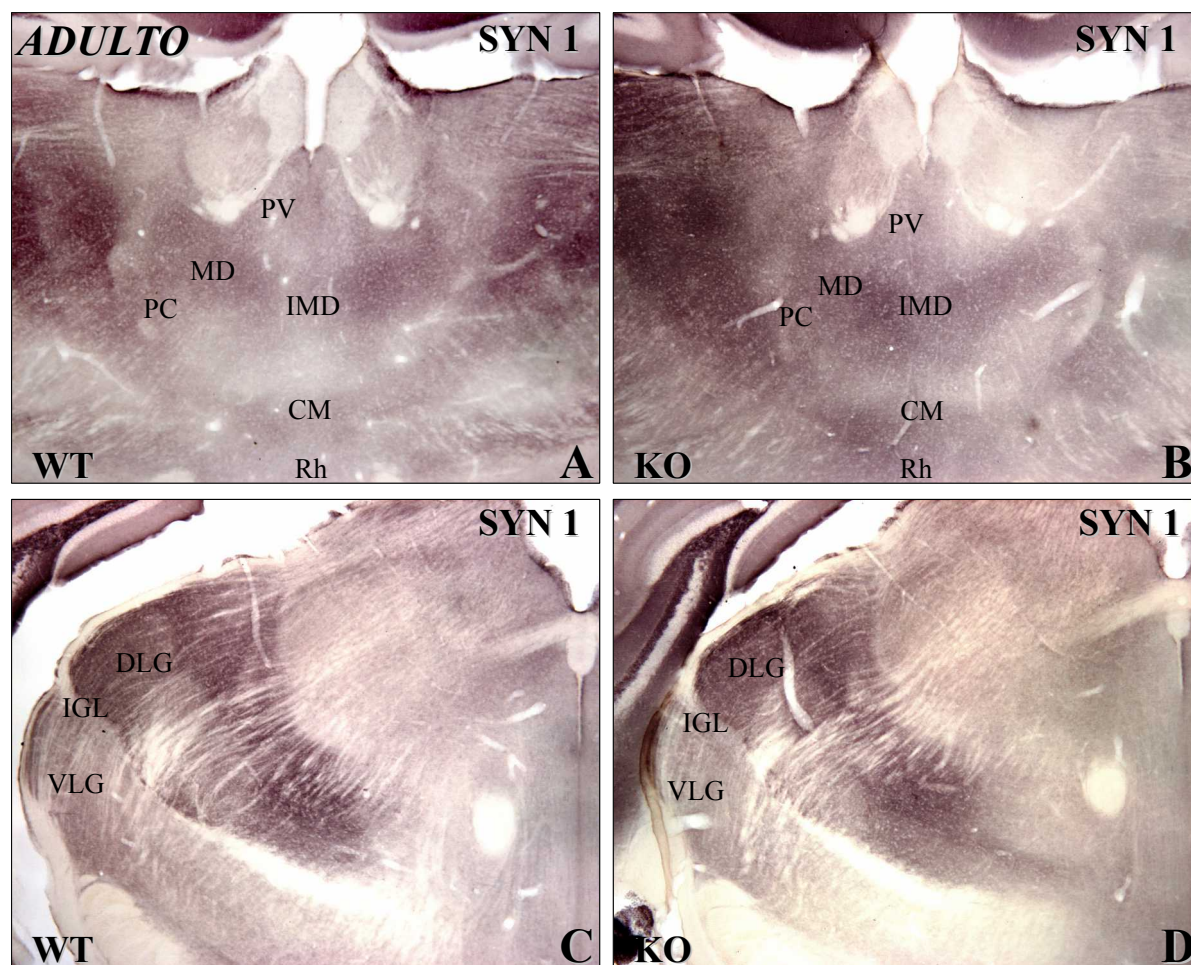


Figura 42. Microfotografías transversales del diencefalo de ratones machos adultos. Se observa inmunorreactividad para la sinapsina 1 (SYN1) en el tálamo dorsal de ratones WT a la izquierda y de ratones *Fmr1*-KO a la derecha. Se aprecia inmunorreactividad localizada exclusivamente en el neuropilo, ya que SYN1 se encuentra en las terminaciones sinápticas donde realiza su función. Se observa el mismo patrón de distribución de la inmunorreactividad para SYN1 en ambos genotipos (WT y *Fmr1*-KO). IMD, núcleo intermediodorsal; CM, núcleo centromedial; MD, núcleo dorsomedial; PC, núcleo paracentral; PV, núcleo paraventricular; Rh, núcleo romboidal; DLG, núcleo geniculado dorsolateral; IGL, intergeniculado; VLG, núcleo geniculado ventrolateral. Aumentos: A, B, C, D = 50x.

5. Estudio de la proteína FMRP en ratones WT a partir de la segunda semana de vida

El análisis de FMRP en ratones WT a partir de la segunda semana de vida nos aportará datos a tener en cuenta a la hora de analizar los estudios realizados sobre CaMKII α y sinapsina 1, ya que hemos observado cambios entre ratones WT y ratones *Fmr1*-KO a lo largo del desarrollo postnatal en estas dos proteínas, excepto en los postnatales de 21 días de edad (apartado 3 y 4).

Se realizaron estudios de Western Blots y estudios inmunohistoquímicos para FMRP en P14, P18, P21 y adulto, con la finalidad de analizar la cantidad de proteína FMRP a partir de la segunda semana después del parto, ya que además de no encontrar diferencias en P21 para CaMKII α y para sinapsina 1 en nuestros estudios, existen evidencias donde los niveles de FMRP en corteza de ratón quedan reducidos después de la segunda semana de vida (Till y cols., 2012).

5.1 Western Blots para la proteína FMRP en ratones WT desde P14 hasta adultos

Para el estudio mediante la técnica de Western Blot se utilizaron anticuerpos contra FMRP que reconocían un banda específica de aproximadamente 85 kDa. Este anticuerpo ha sido utilizado en otros estudios y se obtuvieron bandas similares (Dobson y cols., 2008; Fählng y cols., 2009). Para la realización de esta técnica se utilizaron extractos de cerebro de 4 ratones machos WT para cada estadio.

Se observaron diferencias en los niveles de expresión de la proteína FMRP entre los ejemplares P14, P21 y adulto WT (Fig. 43A). Estos resultados sugieren una disminución de la proteína FMRP en P21.

5.2 Análisis estadístico de la expresión de FMRP en P14, P21 y adultos WT

Una vez realizado el análisis densitométrico, para analizar las posibles diferencias entre P14, P21 y adultos como grupos independientes se empleó el análisis de la varianza ANOVA, dando como resultados diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.001$).

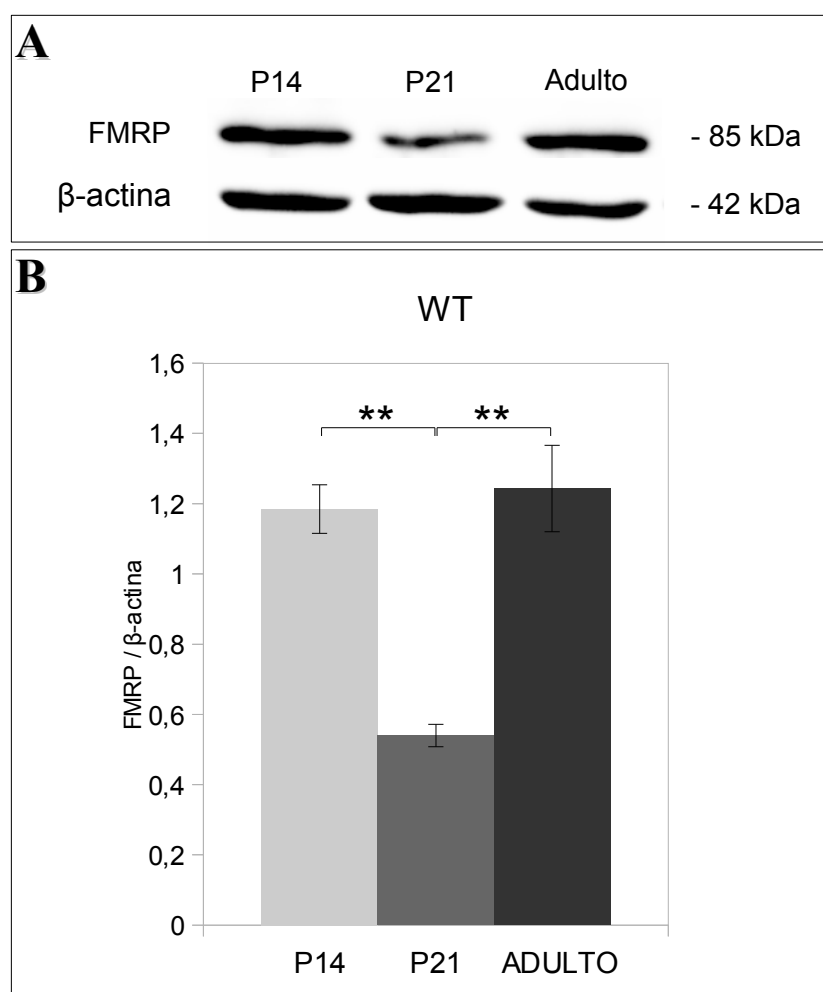


Figura 43. Niveles de expresión (A) y análisis densitométrico (B) de la proteína FMRP en extractos de cerebros de ratones silvestres (WT) de 14 días (P14), de 21 días (P21) y de 7 meses. A: Niveles de expresión obtenidos por Western Blot para un ejemplar P7, P14 y adulto utilizado en el estudio densitométrico. B: Representa la media de FMRP \pm SEM para $n = 5$ en P14, P21 y adulto de ratones WT. En todos los casos se normalizó utilizando β -actina. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor para comparar varios grupos independientes, seguido de la prueba T2 de Tamhane y T3 de Dunnett para comparar los grupos dos a dos. Se obtuvo diferencias significativas entre P14 y P21 y entre P21 y adulto. ** = $p < 0.01$.

Una vez obtenido el resultado del análisis de la varianza ANOVA se realizó la prueba T2 Tamhane y T3 de Dunnett para comparar los grupos dos a dos. En ambas pruebas obtuvimos diferencias significativas entre los ejemplares P14 y P21 ($p<0.01$) y entre los ejemplares P21 y adultos ($p<0.01$), no se observaron diferencias significativas entre los P14 y los adultos (Fig. 43B).

Los resultados del análisis estadístico para estos tres estadios sugiere una disminución notable de la cantidad de proteína FMRP de aproximadamente el 50% entre P14 y P21 como se observa en la gráfica (Fig. 43B), con una recuperación en los niveles de FMRP en los ratones adultos (Fig. 43B).

Estos datos coinciden con datos anteriores donde se observó una disminución de la cantidad de proteína FMRP a partir de la segunda semana después del parto (Till y cols., 2012). Por tanto podemos decir no sólo que la cantidad de proteína FMRP queda reducida tras la segunda semana del parto, sino también que a partir de la tercera semana los niveles de FMRP van incrementándose hasta llegar a valores similares a los obtenidos en P14 (Fig. 43B).

5.3 Inmunorreactividad para FMRP en el cerebro anterior de ejemplares postnatales y adultos WT

Los estudios inmunohistoquímicos para FMRP se realizaron en 3 ratones WT de cada estadio, desde P14 hasta adulto, analizando las mismas zonas de los estudios anteriores, con el fin de evaluar el patrón de distribución de FMRP a partir de la segunda semana del nacimiento, ya que es en este periodo donde hemos observado cambios significativos en la cantidad de FMRP.

La proteína FMRP se observó de forma generalizada en todo el cerebro anterior desde postnatales de 14 días hasta adulto. En los ejemplares P14 se observaron células FMRP-IR en todas las capas del hipocampo. El complejo amigdalino presentaba células inmunorreactivas para FMRP en todos sus núcleos, al igual que en el tálamo dorsal también se observaron

células FMRP-IR en todos los núcleos que lo conforman (Fig. 44A, B; Fig. 45A, B).

A continuación se analizaron los ejemplares P18, por encontrarse entre la segunda y la tercera semana de vida, y se observó el mismo patrón presente en P14, pero en P18 se apreció una reducción notable de la inmunorreactividad presente en las células FMRP-IR tanto en la amígdala, en el hipocampo, como en el tálamo dorsal en relación a los P14 (Fig. 44C, D; Fig. 45C, D).

Por último se analizaron los adultos WT, éstos presentaban el mismo patrón de distribución observado en los postnatales estudiados y se observó una fuerte inmunorreactividad para FMRP en las células de los núcleos del complejo amigdalino, del hipocampo y de los núcleos del tálamo dorsal similar a la encontrada en los P14 y mucho mayor a la observada en los P18 (Fig. 44E, F; Fig. 45E, F).

En resumen los resultados obtenidos mediante el estudio inmunohistoquímico para la proteína FMRP en ratones WT se correlacionan con los resultados obtenidos para dicha proteína mediante Western Blot. Ambos datos sugieren que tras la segunda semana postnatal la cantidad de FMRP disminuye y que a partir de la tercera semana la cantidad de FMRP va aumentando hasta la edad adulta.

Este último estudio con FMRP nos será de utilidad a la hora de discutir los resultados obtenidos sobre p-CaMKII α y sinapsina 1 en el desarrollo postnatal de los ratones WT y *Fmr1*-KO.

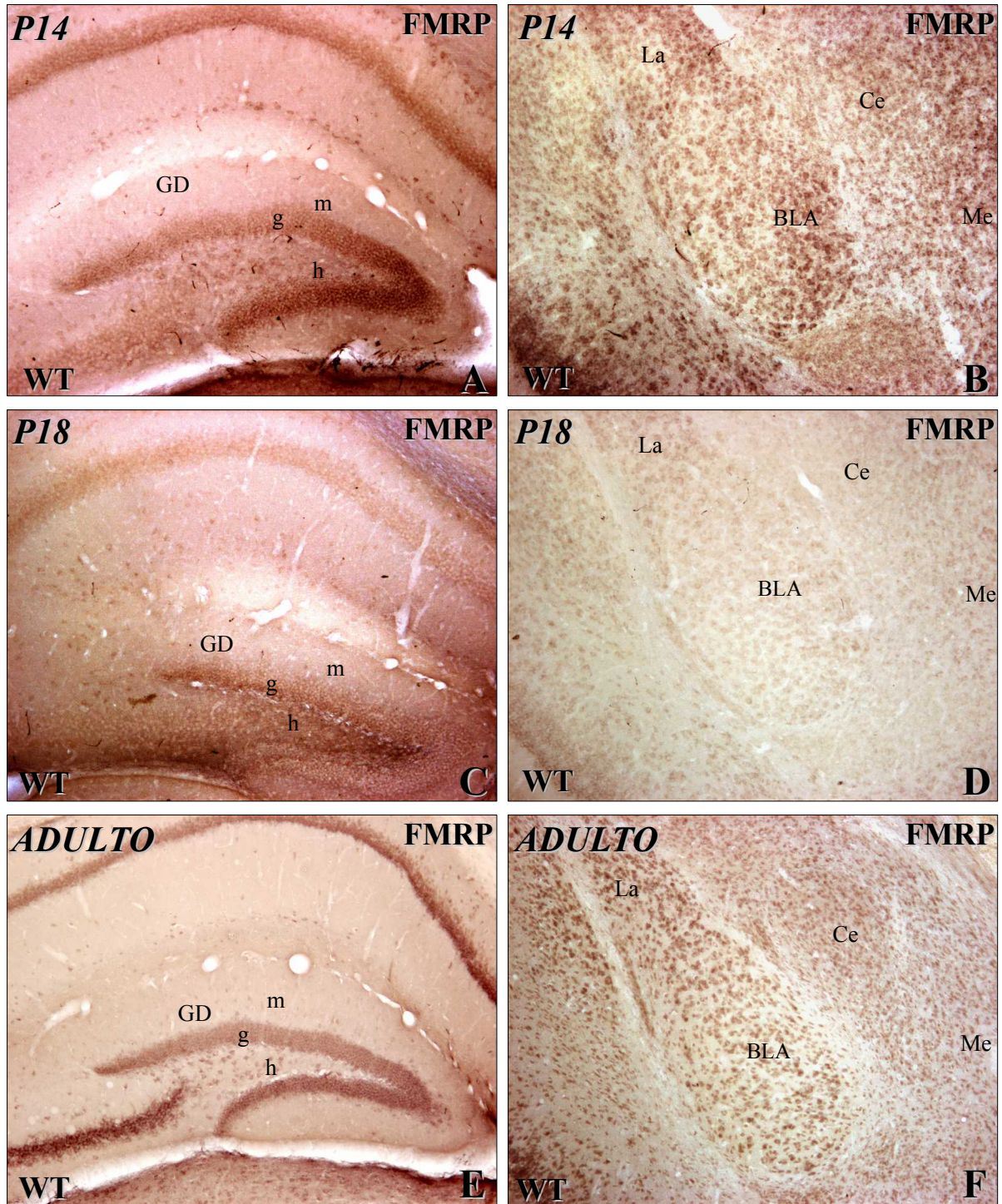


Figura 44. Secciones coronales del telencéfalo de ejemplares postnatales WT de 14 (P14) y 18 (P18) días de edad y de ratones adultos de 7 meses. En estas secciones se puede observar una disminución en la expresión de FMRP en el hipocampo y en la amígdala en P18 comparado con P14 y adulto. GD, giro dentado; m, capa molecular; g, capa granular; h, hilio; La, núcleo lateral; BLA, núcleo basolateral; Ce, núcleo central; Me, amígdala medial. A, B, C, D, E, F = 100x.

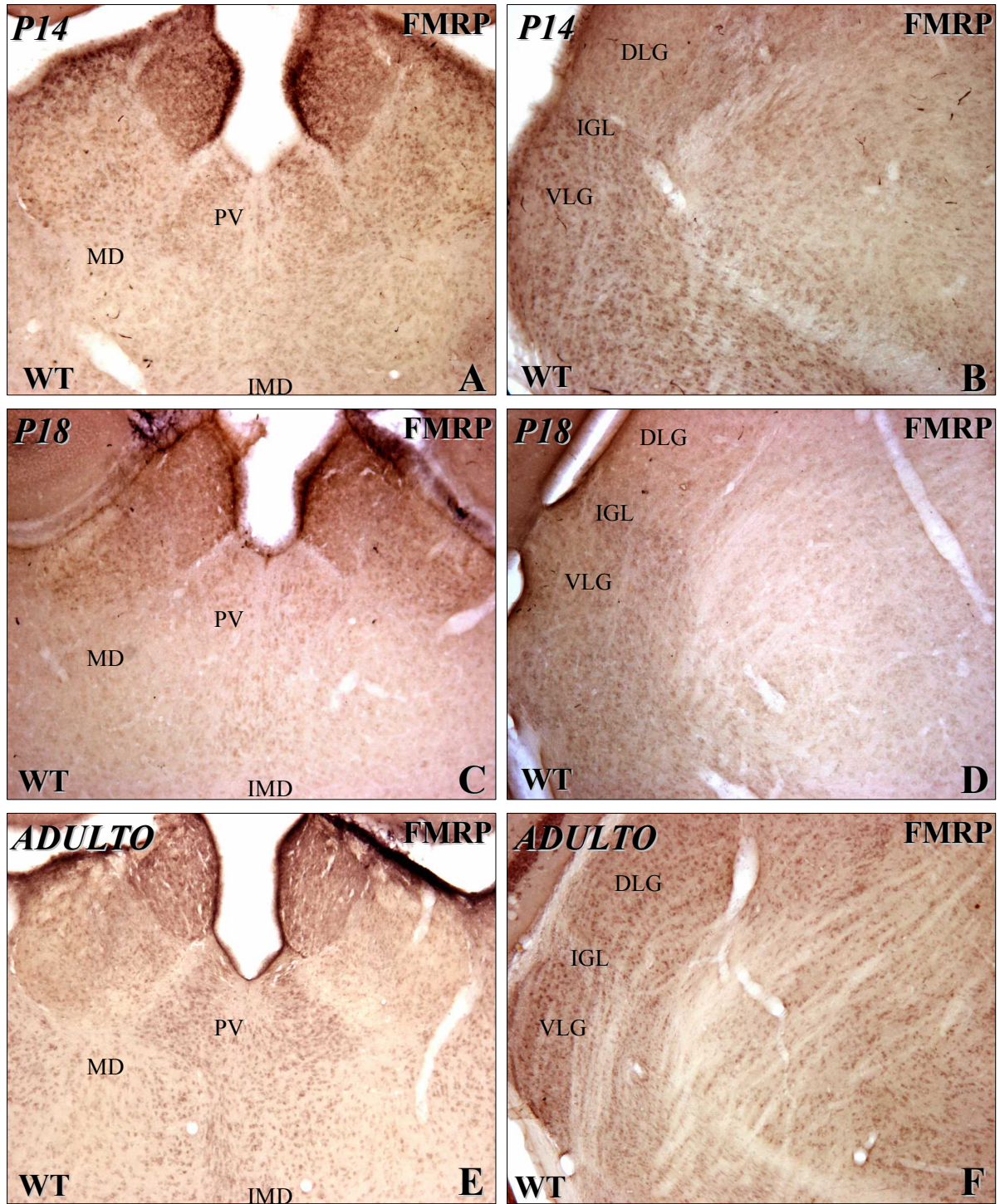


Figura 45. Microfotografías de secciones transversales del tálamo dorsal de ejemplares postnatales WT de 14 (P14) y 18 (P18) días de edad y de ratones adultos de 7 meses. En ellas se puede apreciar una disminución en la expresión de FMRP en el tálamo dorsal en P18 comparado con P14 y adulto. IMD, núcleo intermediodorsal; MD, núcleo dorsomedial; PV, núcleo paraventricular; DLG, núcleo geniculado dorsolateral; IGL, intergeniculado; VLG, núcleo geniculado ventrolateral. Aumentos: A, B, C, D, E, F = 100x.

DISCUSIÓN



1. Expresión de las proteínas ligadoras de calcio calbindina, calretinina y parvalbúmina en ratones *Fmr1-KO* en comparación con ratones *WT*

En el estudio de las tres proteínas ligadoras de calcio hemos encontrado diferencias significativas en la proteína calbindina entre los ratones *WT* y los ratones *Fmr1-KO*, sin embargo no hemos observado ninguna diferencia en la proteína parvalbúmina ni en calretinina en las zonas analizadas.

Las diferencias entre genotipos fueron observadas en el tálamo dorsal y en el hipocampo, no observándose ninguna diferencia en la expresión de estas proteínas ligadoras de calcio en la totalidad del cerebro anterior de ambos genotipos.

Las diferencias encontradas consistían en una disminución muy significativa de calbindina en el tálamo dorsal de ratones machos *Fmr1-KO* en comparación con los ratones machos *WT* y también en una reducción de calbindina en el hipocampo como mostraban los resultados de estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, estos estudios se centraron exclusivamente en el hipocampo de ratones machos, presentando una disminución significativa en el número de células inmunorreactivas para calbindina a nivel de la capa granular del giro dentado y en la capa piramidal de CA1 (Real y cols., 2011).

La disminución en la inmunoreactividad observada en el tálamo dorsal para calbindina en ratones machos *Fmr1-KO* es especialmente importante a nivel de la línea media, en los núcleos intralaminares y en los núcleos talámicos posteriores donde la reducción fue de hasta un 67% (Giráldez-Pérez y cols., 2013).

En nuestro grupo de investigación se llevó a cabo un estudio similar en paralelo empleando ratones hembras (Giráldez-Pérez y cols., 2013). No se observaron diferencias significativas entre los ratones hembras de ambos genotipos para ninguna de las proteínas analizadas, por lo que parece haber diferencias relacionadas con el sexo en el modelo de ratón del síndrome X-Frágil.

Con respecto a la proteína calretinina se observó un patrón de distribución similar entre los ratones *Fmr1*-KO y los ratones WT en todas las zonas estudiadas. A nivel del tálamo dorsal, los ratones machos *Fmr1*-KO analizados presentaron niveles normales en cuanto al número de células CR-IR.

En nuestros estudios hemos observado en ratones WT una expresión de calretinina y calbindina muy alta en la zona intralaminar y en los núcleos talámicos de la línea media, por lo que sugerimos una posible colocalización entre ambas proteínas. Sabemos que existen evidencias de colocalización entre ambas proteínas en algunos de los núcleos del tálamo dorsal del cerebro de rata (Résibois y Rogers, 1992) y en algunas células de la parte dorsal del núcleo geniculado medial del cerebro de ratón (Lu y cols., 2009), por lo que sugerimos la posible colocalización en aquellas zonas donde hay un nivel menor de inmunorreactividad para calbindina en ratones *Fmr1*-KO. Teniendo en cuenta esto, planteamos el análisis del número de células que colocalizan en ratones *Fmr1*-KO, de tal manera que una disminución en el número de células que colocalizan en ratones *Fmr1*-KO implicaría que las células que expresan, en condiciones normales, calbindina y calretinina se ven afectadas por la enfermedad y por el contrario, valores similares en la colocalización implicaría que son las células que expresan sólo calbindina y no calretinina las que se ven afectadas en el síndrome X-Frágil, al igual que ocurriría en el caso de no encontrar colocalización entre estas proteínas en esta zona.

El estudio de la colocalización de ambas proteínas queda fuera de nuestro objetivo, pero sería interesante realizar estudios relacionados con la idea de especificar qué subgrupo de células que expresan calbindina se ven afectadas por la enfermedad.

En relación al calcio sabemos que la calbindina se une al calcio intracelular ayudando a mantener los niveles de calcio en el interior celular. Por lo tanto, en los ratones *Fmr1*-KO la falta de calbindina podría dar lugar a un incremento de calcio alterando algunas de sus funciones, como la duración del potencial de acción y la protección frente a los efectos dañinos que provoca un incremento intracelular de calcio de manera prolongada (Baimbridge y cols., 1992)

Las neuronas del tálamo dorsal que presentan calbindina son glutamatérgicas, por tanto alteraciones en los niveles de calbindina en esta región, como sucede en los ratones *Fmr1-KO*, podrían producir alteraciones en los circuitos neuronales en las sinapsis excitadoras. Los receptores de glutamato NMDA y mGluR5 se encuentran regulados por FMRP (Darnell y cols., 2011). En estudios recientes se ha asociado a FMRP específicamente con la subunidad del receptor de NMDA (NR2A) en el cerebro de ratón (Edbauer y cols., 2010) y se ha observado un incremento de mGluR5 en la corteza prefrontal de pacientes con síndrome X-Frágil (Lohith y cols., 2013). También se encontró reducido el número de células glutamatérgicas CB-IR en el hipocampo de ratones machos *Fmr1-KO* (Real y cols., 2011). Nuestros datos apoyan la idea de la presencia de alteraciones en la transmisión glutamatérgica en el síndrome X-Frágil.

En relación a parvalbúmina tampoco hemos encontrado diferencias en ninguna de las regiones estudiadas. Concretamente en el tálamo dorsal la mayoría de la inmunorreactividad encontrada proceden de fibras PV-IR, no observándose diferencias en el patrón de distribución. La mayoría de las fibras PV-IR presentes en el tálamo dorsal proceden de neuronas cuyo cuerpo celular se encuentra localizado en el núcleo reticular del pretálamo (Arai y cols., 1994) y se sabe que parte de las neuronas GABAérgicas de este núcleo proyectan al tálamo dorsal (Velayos y cols., 1989; Gonzalo-Ruiz y Lieberman, 1995; Wang y col., 2005), por tanto estas proyecciones de entrada al tálamo dorsal no parecen estar afectadas en los ratones *Fmr1-KO*.

En resumen, parece ser que la baja inmunorreactividad para calbindina observada en nuestro estudio en el tálamo dorsal de los núcleos intralaminares, en los núcleos de la línea media, en algunos núcleos del tálamo posterior y en parte del hipocampo de ratones machos *Fmr1-KO* es una característica propia de este genotipo. Al parecer no existe mecanismo compensatorio por parte de las otras dos proteínas ligadoras de calcio, puesto que no se han observado diferencias entre ambos genotipos, por lo que sugerimos que la falta de calbindina en regiones concretas del cerebro daría lugar a un incremento del calcio intracelular en dichas zonas y como consecuencia un incremento en la liberación del neurotransmisor. Este hecho se discutirá más adelante (ver apartado 11).

2. Expresión de la sintasa del óxido nítrico neuronal en ratones *Fmr1-KO* en comparación con ratones *WT*

En este estudio realizado a nivel de la amígdala, el hipocampo y el tálamo dorsal tan sólo se observaron diferencias entre ratones *WT* y *Fmr1-KO* en un conjunto de fibras nNOS-IR localizadas en el hipocampo a nivel del giro dentado, concretamente los animales *Fmr1-KO* analizados presentaron una menor inmunorreactividad en la parte interna de la capa molecular del giro dentado.

Las células granulares del giro dentado poseen dendritas que se ramifican de forma proximal al cuerpo celular y luego atraviesan la capa molecular en todo su espesor (Amaral y Witter, 1989). Sobre estas ramificaciones proximales proyectan sus axones interneuronas cuyo soma se encuentra situado en el hilio (Deller, 1998).

La inmunorreactividad observada para nNOS en la parte interna de la capa molecular parece provenir de las células nNOS-IR cuyos cuerpos celulares se encuentran en el hilio. Según nuestros estudios, estas interneuronas parecen presentar menos inmunorreactividad en ratones *Fmr1-KO* en comparación con ratones *WT*, no encontrándose diferencias cualitativas en los somas inmunorreactivos, pero sí a nivel axónico y dendrítico.

El hecho de encontrar menor inmunorreactividad en la sintasa del óxido nítrico en ratones *Fmr1-KO* implicaría una menor producción de óxido nítrico. El déficit en óxido nítrico en las interneuronas del hilio daría lugar a una menor liberación del neurotransmisor GABA, lo que conlleva a una menor inhibición de éstas sobre las dendritas de las células granulares del giro dentado y como resultado un incremento en la liberación del neurotransmisor glutamato por parte de las células granulares.

Las células granulares proyectan desde el giro dentado hasta CA3 participando en una de las redes más importantes de conexiones en el hipocampo (Blackstad y Kjaerheim, 1961;

Amaral, 1979; Chicurel y Harris, 1992).

Según nuestros estudios estas conexiones podrían estar alteradas en los ratones *Fmr1*-KO, por lo que es necesario un estudio en profundidad sobre esta región del cerebro en relación a la sintasa del óxido nítrico entre otros marcadores. Este estudio concreto, a nivel del hipocampo, se está llevando a cabo en la actualidad en nuestro grupo de investigación con la idea de obtener más información sobre las posibles alteraciones en el hipocampo de los ratones *Fmr1*-KO. En nuestro laboratorio hemos aislado el hipocampo de ratones *Fmr1*-KO y ratones WT y se está estudiando la cantidad de una serie de proteínas, entre las que se encuentra la nNOS, mediante la técnica de Western Blot, con la finalidad de estudiar posibles variaciones en la concentración proteica entre ambos genotipos a nivel del hipocampo.

3. *Expresión de los transportadores vesiculares de glutamato tipo 1 (VGLUT1) y tipo 2 (VGLUT2) en ratones Fmr1-KO en comparación con ratones WT*

En nuestro estudio el patrón de distribución de VGLUT1 y VGLUT2 en ratones *Fmr1*-KO fue similar al patrón encontrado en ratones WT.

Estudios previos ya demostraron que los ARNm de VGLUT1 y VGLUT2 se encuentran distribuidos de forma complementaria en el cerebro (Fremeau y cols., 2001; Herzog y cols., 2001; Varoqui y cols., 2002) y que a nivel intracelular, estos transportadores se encuentran exclusivamente en terminales glutamatérgicos (Bellocchio y cols., 1998; Fremeau y cols., 2001; Fujiyama y cols., 2001; Sakata-Haga y cols., 2001; Takamori y cols., 2001; Varoqui y cols., 2002; Hayashi y cols., 2003). La expresión complementaria de VGLUT1 y VGLUT2 representa la liberación de glutamato por todas las neuronas excitadoras (Fremeau y cols., 2002).

Teniendo en cuenta lo planteado en el párrafo anterior, en nuestro estudio comparativo entre ratones WT y *Fmr1*-KO utilizando estos marcadores (VGLUT1 y VGLUT2), hemos podido estudiar las posibles diferencias, de manera general, de todas las células glutamatérgicas. Hay que tener en cuenta que estos transportadores vesiculares se encuentran en los terminales sinápticos, no observándose ningún soma celular inmunorreactivo para VGLUT1 y VGLUT2, lo que dificulta el estudio comparativo entre ambos genotipos con la técnica inmunohistoquímica.

En nuestros estudios hemos analizado de forma cualitativa el patrón de distribución en la amígdala, el hipocampo y el tálamo dorsal, no encontrando diferencias en la distribución de estos transportadores vesiculares en las terminaciones sinápticas entre los ratones WT y los ratones *Fmr1*-KO.

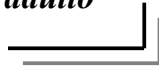
Tampoco se observaron diferencias entre genotipos en el estudio mediante Western Blots realizado para ambos transportadores, lo que sugiere de forma general, que la cantidad de VGLUT1 y VGLUT2 en el cerebro anterior no se ve afectada en ratones *Fmr1*-KO. El hecho de que estos transportadores vesiculares no estén alterados en los ratones *Fmr1*-KO nos sugiere que el transporte del glutamato hacia el interior vesicular tendría lugar de forma normal en los ratones *Fmr1*-KO.

A pesar de haber muchos estudios en ratones *Fmr1*-KO que presentan diferencias relacionadas con los transportadores de glutamato que transporta este neurotransmisor al interior celular (Thomas y cols., 2011; Costa y cols., 2012; Cruz-Martín y cols., 2012; Niere y cols., 2012; Vinuesa y cols., 2012), no existe ningún estudio hasta la fecha que presenten diferencias en los transportadores del glutamato VGLUTs.

Consideramos necesario realizar estudios posteriores con estos transportadores vesiculares en zona específicas del cerebro, para poder ver si existen anomalías en la cantidad de VGLUT1 y/o VGLUT2 en los ratones *Fmr1*-KO en regiones concretas. Actualmente en nuestro laboratorio se están realizando estudios de Western Blot para VGLUT1 y VGLUT2 en el hipocampo de ratones *Fmr1*-KO y ratones WT, con el fin de estudiar el hipocampo de los

ratones *Fmr1*-KO con mayor detalle.

4. *Expresión de la quinasa CaMKII α y su forma activa p-CaMKII α en ratones *Fmr1*-KO en comparación con ratones WT a lo largo del desarrollo postnatal y hasta el adulto*



CaMKII desempeña un papel importante en la síntesis y liberación de neurotransmisores entre otras funciones (Hanson y Schulman, 1992b; Braun y Schulman, 1995) y está presente en el terminal presináptico por lo que el estudio de esta quinasa en los ratones *Fmr1*-KO a lo largo del desarrollo postnatal fue nuestro primer objetivo a nivel presináptico.

CaMKII es una quinasa que presenta 4 isoformas (α , β , γ , δ) (Bennett y Kennedy, 1987; Lin y cols., 1987; Tobimatsu y Fujisawa, 1989; Karls y cols., 1992) y nuestros estudios se centraron en la isoforma CaMKII α por varios motivos fundamentales. En primer lugar existían evidencias de que las isoformas α y β de esta proteína eran específicas del cerebro (Silva y cols., 1992a; Silva y cols., 1992b), por lo que descartamos las isoformas γ y δ en nuestro estudio. Otra razón importante por la cual se decidió estudiar esta proteína fue gracias a los estudios realizados por Darnell y sus colaboradores que publicaron una extensa lista de proteínas cuya traducción está regulada por FMRP (Darnell y cols., 2011), entre estas proteínas se encontraban las isoformas α y β de CaMKII. Por otro lado existían estudios con ratones CaMKII α -KO que presentaban deterioro en la memoria espacial y en la potenciación a largo plazo lo que demostraba que las otras isoformas no compensaban el déficit de CaMKII α (Silva y cols., 1992a; Silva y cols., 1992b). Y por último, teniendo en cuenta que nuestro estudio se centró en el desarrollo postnatal, existían estudios realizados mediante transferencia con Northern donde se observó CaMKII α en el desarrollo postnatal y no durante el desarrollo embrionario (Bayer y cols., 1999), y fue en estos estudios donde se observaron por primera vez los transcritos de la isoforma α en los postnatales con un día, con una señal de hibridación muy débil, siendo en P5 cuando ya se apreciaban unos niveles altos de ARNm para CaMKII α (Bayer y cols., 1999).

No obstante sería interesante realizar estudios similares utilizando CaMKII β en el desarrollo embrionario de ratones *Fmr1*-KO, ya que la traducción de esta isoforma también está bajo la influencia de FMRP (Darnell y cols., 2011) y se sabe que los primeros transcritos para la isoforma β se observaron en embriones E12,5 (Bayer y cols., 1999). En este caso sugerimos que la ausencia de FMRP podría variar los niveles de CaMKII β y tener repercusiones a lo largo del desarrollo embrionario.

Con la intención de ver si la ausencia de FMRP podría variar los niveles de CaMKII α y por tanto repercutir en el desarrollo postnatal se analizó esta isoforma en estadios postnatales y adultos comparando los ratones *Fmr1*-KO con los ratones WT.

En ninguno de los estadios postnatales estudiados, ni en los ratones adultos, se encontraron diferencias entre los ratones WT y los ratones *Fmr1*-KO en la cantidad de CaMKII α . En relación a la cantidad de quinasa activa, p-CaMKII α , se observó mayor cantidad de esta quinasa fosforilada en ratones *Fmr1*-KO en todos los estadios a partir de P7 hasta adulto, exceptuando postnatales de 21 días de vida. Tanto el hecho de encontrar diferencias en p-CaMKII α , y no en CaMKII α , como el hecho de no encontrar ninguna diferencia entre genotipos en P21 será discutido en los apartados 5 y 10 respectivamente.

5. Mayor cantidad de proteína CaMKII α fosforilada en ratones *Fmr1*-KO en comparación con ratones WT

CaMKII α interviene en la regulación de la excitabilidad neuronal, tanto en sinapsis excitadoras como inhibitoras (Marsden y cols., 2010). Es una proteína que actúa fosforilando a otras proteínas (Colbran, 1992). Para que CaMKII α realice su función y sea activa debe ser fosforilada, siendo el mecanismo la autofosforilación de treonina 286, dependiente de Ca²⁺/calmodulina (Colbran, 1992; Ishida y cols., 1996). En condiciones basales la actividad de CaMKII α es inhibida por un dominio de autoinhibición que se une a la parte catalítica de la misma. En presencia de calmodulina y calcio el dominio de autoinhibición se disocia del catalítico permitiéndose la autofosforilación en Thr286 (Morris y Török, 2001; Tao-Cheng y

cols., 2001).

Cada monómero de CaMKII α tiene la capacidad de autoensamblarse y formar holoenzimas de 12 subunidades, el agrupamiento de los dominios funcionales favorece que tenga lugar la autofosforilación (Stratton y cols., 2013; Fig. 46).

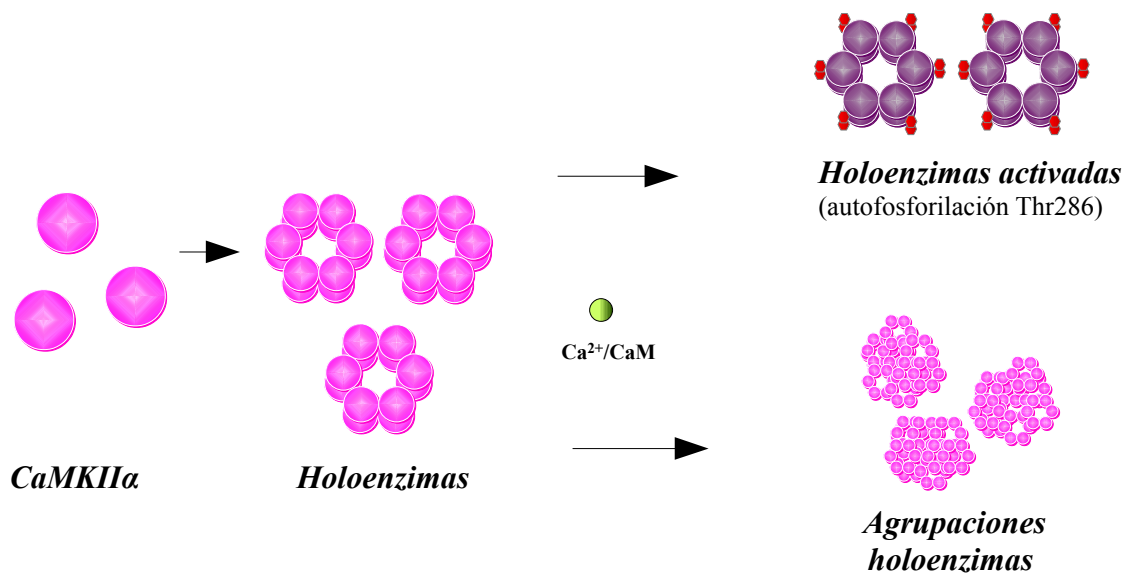


Figura 46. Esquema representativo de las distintas formas en las que se puede encontrar la quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina II alfa (CaMKII α). En el interior celular la CaMKII α total se encuentra en forma de monómeros, formando holoenzimas inactivas, formando holoenzimas activas y formando agrupaciones de holoenzimas no activas.

CaMKII α tiene la propiedad de formar agrupaciones (Fig. 46), estas agrupaciones son dependientes de calcio, de tal manera que un fuerte incremento en los niveles de calcio intracelular favorece su formación. Existe un periodo de 1 a 2 minutos entre el aumento elevado de calcio intracelular y la formación de estas agrupaciones (Tao-Cheng y cols., 2001). Estas agrupaciones influyen en la autofosforilación de Thr286 y por tanto en su actividad (Tao-Cheng y cols., 2001). Hay estudios que proponen que estas agrupaciones están formadas enteramente por holoenzimas de CaMKII que se han agregado a través de interacciones entre ellas (Hudmon y cols., 2001; Vest y cols., 2009). Se sabe que se unen unas a otras bloqueándose el lugar de autofosforilación, siendo imposible la autofosforilación cuando estas holoenzimas están agrupadas (Vest y cols., 2009). También se ha observado *in vitro* que

para la formación de estas agrupaciones es necesario la presencia de Ca^{2+} /calmodulina (Hudmon y cols., 2001; Vest y cols., 2009).

En condiciones normales FMRP inhibe la traducción de CaMKII α . En el caso de los ratones *Fmr1*-KO la regulación de la traducción de CaMKII α se ve alterada, pudiendo incrementarse la cantidad de proteína traducida. En nuestros experimentos sobre la cantidad de proteína total y fosforilada tan sólo hemos encontrado diferencias significativas en el caso de la proteína fosforilada p-CaMKII α , cuando era de esperar que la cantidad de CaMKII α total encontrada fuese mayor en el *Fmr1*-KO, ya que suponemos que la traducción de esta proteína es mayor en ausencia de FMRP. Una posible explicación vendría dada por la capacidad de agruparse que tiene esta proteína. En el caso de los ratones *Fmr1*-KO cabe pensar que habrá mayor cantidad de CaMKII α y probablemente mayor cantidad de calcio intracelular, como se explicará al final de este apartado. Cuando el incremento de calcio es prolongado podría dar lugar a la formación de más agrupaciones en los ratones *Fmr1*-KO en comparación con los ratones WT.

Por otro lado la formación de holoenzimas de 12 subunidades favorece la autofosforilación, de tal manera que es lógico pensar que si existen más holoenzimas en ratones *Fmr1*-KO habrá mayor cantidad de p-CaMKII α en comparación con los ratones WT, como observamos en nuestros estudios.

La cantidad de proteína estudiada mediante la técnica Western Blot hace referencia a la cantidad de monómeros de CaMKII α siendo evidente que parte de los monómeros presentes en las agrupaciones no son separados mediante nuestra técnica, por eso cabe pensar que parte de esta proteína pueda no ser cuantificada. Las condiciones para la realización de esta técnica es similar para WT y para *Fmr1*-KO, pero teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el hecho de no encontrar diferencias significativas en CaMKII α total, como era de esperar al haber mayor traducción de dicha proteína, podría tener una explicación en las posibles agrupaciones de la proteína.

En resumen partimos de la idea de que en los ratones *Fmr1*-KO debe haber mayor traducción de CaMKII α y por tanto la cantidad de holoenzimas formadas debe ser mayor,

unido a un incremento de calcio, podemos pensar que hay mayor cantidad de holoenzimas fosforiladas y de agrupaciones que en ratones WT. En el caso de los ratones WT, la cantidad de agrupaciones sería menor en comparación con ratones *Fmr1*-KO, puesto que la traducción de dicha proteína no está alterada, encontrándose mayor proporción de monómeros CaMKII α libres y holoenzimas que agrupaciones en comparación con los ratones *Fmr1*-KO.

En definitiva planteamos que la cantidad de proteína CaMKII α , donde se incluye los monómeros fosforilados y los no fosforilados, pueden no ser las esperadas debido a una posible mayor cantidad de agrupaciones en el caso de los ratones *Fmr1*-KO, que quedan fuera de la cuantificación como proteína total.

Lo que sí es evidente con los resultados obtenidos en este trabajo es la existencia de un aumento en la actividad de CaMKII α en ratones *Fmr1*-KO, cuantificado mediante la cantidad de p-CaMKII α .

En relación al incremento de calcio intracelular en ausencia de FMRP, existen estudios recientes realizados en el hipocampo de ratón que confirman que FMRP regula la liberación de neurotransmisores en células piramidales de CA3 (Contractor, 2013; Deng y cols., 2013), hecho que podría tener lugar en otras zonas del cerebro. Estos mismos estudios presentan evidencias de que FMRP actúa sobre los canales de potasio, controlando la durabilidad del potencial de acción, de tal modo que una pérdida de FMRP conlleva un aumento en la duración del potencial de acción, aumentando el calcio presináptico y, como consecuencia, incrementándose la liberación del neurotransmisor. FMRP interactúa con la subunidad $\beta 4$ de los canales de potasio limitando la duración del potencial (Contractor, 2013; Deng y cols., 2013), por lo que la ausencia de la misma provocaría un incremento de la duración del potencial. Sin FMRP se reduce la actividad de los canales de potasio y como consecuencia se ve incrementado el calcio intracelular. En resumen la ausencia de FMRP aumenta la duración del potencial, incrementándose el calcio intracelular, siendo mayor la transmisión sináptica y el potencial de acción a corto plazo (STP). Aunque esto haya sido demostrado en una zona concreta del hipocampo (Contractor, 2013; Deng y cols., 2013) es posible que este mecanismo sea un fenómeno generalizado.

Así, podría ser que el aumento en la cantidad de p-CaMKII α estuviese influida por FMRP a nivel de la traducción de CaMKII α , como hemos planteado anteriormente, o podría ser que el incremento de p-CaMKII α y no de CaMKII α en ratones *Fmr1*-KO pudiese estar relacionado con FMRP de forma indirecta, al incrementarse el calcio intracelular. En ausencia de FMRP parece incrementarse el calcio intracelular por distintas vías. En primer lugar, se sabe que FMRP interactúa con canales de potasio incrementando el calcio intracelular (Contractor, 2013; Deng y cols., 2013) y en segundo lugar se ha observado un incremento en los receptores mGluR5 en ausencia de FMRP, hecho que conlleva también un aumento de calcio intracelular (Lohith y cols., 2013; Li y Zhao, 2014; Pop y cols., 2014).

Por último, en relación al incremento de calcio intracelular cabe plantear la posible relación entre estudios donde ratones con deficiencias en calbindina presentan una elevación prolongada de la concentración de calcio intracelular (Pasti y cols., 1999) y los estudios realizados en nuestro grupo de investigación, donde se han observado que en ratones *Fmr1*-KO existe menor número de células CB-IR en diferentes zonas del cerebro como en la capa granular del giro dentado, en la capa piramidal de CA1 en el hipocampo (Giráldez-Pérez y cols., 2013) y en la mayoría de los núcleos del tálamo dorsal (Real y cols., 2011). Esta relación implicaría que en determinadas zonas del cerebro, donde el número de células CB-IR disminuye en ausencia de FMRP, el incremento de calcio intracelular será mayor que en otras zonas, puesto que la calbindina tiene la capacidad de unirse al calcio y disminuir la concentración de calcio libre en el citosol.

Por tanto, de forma indirecta la pérdida de FMRP daría lugar a un incremento de calcio intracelular prolongado y como consecuencia tendría lugar un incremento de p-CaMKII α .

6. *Expresión de la sinapsina 1 en ratones Fmr1-KO en comparación con ratones WT a lo largo del desarrollo postnatal y hasta el adulto*

Los niveles de expresión de la sinapsina 1 aumentan durante la sinaptogénesis, lo que sugiere que esta proteína podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la fisiología sináptica (Lohmann y cols., 1978).

Hay estudios que demuestran que las sinapsinas no son esenciales para el desarrollo neuronal, ni para el funcionamiento sináptico basal, sin embargo parecen ser cruciales para el ajuste fino de la transmisión sináptica y su remodelación (Cesca y cols., 2010). Cuando tienen lugar mutaciones que afectan a esta proteína y a su correcto funcionamiento se observan deficiencias en el potencial a corto plazo, deficiencias que tendrían repercusiones sobre la modulación a largo plazo de la excitabilidad neuronal y en última instancia sobre el desarrollo de enfermedades conductuales y/o cognitivas (Cesca y cols., 2010).

Las sinapsinas presentan un extremo N-terminal que presenta tres dominios, A, B y C, donde A y C son dominios altamente conservados entre especies. Este extremo N-terminal puede ser fosforilado por PKA, CaMKI y CaMKIV. El extremo C-terminal es bastante variable, presentando distintos dominios en función del tipo de sinapsina. El dominio D es el dominio presente en la sinapsina 1 (Südhof y cols., 1989). El dominio D contiene varios sitios de fosforilación, dos de los cuales pueden ser fosforilados por CaMKII (Huttner y cols., 1981; Kennedy y cols., 1983; Czernik y cols., 1987; Sakurada y cols., 2002).

Son varios los motivos por los cuales hemos estudiado esta proteína. En primer lugar se sabe que sinapsina 1 juega un papel crucial en la liberación del neurotransmisor (Li y cols., 1995; Rosahl y cols., 1995), además de participar en el desarrollo neuronal y en la formación de contactos sinápticos entre las neuronas (Lu y cols., 1992; Melloni y cols., 1994; Valtorta y cols., 1995). En segundo lugar, sinapsina 1 está directamente relacionada con CaMKII α , ya que CaMKII α fosforila a sinapsina 1 en el terminal presináptico (Huttner y cols., 1981; Kennedy y cols., 1983; Czernik y cols., 1987; Sakurada y cols., 2002), siendo su principal

sustrato (Greengard y cols., 1993). Y por último, un motivo fundamental del estudio de esta proteína fue la evidencia de que FMRP se unía al ARNm de sinapsina 1 interviniendo en la regulación de su traducción (Darnell y cols., 2011).

Por todo lo expuesto en el párrafo anterior y al no encontrar ningún estudio relacionado con la expresión de sinapsina 1 en ratones *Fmr1*-KO hemos considerado clave el estudio comparativo de esta proteína entre ratones WT y *Fmr1*-KO durante el desarrollo postnatal.

Se comparó la expresión de sinapsina 1 en estadios postnatales y adultos de ratones WT y ratones *Fmr1*-KO con la intención de ver si la falta de FMRP alteraba los niveles de esta proteína como ocurría con la p-CaMKII α .

Al igual que en el estudio para CaMKII α , lo primero que se realizó fue un estudio de Western Blot en ejemplares WT desde embriones E18.5 WT hasta adultos de 7 meses (E18.5, P0, P4, P7, P14, P21 y adulto) para comprobar la existencia de sinapsina 1 en todos los estadios a analizar. En nuestros estudios se observó expresión para sinapsina 1 en todos los ejemplares analizados desde E18.5, siendo nuestros datos coherentes con estudios anteriores donde se expresó sinapsina 1 desde estadios embrionarios (Lohmann y cols., 1978; De Camilli y cols., 1983; Mason, 1986; Haas y DeGennaro, 1988).

Teniendo en cuenta que obtuvimos expresión para sinapsina 1 en ratones WT desde embriones, se realizó el estudio comparativo entre ratones WT y ratones *Fmr1*-KO desde embriones E18.5 hasta adultos. Realizamos un estudio de Western Blot utilizando 4 embriones WT y 4 embriones *Fmr1*-KO para comprobar si había diferencias entre genotipos, al no encontrarse diferencias significativas nos centramos en el estudio de ratones *Fmr1*-KO a lo largo del desarrollo postnatal.

Se observó una mayor cantidad de sinapsina 1 en ratones *Fmr1*-KO en los mismos estadios donde se observó mayor cantidad de p-CaMKII α (P7, P14 y adulto). Por tanto es a partir de la primera semana después del parto cuando encontramos diferencias significativas entre los genotipos, no observándose diferencias en los P21, al igual que ocurría para p-

CaMKII α , hecho que será discutido en el apartado 10.

Por tanto, según nuestros estudios la falta de FMRP en el desarrollo postnatal conlleva un incremento de p-CaMKII α y sinapsina 1 desde P7 hasta adultos, exceptuando a P21. Sugerimos que el incremento de estas proteínas en los ratones *Fmr1*-KO da lugar a una liberación anormal de los neurotransmisores en el desarrollo postnatal y en los adultos teniendo repercusiones en la excitabilidad neuronal.

Existen estudios que relacionan la expresión de CaMKII α con FMRP en P21 (Akins y cols., 2012) y adultos (Deng y cols., 2011), pero es nuestro estudio el primero en relacionar la cantidad de p-CaMKII α con FMRP a lo largo del desarrollo postnatal. En la actualidad no hemos encontrado ningún estudio que relacione la cantidad de sinapsina 1 con la proteína FMRP ni en el desarrollo postnatal ni en el adulto, por lo que cabe plantear futuros estudios en relación a sinapsina 1 con el fin de aportar mayor información sobre las posibles causas del síndrome X-Frágil.

Recientemente, Darnell y Klann observaron que la traducción de la sinapsina 2 también estaba bajo la influencia de FMRP (Darnell y Klann, 2013), a pesar de que esta sinapsina no sea activada por CaMKII α parece muy interesante el estudio de la sinapsina 2, teniendo en cuenta las diferencias encontradas para sinapsina 1 en ratones *Fmr1*-KO, ya que ambas sinapsinas están implicadas en la liberación de los neurotransmisores.

7. Mayor cantidad de proteína sinapsina 1 en ratones *Fmr1*-KO en comparación con los ratones WT

La expresión de la sinapsina 1 comienza cuando se diferencian las células progenitoras en neuronas diferenciadas y es especialmente alta durante la sinaptogénesis (Lohmann y cols., 1978; De Camilli y cols., 1983; Mason, 1986; Haas y DeGennaro, 1988; Melloni y DeGennaro, 1994). En los terminales presinápticos de neuronas del hipocampo en cultivo se observa un aumento de la expresión de sinapsina 1 en el tiempo (Fletcher y cols., 1991;

Ferreira y cols., 2000).

La tasa de síntesis de ARNm se mantiene más o menos constante, por lo que el aumento progresivo de la proteína parece deberse a mecanismos de regulación post-transcripcionales (Daly y Ziff, 1997).

Los ratones *Fmr1*-KO utilizados en nuestro estudio no presentan la proteína FMRP, como esta interviene en la regulación de la traducción de sinapsina 1, concretamente inhibiéndola (Darnell y cols., 2011), se provocaría una mayor traducción de esta proteína.

En nuestro estudio mediante Western Blot se ha observado mayor cantidad de sinapsina 1 en los ratones *Fmr1*-KO en relación a los ratones WT en todos los estadios estudiados a partir de postnatales de 7 días, excepto en los P21, donde no observamos diferencias significativas, hecho que será discutido más adelante (ver apartado 10). Por otra parte hemos visto un incremento progresivo en la cantidad de proteína sinapsina 1 a lo largo del desarrollo, tanto en ratones WT como en ratones *Fmr1*-KO. Como hemos expuesto anteriormente la tasa de transcripción se mantiene constante a lo largo del tiempo en ratones WT, si suponemos que ocurre de igual modo en los ratones *Fmr1*-KO, podemos deducir que el incremento en la cantidad de sinapsina 1 en ratones *Fmr1*-KO con respecto a los WT tendrá lugar a nivel traduccional, siendo la ausencia de FMRP la posible causante del incremento de sinapsina 1.

Lo expuesto hasta ahora sobre el incremento de sinapsina 1 parece un planteamiento lógico, pero no podemos descartar una posible relación entre el incremento de sinapsina 1 y mecanismos transcripcionales.

Hay evidencias que afirman que el factor nuclear respiratorio (NRF-1) interviene regulando de forma positiva al promotor de sinapsina 1. En estos estudios se ha observado una correlación entre la cantidad de NRF1 y la cantidad de proteína sinapsina 1, de tal manera que ante una sobreexpresión de NRF1 se incrementa la cantidad de proteína sinapsina 1 (Wang y cols., 2009).

Por otra parte el promotor del gen *Fmr1* presenta un lugar de unión a NRF-1, factor que también está involucrado en la regulación de la transcripción de *Fmr1*. En el caso del síndrome X-Frágil existe excesiva metilación en el gen *Fmr1* en el lugar de unión a NRF-1, imposibilitándose la unión de dicho factor.

Teniendo en cuenta lo anterior es posible plantear otra explicación al aumento de la proteína sinapsina 1. En el síndrome X-Frágil existe un elevado número de metilaciones en la región del gen *Fmr1* que se une a NRF-1, no teniendo lugar la unión. Por tanto, al no darse la unión entre NRF-1 y el promotor de *Fmr1* quedaría más NRF-1 libre y este aumento de NRF-1 libre podría ser el causante del aumento en la cantidad de proteína sinapsina 1.

Como dato a tener en cuenta, relacionado con los resultados obtenidos para CaMKII α y sinapsina 1 en nuestro estudio, existe un antidepresivo denominado SAM (s-adenosilmethionina) que al suministrarse en ratas se ha visto que ocurre algo comparable con estas dos proteínas (Consogno y cols., 2001). Se ha observado un aumento en la actividad de CaMKII y un aumento en sinapsina 1 (Consogno y cols., 2001). No se sabe cuál es el mecanismo de acción de este antidepresivo, pero se piensa que podría ser un posible donante de metilo (Consogno y cols., 2001). Por tanto coincidiría con la hipótesis planteada anteriormente, al aumentar la metilación, el promotor del gen *Fmr1* no se une a NRF1, aumentando NRF1 libre y también la cantidad de proteína sinapsina 1. Por otra parte, al haber menos proteína FMRP, ya que no se une NRF1 al promotor de *Fmr1*, cabe esperar resultados similares a los presentes en los ratones *Fmr1*-KO, coincidiendo con nuestros datos sobre el aumento de la cantidad de p-CaMKII α , relacionada con la actividad de CaMKII α y en el aumento de la proteína sinapsina 1.

8. Lugar de actuación de la proteína sinapsina 1

Las sinapsinas tienen un papel importante en la regulación de las vesículas de reserva en el terminal sináptico, de tal manera que la supresión de las sinapsinas da lugar a cambios en el tamaño y en la movilización del conjunto de vesículas de reserva (Lonart y Simsek-

Duran, 2006). Una disminución de sinapsinas afectaría a las sinapsis tanto excitadoras como inhibitoras. El número de vesículas en los terminales presinápticos disminuye al eliminarse sinapsinas tanto en terminales excitadores como inhibidores, pero de distinta manera. En el caso de las sinapsis inhibitoras una disminución en la cantidad de sinapsinas disminuye una pequeña parte del pool de las vesículas de reserva que son las vesículas que van a ser liberadas rápidamente, las denominadas RRP (readily releasable pool). Este cambio en estas vesículas afecta a los impulsos rápidos. Por otra parte, se observó que una disminución de las sinapsinas en las sinapsis excitadoras produce una disminución en el pool de vesículas de reserva más distal que aún no están listas para ser liberadas, denominadas RP (reserve pool), afectando a los impulsos lentos (Gitler y cols., 2004).

La falta de sinapsinas altera el número de vesículas en los terminales presinápticos, pero la ausencia de sólo la sinapsina 1 no altera a las vesículas que van a ser rápidamente liberadas, por tanto existen dos pools de vesículas diferentes, uno dependiente de la sinapsina 1 y otro independiente de esta proteína. De este modo la sinapsina 1 actuaría en la parte más distal, afectando al pool de reserva que no va a ser liberado inmediatamente, a las cuales permanece unida, pero no al pool de vesículas de reserva que va a ser rápidamente liberadas (Li y cols., 1995).

En conclusión, sabemos que las sinapsinas actúan en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de distinto modo, de tal manera que en las glutamatérgicas actúa a nivel del pool de vesículas de reserva más distal y en las GABAérgicas a nivel sólo del pool de vesículas de reserva lista para liberarse. Hemos visto que sinapsina 1 afecta al número de vesículas del pool de reserva más distal que aún no están listas para ser liberadas, por tanto podemos sugerir, basándonos en estos estudios, que sinapsina 1 afecta principalmente a las neuronas glutamatérgicas, afectando a los impulsos lentos.

Se discute más adelante la función de la sinapsina 1 dentro de los terminales glutamatérgicos y como afectará un aumento de esta proteína en la liberación del neurotransmisor (ver apartado 11).

9. *Expresión de FMRP en ratones WT a partir de la segunda semana de vida*

Una vez realizado el estudio de CaMKII α y sinapsina 1, se analizó la proteína FMRP en estadios que comprendían ejemplares de P14, P18, P21 y adulto WT. Se analizaron estos estadios con el fin de encontrar una explicación a los resultados observados en los ejemplares de 21 días de edad.

Parece ser que los niveles de FMRP se reducen después de la segunda semana del parto en la corteza del ratón (Till y cols., 2012). Por tanto se estudió FMRP mediante Western Blot en el cerebro anterior de P14, P21 y adultos WT machos, con la intención de ver posibles diferencias significativas en la cantidad de FMRP en los distintos estadios. Los resultados nos sirvieron para discutir los resultados comparativos obtenidos para p-CaMKII α y sinapsina 1 en postnatales de 21 días de edad.

Como cabía esperar obtuvimos un descenso en la cantidad de FMRP en los P21 en relación a los P14, hecho que concuerda con estudios anteriores (Till y cols., 2012). La cantidad de FMRP cuantificada en P21 fue de aproximadamente la mitad encontrada en P14. Entre P21 y el adulto también se encontraron diferencias significativas, siendo los valores cuantificados para FMRP más del doble de los cuantificados para P21.

También se realizaron estudios de inmunohistoquímica, con la idea de encontrar diferencias cualitativas que apoyaran los resultados obtenidos por Western Blot. Se realizaron estudios en ratones WT a partir de P14 y fue en P18 donde se observó la menor inmunorreactividad para FMRP. Estos estudios inmunohistoquímicos apoyan los resultados del Western Blot para FMRP y ambos concuerdan con estudios previos (Till y cols., 2012).

Teniendo en cuenta nuestros resultados y los estudios previos (Till y cols., 2012)

sugerimos que a partir de la tercera semana de vida disminuye la cantidad de FMRP aumentándose a finales de la tercera semana después del parto, siendo los niveles más altos de la proteína FMRP los encontrados en el adulto.

10. Cambios fenotípicos a partir de la segunda semana del nacimiento

El transporte dendrítico de FMRP y del ARNm de *Fmr1* así como la traducción de FMRP en los terminales sinápticos pueden ser estimulados por la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo 1 (Weiler y cols., 1997; Antar y cols., 2004; Ferrari y cols., 2007). Por otra parte se ha demostrado que la ausencia de FMRP produce una desregulación de la síntesis de proteínas estimuladas por el grupo 1 de mGluRs (Weiler y cols., 2004; Muddashetty y cols., 2007) y que la ausencia de la traducción local de proteínas reguladas por FMRP en respuesta a la actividad sináptica puede conllevar al deterioro mental en el síndrome X-Frágil (Willemsen y cols., 2004; Penagarikano y cols., 2007).

El grupo 1 de mGluRs está formado por dos componentes mGluR1 y mGluR5. El primero se encuentra ampliamente distribuido por todo el sistema nervioso central (Shigemoto y cols., 1992), observándose mediante microscopía electrónica principalmente en elementos postsinápticos en la corteza cerebral (Ong y cols., 1998), hipocampo (Lujan y cols., 1996; Lujan y cols., 1997; Hanson y Smith, 1999), cuerpo estriado (Hanson y Smith, 1999), tálamo (Martin y cols., 1992; Godwin y cols., 1996; Liu y cols., 1998) e hipotálamo (Van den Pol y cols., 1994). El segundo componente, mGluR5, se expresa intensamente en regiones telencefálicas. Dentro de los receptores mGluR5 se encuentran las variantes de empalme alternativo mGluR5a y los mGluR5b, que se diferencian principalmente en que mGluR5b no está presente en la microglía (Biber y cols., 1999) y en su distribución temporal (Joly y cols., 1995; Romano y cols., 1996). La distribución espacial aparece en gran medida similar, pero mGluR1 se encuentra más abundantemente en el período postnatal, mientras que mGluR5 predomina en el estado adulto (Joly y cols., 1995; Romano y cols., 1996). A nivel de microscopía electrónica mGluR5 ha sido localizado en el soma y en dendritas en el hipocampo (Lujan y cols., 1996; Lujan y cols., 1997), tálamo (Liu y cols., 1998), hipotálamo

(Van den Pol y cols., 1994) y existen evidencias a microscópica óptica y electrónica donde se observa inmunorreactividad para mGluR5 en terminales presinápticos, lo que sugiere que el mGluR5 puede funcionar como un receptor presináptico (Romano y cols., 1995).

Numerosos estudios han demostrado una regulación diferencial de la expresión de mGluR1 y mGluR5 durante el desarrollo del SNC (Shigemoto y cols., 1992; Catania y cols., 1994; López-Bendito y cols., 2001; Turman y cols., 2001; Di Giorgi Gerevini y cols., 2004; Luján y cols., 2005). La activación o cambios en la expresión de mGluRs se ha relacionado con una variedad de eventos ontogenéticos importantes, tales como la migración neuronal y la formación de circuitos sinápticos (Nguyen y cols., 2001).

Se ha observado que los niveles de proteína mGluR1 aumentan progresivamente durante el desarrollo pre y postnatal (Shigemoto y cols., 1992; Catania y cols., 1994; Van den Pol y cols., 1994). Por el contrario mGluR5 aumenta en el periodo prenatal, tiene un pico en la segunda semana de vida y luego disminuye (Catania y cols., 1994; Romano y cols., 1996; López-Bendito y cols., 2001). Los cambios vienen dados por una disminución gradual a partir de la segunda semana de mGluR5a y un aumento progresivo de mGluR5b, predominando en la edad adulta (Minakami y cols., 1995; Romano y cols., 1996).

Sabemos que dos de las proteínas analizadas en nuestros estudios, sinapsina 1 y CaMKII α , están localizadas principalmente en los elementos presinápticos y, como se ha comentado, en esta zona predomina mGluR5. Teniendo en cuenta esto podemos plantear una posible respuesta al hecho de no encontrar diferencias entre los ejemplares WT y *Fmr1*-KO de 21 días de edad para estas dos proteínas.

En el caso de ratones *Fmr1*-KO, al no haber FMRP, habría una desregulación de los mGluRs, no variando la síntesis de proteínas al activarse estos receptores. Sin embargo a lo largo del desarrollo en los ratones WT sí habría diferencias en la síntesis de proteínas dependiendo de la actividad de los mGluRs.

Como sabemos, hay un aumento de mGluR5a hasta aproximadamente P14, cuando este receptor presenta su máximo y a partir de este momento disminuye, y es a partir de este periodo cuando comienza la expresión de mGluR5b y es cada vez mayor hasta la edad adulta donde presenta su máximo.

Por lo tanto en ratones WT planteamos la posibilidad de que en la tercera semana de vida, que abarca desde P15 a P21, la cantidad de mGluR5 sea mínima y por tanto la traducción de FMRP en los terminales sinápticos será muy baja, siendo tan baja que no encontraríamos diferencias en las proteínas estudiadas, ya que al disminuir FMRP habría menos inhibición sobre la traducción de CaMKII α y sinapsina 1, aumentando la cantidad de estas proteínas y como resultado no observaríamos diferencias significativas entre WT y *Fmr1*-KO.

Con la intención de ver si en la tercera semana postnatal había una disminución de la cantidad de proteína FMRP en ratones WT, se realizó un estudio mediante Western Blot comparando los ejemplares P14, P21 y adulto. Como resultado observamos una disminución en la cantidad de proteína FMRP en los P21 en comparación con los P14 y los adultos. Y también realizamos estudios inmunohistoquímicos a partir de P14 en ratones WT, observándose una disminución en la expresión de FMRP en los ejemplares dentro de la tercera semana de vida. En relación con nuestros resultados se observó que los niveles de expresión de FMRP en el desarrollo postnatal se redujeron a partir de los P14 (Till y cols., 2012).

Por tanto, uniendo los datos obtenidos en nuestros experimentos con las evidencias previas y el planteamiento expuesto sobre los receptores mGluR5, parece ser que en la tercera semana de vida de los ratones WT tiene lugar una serie de cambios que disminuiría la cantidad de FMRP asemejándose más a lo que ocurre en los ratones *Fmr1*-KO, lo que podría explicar que no se observen diferencias entre las proteínas estudiadas en los ejemplares P21.

Lo explicado hasta ahora concuerda con estudios previos realizados que relacionan a CaMKII α con FMRP. En los estudios realizados por Muddashetty y colaboradores no

encontraron diferencias en la cantidad de ARNm de CaMKII α en sinaptoneurosomas entre ratones WT y ratones *Fmr1*-KO (Muddashetty y cols., 2007). Esto puede ser explicado por el hecho de que sus experimentos fueron realizados en ejemplares de 21 día de edad, no observándose cambios significativos. Por el contrario, Zalfa y colaboradores sí encontraron diferencias en el ARNm de CaMKII α (Zalfa y cols., 2003), tanto en sinaptoneurosomas como en el resto del cerebro. Sus estudios fueron realizados en ejemplares de mayor edad, donde podríamos suponer que la cantidad de mGluR5 era máxima. También observaron diferencias en la cantidad de proteína CaMKII α entre ratones WT y *Fmr1*-KO adultos, pero sólo en aislados de sinaptoneurosomas (Zalfa y cols., 2003), en parte lógico ya que es aquí donde la traducción de FMRP es estimulada por la activación de los mGluRs en los ratones WT.

En conclusión, con la sugerencia expuesta no solo podríamos explicar los resultados obtenidos en nuestros estudios, sino que también podemos dar una explicación a la aparente contradicción existente entre los resultados publicados en otras investigaciones.

11. Relación entre las proteínas CaMKII α , sinapsina 1 y calbindina con la proteína FMRP y los receptores mGluR5 en los terminales presinápticos de ratones

WT

CaMKII α , sinapsina 1, FMRP, mGluR5 y calbindina realizan funciones en los terminales presinápticos esenciales para que la liberación del neurotransmisor tenga lugar en condiciones normales. Una serie de procesos tienen lugar en estos terminales que relacionan estas proteínas entre sí, teniendo como fin común la regulación en la concentración de calcio intracelular y como consecuencia que la transmisión de la señal sea la idónea. Todos estos acontecimientos quedan esquematizados en la figura 47 y serán explicados a continuación.

Cuando tiene lugar la despolarización de la membrana se activan los canales de calcio dependiente de voltaje, aumentando el flujo de calcio hacia el interior celular (Fig. 47/1). Un incremento del calcio intracelular provocará la unión del calcio a la calmodulina (CaM) formándose el complejo Ca²⁺/calmodulina y una vez formado este complejo tendría lugar la autofosforilación de la CaMKII α (Fig. 47/2). p-CaMKII α actúa sobre muchas proteínas,

siendo capaz de incrementar la cantidad de calcio citosólico desde reservas internas. p-CaMKII α también fosforila a la sinapsina 1 (Fig. 47/3) y a los canales de potasio (BK) (Fig. 47/4).

La sinapsina 1 se encuentra unida a las vesículas mediante el citoesqueleto de actina, formando un pool de vesículas de reserva (RP) (Fig. 47/5). Cuando la sinapsina 1 es fosforilada, ésta se libera de la actina quedando las vesículas listas para liberarse (RRP) (Fig. 47/6), donde pueden fusionarse con la membrana plasmática y liberar el contenido al exterior.

En los canales de potasio (BK) existe un lugar de unión para FMRP. FMRP interactúa con la subunidad beta 4 de estos canales limitando la amplitud del potencial de acción en función a la cantidad de calcio intracelular (Fig. 47/7).

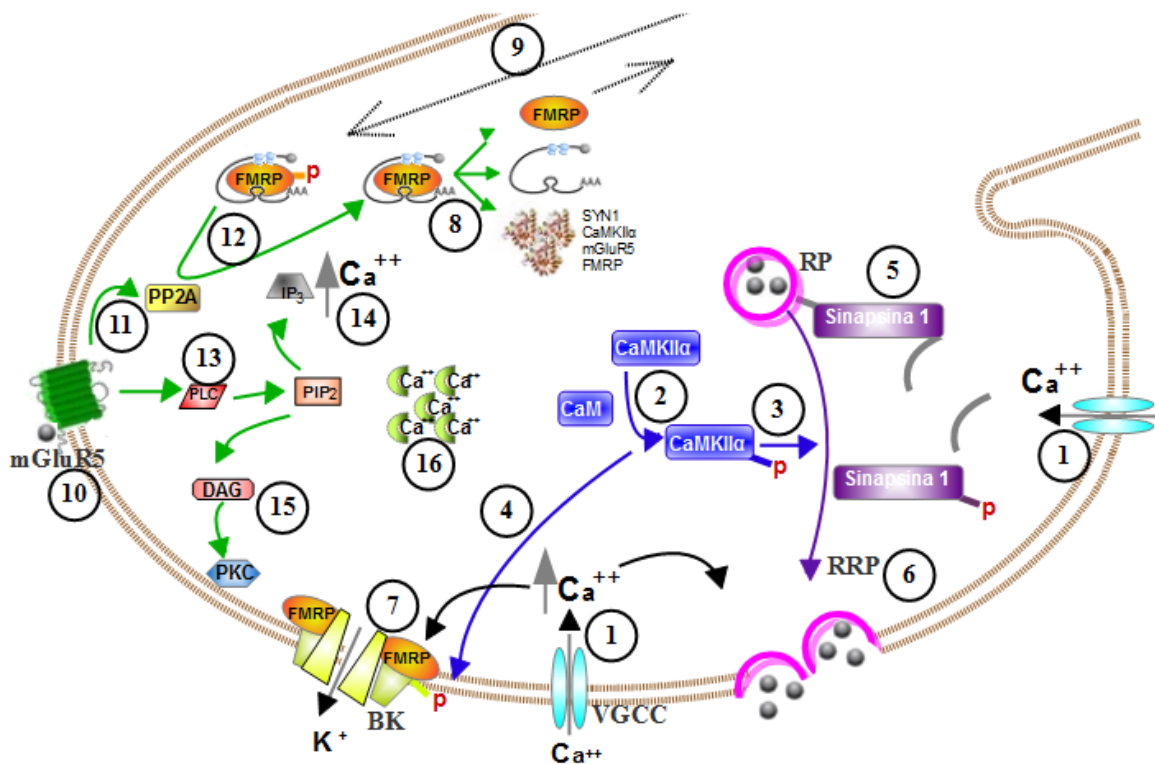


Figura 47. Esquema de un terminal presináptico donde se representan la funciones que llevan a cabo CaMKII α , SYN1, CB, FMRP y mGluR5 en condiciones normales. (1) Canales de calcio dependiente de voltaje, (2) Autofosforilación de CaMKII α , (3) Fosforilación de SYN1, (4) Fosforilación de los canales de potasio, (5) Vesículas de reserva unidas a SYN1, (6) Vesículas listas para ser liberadas, (7) Canales de potasio dependiente del calcio intracelular, (8) Síntesis proteica donde participa FMRP, (9) Transporte de FMRP mediante microtúbulos, (10) Receptores de glutamato mGluR5, (11) Activación de la fosfatasa PP2A, (12) Inactivación de FMRP, (13) Activación de PLC que hidroliza PIP₂ en IP₃ y DAG, (14) IP₃ promueve la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático, (15) DAG activa a PKC que fosforila a otras proteínas y (16) La CB se une al calcio amortiguando el incremento de calcio intracelular.

Por otra parte FMRP interviene dentro del terminal presináptico en la síntesis de un conjunto de proteínas, entre las que se encuentran sinapsina 1, CaMKII α , mGluR5 y FMRP (Fig. 47/8). FMRP se une al ARNm en el núcleo celular y una vez en el citosol es fosforilada, cuando se encuentra fosforilada se encuentra en su estado activo, inhibiendo la síntesis de proteínas. FMRP fosforilada unida a ARNm y ARNr es transportada mediante microtúbulos hasta el terminal presináptico (Fig. 47/9).

Los receptores de glutamato mGluR5 pertenecen al grupo 1 de los receptores metabotrópicos de glutamato y dentro de este grupo son los que se encuentran de forma mayoritaria en los terminales presinápticos. Estos son activados por la unión a glutamato (Fig. 47/10). Una vez activados, los receptores actúan sobre la fosfatasa PP2A (Fig. 47/11), encargada de inactivar a FMRP eliminándole el fosfato (Fig. 47/12), entre otras muchas más funciones, y sobre la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) (Fig. 47/13). IP₃ promueve la liberación de calcio del retículo endoplasmático mediante su interacción con receptores específicos de este orgánulo celular (Fig. 47/14). Por otra parte el (DAG), de forma sinérgica con el calcio activa a la PKC encargada de fosforilar a otras proteínas (Fig. 47/15), siendo esta quinasa de gran importancia en la regulación del crecimiento celular, en el aprendizaje y en la memoria entre otras funciones.

La primera fuente por la cual el calcio accede al citoplasma es a través de los canales de calcio y la segunda desde las reservas internas. Una vez en el citosol la difusión del calcio es muy baja, porque encuentra a su paso una gran cantidad de proteínas inmovilizadoras, como la calbindina, que lo atrapa con una alta afinidad (Fig. 47/16) ejerciendo un efecto amortiguador ante los incrementos de la concentración de calcio.

12. Posibles efectos de la ausencia de FMRP en los terminales presinápticos

En los ratones *Fmr1*-KO la ausencia de la proteína FMRP en los terminales presinápticos podría estar relacionada con un incremento en el calcio intracelular y como consecuencia una mayor liberación del neurotransmisor.

FMRP interactúa con los canales de potasio limitando la amplitud del potencial de acción dependiendo de la cantidad de calcio intracelular (Contractor, 2013; Deng y cols., 2013). Hay estudios realizados en el hipocampo y en neuronas piramidales de la corteza donde en ausencia de FMRP se observa una reducción de la actividad de los canales de potasio, aumentando la cantidad de calcio intracelular y como consecuencia tendría lugar una mayor liberación del neurotransmisor (Contractor, 2013; Deng y cols., 2013). Aunque este hecho sólo se haya descrito en zonas concretas del cerebro, podríamos sugerir que puede tener lugar en todo el cerebro de forma generalizada.

Por otra parte es sabido que FMRP interviene en la traducción de determinadas proteínas entre las que se encuentra CaMKII α , sinapsina 1 y mGluR5 (Darnell y cols., 2011), por tanto en ausencia de FMRP aumentaría la traducción de estas proteínas y como consecuencia indirecta tendría lugar un incremento de calcio intracelular y mayor liberación del neurotransmisor.

En el caso de los mGluR5, un incremento de estos receptores daría lugar a una mayor activación de éstos y como consecuencia final un aumento de IP₃ liberándose calcio desde el retículo endoplasmático al citosol.

Como hemos visto en nuestros estudios, una mayor traducción de CaMKII α y sinapsina 1 queda reflejada por un aumento de la actividad de CaMKII α (p-CaMKII α) y un aumento en la cantidad de proteína sinapsina 1. Por tanto cabe esperar que en ausencia de FMRP, al haber más p-CaMKII α capaz de fosforilar a sinapsina 1 y a la vez más cantidad de sinapsina 1, habrá mayor número de vesículas de reserva listas para ser liberadas y por tanto mayor liberación del neurotransmisor.

Otro dato que también contribuye a un aumento en el calcio intracelular está relacionado con la expresión de calbindina en células del tálamo dorsal. Hemos observado menor número de células CB-IR en ratones *Fmr1*-KO que en ratones WT en la mayoría de los núcleos del tálamo dorsal. Por tanto podemos decir que en determinadas zonas del cerebro, como en la mayoría del tálamo dorsal, y en parte del hipocampo según estudios publicados

con anterioridad en nuestro grupo de investigación (Real y cols., 2011), la ausencia de FMRP da lugar a una disminución de calbindina. Esta disminución de calbindina podría tener como consecuencia el aumento del calcio intracelular en el terminal presináptico, ya que la calbindina actúa uniéndose al calcio y su disminución no es compensada por otras proteínas que tamponan calcio como la calretinina o parvalbúmina.

En resumen los cambios principales observados en los terminales presinápticos en ausencia de FMRP son un incremento en el calcio intracelular y un aumento en la liberación del neurotransmisor, siendo mayor el incremento de calcio intracelular en aquellas zonas del cerebro donde la cantidad de calbindina se vea afectada por FMRP.

13. Consecuencias del incremento de p-CaMKII α y sinapsina 1 en los ratones *Fmr1-KO* a nivel presináptico a lo largo del desarrollo postnatal

Los más importantes hallazgos en este estudio a nivel presináptico encontrados son: un incremento en la cantidad de p-CaMKII α y en la cantidad de sinapsina 1 en los ratones *Fmr1-KO* adultos y un incremento de ambas proteínas en ejemplares postnatales *Fmr1-KO* a partir de P7.

En el apartado anterior hemos expuesto las posibles repercusiones en el terminal presináptico del incremento de ambas proteínas, dando como resultado final un incremento en la liberación del neurotransmisor glutamato, que en general dará lugar a una mayor excitabilidad, siendo el incremento de la excitabilidad uno de los efectos presentes en el síndrome X-Frágil.

En el desarrollo postnatal un desequilibrio en la liberación del neurotransmisor tendrá como consecuencia cambios importantes e irreversibles en el desarrollo del sistema nervioso.

La mayor expresión de sinapsina 1 a lo largo del desarrollo postnatal se correlaciona temporalmente y topográficamente con la sinaptogénesis, participando en la maduración

funcional de las sinapsis (De Camilli y cols., 1983; Bergman y cols., 1992; Lu y cols., 1992). Se ha establecido que entre P5 y P7 es cuando se dispara la sinaptogénesis en la corteza de ratón (Benítez-Díaz y cols., 2003) y a partir de P7 en el cerebro anterior de ratas (Aghajanian y Bloom, 1967). En nuestro estudio hemos encontrado cambios en los ratones *Fmr1*-KO a partir de P7, por lo que sugerimos que los incrementos en p-CaMKII α y sinapsina 1 observados en los ejemplares *Fmr1*-KO a partir de la segunda semana de vida van a tener consecuencias en la sinaptogénesis y por tanto sobre la formación de los correctos circuitos neuronales.

El ARNm de sinapsina 1 fue detectado en el hipocampo de ratas desde embriones E12 y es a finales de la primera semana del desarrollo postnatal cuando se incrementa drásticamente alcanzando niveles parecidos a los obtenidos en el adulto (Melloni, 1993). Sin embargo la expresión observada de la proteína sinapsina 1 en ratas recién nacidas es muy baja en comparación con la cantidad de ARNm presente (Melloni, 1993). Estos estudios sugieren que los altos niveles del ARNm de sinapsina 1 durante la neurogénesis prepara a las neuronas con suficiente ARNm para el comienzo de la sinaptogénesis, donde tendrá lugar la formación de numerosas sinapsis (Melloni, 1993).

Como expusimos anteriormente el aumento de la proteína sinapsina 1 parece deberse a mecanismos de regulación post-transcripcionales (Daly y Ziff, 1997) dentro de los cuales podría estar implicada FMRP. Todos los datos parecen coincidir en que es a finales de la primera semana de vida, coincidiendo con el comienzo de la sinaptogénesis, cuando hay un incremento en la proteína sinapsina 1 y es cuando comenzamos a ver alteraciones en la cantidad de esta proteína en los ratones *Fmr1*-KO. Es también a finales de la primera semana de vida cuando observamos diferencias en la cantidad de CaMKII α activa.

La inyección exógena de CaMKII da lugar a un aumento en la fosforilación de sinapsina 1, disminuyendo la afinidad de la sinapsina 1 con la vesículas sinápticas dando lugar a un incremento en la liberación del neurotransmisor (Llinas y cols., 1985). De forma contraria la inyección exógena de sinapsina 1 no fosforilada da lugar a una disminución en la liberación del neurotransmisor al unirse a las vesículas sinápticas impidiendo su liberación (Llinas y cols., 1985).

Nosotros sugerimos que CaMKII α y sinapsina 1 tienen un papel fundamental en la liberación del neurotransmisor en la sinaptogénesis entre otras posibles funciones.

Se ha demostrado en cultivos de neuronas de hipocampo que cuando las neuronas presinápticas se ponen en contacto con las neuronas postsinápticas tiene lugar una rápida translocación de sinapsina 1 a la zona de contacto (Fletcher y cols., 1991). Además los estudios realizados por Han y cols. demostraron que la sobreexpresión de las sinapsinas *in vitro* jugaba un papel importante en la sinaptogénesis formándose mayor número de sinapsis (Han y cols., 1991).

Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente y sabiendo que los ejemplares *Fmr1*-KO tienen niveles de sinapsina 1 y CaMKII α elevados durante el desarrollo postnatal sugerimos que las nuevas sinapsis que se están formando durante el periodo que dura la sinaptogénesis en los ratones *Fmr1*-KO podrían diferir en número de las sinapsis en formación en los ratones WT además de presentar alteraciones en la maduración de las mismas. Estos desequilibrios en la formación y maduración de las sinapsis podrían dar lugar a diferencias en la circuitería neuronal provocando algunas de las alteraciones presentes en el síndrome X-Frágil.

En el presente estudio hemos observado cambios en la cantidad de sinapsina 1 y CaMKII α de manera general en todo el cerebro anterior, por lo que el aumento encontrado en sinapsina 1 podría darse de manera general en todas las neuronas que la expresan o por el contrario el incremento de esta proteína en los ratones *Fmr1*-KO podría tener lugar solo en determinadas regiones afectando estas alteraciones a circuitos neuronales concretos. Son necesarios más estudios en este sentido, como los que realizamos actualmente en nuestro grupo de investigación, donde aislamos el hipocampo de ratón para el análisis cuantitativo de estas proteínas con la intención de comprobar si los circuitos hipocámpales en ratones *Fmr1*-KO podrían estar alterados desde el desarrollo postnatal.

En resumen, los datos presentados en esta tesis demuestran desequilibrios en la cantidad de dos proteínas claves en la sinaptogénesis (CaMKII α y sinapsina 1) en los ratones *Fmr1*-KO y sugerimos que estos desequilibrios pueden alterar las redes neuronales establecidas durante el desarrollo postnatal formando redes neuronales anormales que darán lugar a un funcionamiento anormal del sistema nervioso.

CONCLUSIONES



Conclusiones

[1. Hemos observado una reducción muy significativa de calbindina en el tálamo dorsal de ratones machos *Fmr1-KO* y sugerimos que esta reducción es una característica propia de las neuronas del tálamo dorsal de los núcleos intralaminares, de los núcleos de la línea media y de algunos núcleos del tálamo posterior de los ratones machos *Fmr1-KO*.

[2. Hemos encontrado diferencias cualitativas en la sintasa del óxido nítrico neuronal entre los ratones *Fmr1-KO* y WT, observándose menor inmunorreactividad para los ratones *Fmr1-KO* en un conjunto de fibras nNOS-IR localizadas en el hipocampo a nivel del giro dentado.

[3. En el estudio de las neuronas glutamatérgicas mediante los transportadores vesiculares tipo 1 y tipo 2 no se ha apreciado ninguna diferencia entre los ratones *Fmr1-KO* y WT, por lo que sugerimos que el transporte del glutamato al interior vesicular permanece inalterado en los ratones *Fmr1-KO*.

[4. Hemos observado un incremento significativo de la actividad de CaMKII α , medida por la cantidad de p-CaMKII α , de forma general en todo el cerebro anterior de los ratones *Fmr1-KO* desde los postnatales de 7 días hasta adulto, exceptuando los ejemplares P21.

[5. Se ha encontrado un aumento significativo en la cantidad de proteína sinapsina 1 en el cerebro anterior de los ratones *Fmr1-KO* desde postnatales P7 hasta adultos, con excepción de los postnatales P21 que no presentan diferencias significativas entre el genotipo *Fmr1-KO* y WT.

[6. Nuestros resultados indican que en la tercera semana de vida, coincidiendo con el estadio P21, tiene lugar una serie de cambios en los ratones WT que disminuiría la cantidad de FMRP asemejándose más a lo que ocurre en los ratones *Fmr1-KO*, lo que podría explicar la ausencia de diferencias en este estadio.

[7]. Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en este estudio, sugerimos que la ausencia de la proteína FMRP en los terminales presinápticos de los ratones *Fmr1*-KO podría estar relacionada con un incremento en el calcio intracelular y como consecuencia una mayor liberación del neurotransmisor, siendo este déficit más acusado en las regiones donde se observó una disminución de calbindina.

[8]. Con los resultados obtenidos en esta tesis sugerimos que los desequilibrios en la cantidad de p-CaMKII α y sinapsina 1 observados en los ejemplares *Fmr1*-KO a partir de la segunda semana de vida van a tener consecuencias en la sinaptogénesis y por tanto sobre la formación de unos correctos circuitos neuronales, y como consecuencia un funcionamiento anormal del sistema nervioso que podría explicar parte del fenotipo del síndrome X-Frágil.

BIBLIOGRAFÍA



Bibliografía

Abitbol M, Menini C, Delezoide AL, Rhyner T, Vekemans M, Mallet J. 1993. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat Genet.* 4:147-53.

Aghajanian GK, Bloom FE. 1967. The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res.* 6:716-27.

Airaksinen MS, Eilers J, Garaschuk O, Thoenen H, Konnerth A, Meyer M. 1997. Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:1488-93.

Akins MR, Berk-Rauch HE, Fallon JR. 2009. Presynaptic translation: stepping out of the postsynaptic shadow. *Front Neural Circuits.* 3:17.

Akins MR, Leblanc HF, Stackpole EE, Chyung E, Fallon JR. 2012. Systematic mapping of fragile X granules in the mouse brain reveals a potential role for presynaptic FMRP in sensorimotor functions. *J Comp Neurol.* 520:3687-706.

Amaral DG. 1979. Synaptic extensions from the mossy fibers of the fascia dentata. *Anat Embryol (Berl).* 155:241-51.

Amaral DG, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31:571-91.

Andressen C, Blümcke I, Celio MR. 1993. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.* 271:181-208.

Antar LN, Afroz R, Dichtenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ. 2004. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci.* 24:2648-55.

Antar LN, Li C, Zhang H, Carroll RC, Bassell GJ. 2006. Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol Cell Neurosci.* 32:37-48.

Arai R, Jacobowitz DM, Deura S. 1994. Distribution of calretinin, calbindin-D28k, and parvalbumin in the rat thalamus. *Brain Res Bull.* 33:595-614.

Arnold FJ, Hofmann F, Bengtson CP, Wittmann M, Vanhoutte P, Bading H. 2005. Microelectrode array recordings of cultured hippocampal networks reveal a simple model for transcription and protein synthesis-dependent plasticity. *J Physiol.* 564:3-19.

Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST. 1993. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science*. 262:563-6.

Bagni C, Greenough WT. 2005. From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci*. 6:376-87.

Bähler M, Greengard P. 1987. Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature*. 326:704-7.

Bailey A, Bolton P, Butler L, Le Couteur A, Murphy M, Scott S, Webb T, Rutter M. 1993. Prevalence of the fragile X anomaly amongst autistic twins and singletons. *J Child Psychol Psychiatry*. 34:673-88.

Bailey DB Jr, Hatton DD, Tassone F, Skinner M, Taylor AK. 2001. Variability in FMRP and early development in males with fragile X syndrome. *Am J Ment Retard*. 106:16-27.

Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. 1992. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci*. 15:303-8.

Bakker CE, De Diego Otero Y, Bontekoe C, Raghoe P, Luteijn T, Hoogeveen AT, Oostra BA, Willemsen R. 2000. Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Exp Cell Res*. 258:162-70.

Bakker CE, Oostra BA. 2003. Understanding fragile X syndrome: insights from animal models. *Cytogenet Genome Res*. 100:111-23.

Bakker CE, Verheij C, Willemsen R, Van Der Helm R, Oerlemans F, Vermey M y cols. 1994. Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental. *Behavioural Brain Research* 139:197-213.

Bardoni B, Schenck A, Mandel JL. 2001. The Fragile X mental retardation protein. *Brain Res Bull*. 56:375-82.

Bassell GJ, Warren ST. 2008. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron*. 60:201-14.

Bat O, Kimmel M, Axelrod DE. 1997. Computer simulation of expansions of DNA triplet repeats in the fragile X syndrome and Huntington's disease. *J Theor Biol*. 188:53-67.

Battaglia G, Colacitti C, Bentivoglio M. 1992. The relationship of calbindin-containing neurons with substance P, Leu-enkephalin and cholecystokinin fibres: an immunohistochemical study in the rat thalamus. *J Chem Neuroanat*. 5:453-464.

Bayer KU, Löhler J, Schulman H, Harbers K. 1999. Developmental expression of the CaM kinase II isoforms: ubiquitous gamma- and delta-CaM kinase II are the early isoforms and most abundant in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 70:147-54.

Beasley CL, Reynolds GP. 1997. Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Schizophr Res.* 24:349-55.

Bellocchio EE, Hu H, Pohorille A, Chan J, Pickel VM, Edwards RH. 1998. The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci.* 18:8648-59.

Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT Jr, Edwards RH. 2000. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science.* 289:957-60.

Benes FM, Berretta S. 2001. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 25:1-27.

Benfenati F, Valtorta F, Chierigatti E, Greengard P. 1992. Interaction of free and synaptic vesicle-bound synapsin I with F-actin. *Neuron.* 8:377-86.

Benítez-Díaz P, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Peña-Contreras Z, Palacios-Prü E. 2003. Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex. *Dev Neurosci.* 25:366-74.

Bennett MK, Kennedy MB. 1987. Deduced primary structure of the beta subunit of brain type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase determined by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:1794-8.

Bergman H, Browning M, Granholm AC. 1992. Development of synapsin I and synapsin II in intraocular hippocampal transplants. *Hippocampus.* 2:339-47.

Biber K, Laurie DJ, Berthele A, Sommer B, Tölle TR, Gebicke-Härter PJ y cols. 1999. Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia. *J Neurochem.* 72:1671-80.

Bixby JL, Reichardt LF. 1985. The expression and localization of synaptic vesicle antigens at neuromuscular junctions in vitro. *J Neurosci.* 5:3070-80.

Blackstad TW, Kjaerheim A. 1961. Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol.* 117:133-59.

Braun K. 1990. Calcium-binding proteins in avian and mammalian central nervous system: localization, development and possible functions. *Prog Histochem Cytochem.* 21:1-64.

Braun K, Segal M. 2000. FMRP involvement in formation of synapses among cultured hippocampal neurons. *Cereb Cortex.* 10:1045-52.

Braun AP, Schulman H. 1995. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 57:417-45.

Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP. 2005. FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum Genet.* 117:376-82.

Brouwer JR, Mientjes EJ, Bakker CE, Nieuwenhuizen IM, Severijnen LA, Van der Linde HC y cols. 2007. Elevated Fmr1 mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation. *Exp Cell Res.* 313:244-53.

Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA y cols. 2001. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell.* 107:477-87.

Brown MR, Kronengold J, Gazula VR, Chen Y, Strumbos JG, Sigworth FJ y cols. 2010. Fragile X mental retardation protein controls gating of the sodium-activated potassium channel Slack. *Nat Neurosci.* 13:819-21.

Brüning G. 1993. NADPH-diaphorase histochemistry in the postnatal mouse cerebellum suggests specific developmental functions for nitric oxide. *J Neurosci Res.* 36:580-7.

Catania MV, Landwehrmeyer GB, Testa CM, Standaert DG, Penney JB Jr, Young AB. 1994. Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neuroscience.* 61:481-95.

Celio MR. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience.* 35:375-475.

Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. 2010. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol.* 91:313-48.

Chicurel ME1, Harris KM. 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 325:169-82.

Chin LS, Li L, Ferreira A, Kosik KS, Greengard P. 1995. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9230-4.

Chiurazzi P, Pomponi MG, Pietrobono R, Bakker CE, Neri G, Oostra BA. 1999. Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet.* 8:2317-23.

Chiurazzi P, Pomponi MG, Willemsen R, Oostra BA, Neri G. 1998. In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 7:109-13.

Choi DW. 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 11:465-9.

Christie SB, Akins MR, Schwob JE, Fallon JR. 2009. The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits. *J Neurosci.* 29:1514-24.

Chudley AE, Hagerman RJ. 1987. Fragile X syndrome. *J Pediatr.* 110:821-31.

Coffee B, Zhang F, Warren ST, Reines D. 1999. Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat Genet.* 22:98-101.

Colbran RJ. 1992. Regulation and role of brain calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochem Int.* 21:469-97.

Contractor A. 2013. Broadening roles for FMRP: big news for big potassium (BK) channels. *Neuron.* 77:601-3.

Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. 1997. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5401-4.

Consogno E, Tiraboschi E, Iuliano E, Gennarelli M, Racagni G, Popoli M. 2001. Long-term treatment with S-adenosylmethionine induces changes in presynaptic CaM kinase II and synapsin I. *Biol Psychiatry.* 50:337-44.

Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW. 1997. The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet.* 6:1465-72.

Cornish K, Scerif G, Karmiloff-Smith A. 2007. Tracing syndrome-specific trajectories of attention across the lifespan. *Cortex.* 43:672-85.

Cornish K, Sudhalter V, Turk J. 2004. Attention and language in fragile X. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 10:11-6.

Cornish K, Turk J, Hagerman R. 2008. The fragile X continuum: new advances and perspectives. *J Intellect Disabil* 52:469-82.

Costa L, Spatuzza M, D'Antoni S, Bonaccorso CM, Trovato C, Musumeci SA y cols.. 2012. Activation of 5-HT7 serotonin receptors reverses metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic plasticity in wild-type and Fmr1 knockout mice, a model of Fragile X syndrome. *Biol Psychiatry.* 72:924-33.

Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL. 2001. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med.* 3:359-71.

Crawford DC, Zhang F, Wilson B, Warren ST, Sherman SL. 2000. Fragile X CGG repeat structures among African-Americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability. *Hum Mol Genet.* 9:1759-69.

Crusio WE, Schwegler H. 1987. Hippocampal mossy fiber distribution covaries with open-field habituation in the mouse. *Behav Brain Res.* 26:153-8.

Cruz-Martín A, Crespo M, Portera-Cailliau C. 2012. Glutamate induces the elongation of early dendritic protrusions via mGluRs in wild type mice, but not in fragile X mice. *PLoS One.* 7:32446.

Curtis AR, Headland S, Lindsay S, Thomas NS, Boye E, Kamakari S y cols. 1993. X chromosome linkage studies in familial Rett syndrome. *Hum Genet.* 90:551-5.

Czernik AJ, Pang DT, Greengard P. 1987. Amino acid sequences surrounding the cAMP-dependent and calcium/calmodulin-dependent phosphorylation sites in rat and bovine synapsin I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:7518-22.

Daniels RW, Miller BR, DiAntonio A. 2011. Increased vesicular glutamate transporter expression causes excitotoxic neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 41:415-20.

Daly C, Ziff EB. 1997. Post-transcriptional regulation of synaptic vesicle protein expression and the developmental control of synaptic vesicle formation. *J Neurosci.* 17:2365-75.

Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD, Darnell RB. 2011. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell.* 146:247-61.

Darnell JC, Klann E. 2013. The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat Neurosci.* 16:1530-6.

Dávila JC, de la Calle A, Gutiérrez A, Megías M, Andreu MJ, Guirado S. 1991. Distribution of neuropeptide Y (NPY) in the cerebral cortex of the lizards *Psammodromus algirus* and *podarcis hispanica*: co-localization of NPY, somatostatin, and GABA. *J Comp Neurol.* 308:397-408.

Dávila JC, Megías M, Andreu MJ, Real MA, Guirado S. 1995. NADPH diaphorase-positive neurons in the lizard hippocampus: a distinct subpopulation of GABAergic interneurons. *Hippocampus.* 5:60-70.

Dávila JC, Megías M, de la Calle A, Guirado S. 1993. Subpopulations of GABA neurons containing somatostatin, neuropeptide Y, and parvalbumin in the dorsomedial cortex of the lizard *Psammodromus algirus*. *J Comp Neurol.* 336:161-73.

Dávila JC, Padial J, Andreu MJ, Real MA, Guirado S. 1997. Calretinin immunoreactivity in the cerebral cortex of the lizard *Psammodromus algirus*: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 82:382-93.

Dávila JC, Real MA, Olmos L, Legaz I, Medina L, Guirado S. 2005. Embryonic and postnatal development of GABA, calbindin, calretinin, and parvalbumin in the mouse claustral complex. *J Comp Neurol.* 481:42-57.

De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B y cols. 1993. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet.* 3:31-5.

De Camilli P, Harris SM Jr, Huttner WB, Greengard P. 1983. Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. *J Cell Biol.* 96:1355-73.

De Diego Y, Bakker CE, Raghoe P, Severijnen LA y cols. 2000. Immunocytochemical characterization of FMRP, FXR1 and FMR2P during embryonic development in the mouse. *Gene Funct Dis.* 1:28-37.

DeGennaro LJ, Kanazir SD, Wallace WC, Lewis RM, Greengard P. 1983. Neuron-specific phosphoproteins as models for neuronal gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 48:337-45.

Deelen W, Bakker C, Halley DJ, Oostra BA. 1994. Conservation of CGG region in FMR1 gene in mammals. *Am J Med Genet.* 51:513-6.

DeFelipe J. 1999. Chandelier cells and epilepsy. *Brain.* 122:1807-22.

Deller T. 1998. The anatomical organization of the rat fascia dentata: new aspects of laminar organization as revealed by anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-Luecoagglutinin (PHAL). *Anat Embryol (Berl).* 197:89-103.

Deng PY, Rotman Z, Blundon JA, Cho Y, Cui J, Cavalli V, Zakharenko SS, Klyachko VA. 2013. FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels. *Neuron.* 77:696-711.

Deng PY, Sojka D, Klyachko VA. 2011. Abnormal presynaptic short-term plasticity and information processing in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci.* 31:10971-82.

Deshpande JK, Siesjö BK, Wieloch T. 1987. Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 7:89-95.

De Vries BB, Halley DJ, Oostra BA, Niermeijer MF. 1998. The fragile X syndrome. *J Med Genet.* 35:579-89.

De Vries BB, Jansen CC, Duits AA, Verheij C, Willemsen R, van Hemel JO, van den Ouweland AM, Niermeijer MF, Oostra BA, Halley DJ. 1996. Variable FMR1 gene methylation of large expansions leads to variable phenotype in three males from one fragile X family. *J Med Genet.* 33:1007-10.

Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. 1993. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet.* 4:335-40.

D'Hooge R, Nagels G, Franck F, Bakker CE, Reyniers E, Storm K y cols. 1997. Mildly impaired water maze performance in male Fmr1 knockout mice. *Neuroscience.* 76:367-76.

Di Giorgi Gerevini VD, Caruso A, Cappuccio I, Ricci Vitiani L, Romeo S y cols. 2004. The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 150:17-22.

Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. 1994. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:4214-8.

Dobkin C, Rabe A, Dumas R, El Idrissi A, Haubstock H, Brown WT. 2000. Fmr1 knockout mouse has a distinctive strain-specific learning impairment. *Neuroscience.* 100:423-9.

Dobson T, Kube E, Timmerman S, Krushel LA. 2008. Identifying intrinsic and extrinsic determinants that regulate internal initiation of translation mediated by the FMR1 5' leader. *BMC Mol Biol.* 9:89.

Durán M, Molina M, Fernández J, Martínez T, López MA, Alvarez AI, Onaindía ML, Tejada MI. 2001. Molecular diagnosis of fragile X syndrome with polymerase chain reaction: application of a diagnostic protocol in 50 families from northern Spain. *An Esp Pediatr.* 54:331-9.

Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, Batterton MN y cols. 2010. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron.* 65(3):373-84.

Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. 1994. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet.* 3:684-5.

El Idrissi A, Ding XH, Scalia J, Trenkner E, Brown WT, Dobkin C. 2005. Decreased GABA(A) receptor expression in the seizure-prone fragile X mouse. *Neurosci Lett.* 377:141-6.

Enderlin S, Norman AW, Celio MR. 1987. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl).* 177:15-28.

Erster SH, Brown WT, Goonewardena P, Dobkin CS, Jenkins EC, Pergolizzi RG. 1992. Polymerase chain reaction analysis of fragile X mutations. *Hum Genet.* 90:55-61.

Etholm L, Bahonjic E, Heggelund P. 2013. Sensitive and critical periods in the development of handling induced seizures in mice lacking synapsins: differences between synapsin I and synapsin II knockouts. *Exp Neurol.* 247:59-65.

Fähling M, Mrowka R, Steege A, Kirschner KM, Benko E, Förstera B y cols. 2009. Translational regulation of the human achaete-scute homologue-1 by fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem.* 284:4255-66.

Farber JL. 1981. The role of calcium in cell death. *Life Sci. Hum Mol Genet.* 2011. 20:2297-307.

Fassio A, Patry L, Congia S, Onofri F, Piton A, Gauthier J y cols. 2011. SYN1 loss-of-function mutations in autism and partial epilepsy cause impaired synaptic function. *Hum Mol Genet.* 20:2297-307.

Feng Y, Lakkis L, Devys D, Warren ST. 1995. Quantitative comparison of FMR1 gene expression in normal and premutation alleles. *Am J Hum Genet.* 56:106-13.

Ferlini A, Ansaloni L, Nobile C, Forabosco A. 1990. Molecular analysis of the Rett syndrome using cDNA synapsin I as a probe. *Brain Dev.* 12:136-9.

Ferrari F, Mercaldo V, Piccoli G, Sala C, Cannata S, Achsel T, Bagni C. 2007. The fragile X mental retardation protein-RNP granules show an mGluR-dependent localization in the post-synaptic spines. *Mol Cell Neurosci.* 34:343-54.

Ferreira A, Kao HT, Feng J, Rapoport M, Greengard P. 2000. Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation. *J Neurosci.* 20:3736-44.

Fite RW. 2000. Animal health risk assessment in theory and practice. *J Am Vet Med Assoc.* 217:1837-42.

Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G. 1991. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci.* 11:1617-26.

Fong YL, Taylor WL, Means AR, Soderling TR. 1989. Studies of the regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Mutation of threonine 286 to alanine and aspartate. *J Biol Chem.* 264:16759-63.

Franklin KBJ, Paxinos G. 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd Edn San Diego, Elsevier Academic Press.

Frassoni C, Bentivoglio M, Spreafico R, Sánchez MP, Puelles L, Fairen A. 1991. Postnatal development of calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the thalamus of the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 58:243-24.

Freneau RT Jr, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J y cols. 2002. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14488-93.

Freneau RT, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ y cols 2001. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron.* 31:247-60.

Freund TF, Buzsáki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6:347-470.

Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T. 2001. Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 435:379-87.

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S y cols. 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 67:1047-58.

Gabbott PL, Bacon SJ. 1995. Co-localisation of NADPH diaphorase activity and GABA immunoreactivity in local circuit neurones in the medial prefrontal cortex (mPFC) of the rat. *Brain Res.* 699:321-8.

Gálvez R, Smith RL, Greenough WT. 2005. Olfactory bulb mitral cell dendritic pruning abnormalities in a mouse model of the Fragile-X mental retardation syndrome: further support for FMRP's involvement in dendritic development. *Brain Res Dev Brain Res.* 157:214-6.

Garcia CC, Blair HJ, Seager M, Coulthard A, Tennant S, Buddles M, Curtis A, Goodship JA. 2004. Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J Med Genet.* 41:183-6.

Garcia del Moral R, Gomez-Morales M, Cortes V, Aguayo ML, Gigosos RL, Lardelli P, Navas A, Aneiros J, Aguilar D. 1993. Mononuclear cell subsets in IgM mesangial proliferative glomerulonephritis. A comparative study with minimal change nephrotic syndrome and immunonegative mesangial proliferative glomerulonephritis. *Nephron.* 65:215-21.

Gibson JR, Bartley AF, Hays SA, Huber KM. 2008. Imbalance of neocortical excitation and inhibition and altered UP states reflect network hyperexcitability in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol.* 100:2615-26.

Giráldez-Pérez RM, Avila MN, Feijóo-Cuaresma M, Heredia R, De Diego-Otero Y, Real MÁ, Guirado S. 2013. Males but not females show differences in calbindin immunoreactivity in the dorsal thalamus of the mouse model of fragile X syndrome. *J Comp Neurol.* 521:894-911.

Gitler D, Takagishi Y, Feng J, Ren Y, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Greengard P, Augustine GJ. 2004. Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci.* 24:11368-80.

Godwin DW, Horn SC van, Eriir A, Sesma M, Romano C, Sherman SM. 1996. Ultrastructural localization suggests that retinal and cortical inputs access different metabotropic glutamate receptors in the lateral geniculate nucleus. *J Neurosci.* 16:8181-92.

Gonzalo-Ruiz A, Lieberman AR. 1995. GABAergic projections from the thalamic reticular nucleus to the anteroventral and anterodorsal thalamic nuclei of the rat. *J Chem Neuroanat.* 9:165-74.

Greco B, Managò F, Tucci V, Kao HT, Valtorta F, Benfenati F. 2013. Autism-related behavioral abnormalities in synapsin knockout mice. *Behav Brain Res.* 251:65-74.

Greengard P1, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. 1993. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science.* 259:780-5.

Griffith LC. 2008. CaMKII: new tricks for an old dog. *Cell.* 133:397-9.

Gross C, Nakamoto M, Yao X, Chan CB, Yim SY, Ye K, Warren ST, Bassell GJ. 2010. Excess phosphoinositide 3-kinase subunit synthesis and activity as a novel therapeutic target in fragile X syndrome. *J Neurosci.* 30:10624-38.

Grossman AW, Elisseou NM, McKinney BC, Greenough WT. 2006. Hippocampal pyramidal cells in adult *Fmr1* knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res.* 1084:158-64.

Guentchev M, Hainfellner JA, Trabattoni GR, Budka H. 1997. Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56:1119-24.

Guirado S, Real MA, Dávila JC. 2008. Distinct immunohistochemically defined areas in the medial amygdala in the developing and adult mouse. *Brain Res Bull.* 75:214-7.

Guirado S, Real MA, Olmos JL, Dávila JC. 2003. Distinct types of nitric oxide-producing neurons in the developing and adult mouse claustrum. *J Comp Neurol.* 465:431-44.

Gulyás AI, Tóth K, Dános P, Freund TF. 1991. Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 312:371-8.

Gundersen HJ. 1986. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc.* 143:3-45.

Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A y cols. 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 96:857-81.

Haas CA, DeGennaro LJ. 1988. Multiple synapsin I messenger RNAs are differentially regulated during neuronal development. *J Cell Biol.*106:195-203.

Hagerman PJ, Hagerman RJ. 2007. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome an older face of the fragile X gene. *Nat Clin Pract Neurol.* 3:107-12.

Hagerman RJ, Hull CE, Safanda JF, Carpenter I, Staley LW, O'Connor RA y cols. 1994. High functioning fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded FMR-1 mutation associated with protein expression. *Am J Med Genet.* 51:298-308.

Hagerman RJ, Leavitt BR, Farzin F, Jacquemont S, Greco CM, Brunberg JA y cols. 2004. Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. *Am J Hum Genet.* 74:1051-6.

Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J y cols. 2001. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology.* 57:127-30.

Han HQ, Nichols RA, Rubin MR, Bähler M, Greengard P. 1991. Induction of formation of presynaptic terminals in neuroblastoma cells by synapsin Iib. *Nature.* 349:697-700.

Hanson PI, Kapiloff MS, Lou LL, Rosenfeld MG, Schulman H. 1989. Expression of a multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation. *Neuron.* 3:59-70.

Hanson PI, Schulman H. 1992a. Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 267:17216-24.

Hanson PI, Schulman H. 1992b. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Annu Rev Biochem.* 61:559-601.

Hanson JE, Smith Y. 1999. Group I metabotropic glutamate receptors at GABAergic synapses in monkeys. *J Neurosci.* 19:6488-96.

Harlow EG, Till SM, Russell TA, Wijetunge LS, Kind P, Contractor A. 2010. Critical period plasticity is disrupted in the barrel cortex of FMR1 knockout mice. *Neuron.* 65:385-98.

Harrison CJ, Jack EM, Allen TD, Harris R. 1983. The fragile X: a scanning electron microscope study. *J Med Genet.* 20:280-5.

Hayakawa Y, Nakajima T, Takagi M, Fukuhara N, Abe H. 2002. Human cerebellar activation in relation to saccadic eye movements: a functional magnetic resonance imaging study. *Ophthalmologica.* 216:399-405.

Hayashi M, Yamada H, Uehara S, Morimoto R, Muroyama A, Yatsushiro S y cols. 2003. Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 278:1966-74.

He X, Yang F, Xie Z, Lu B. 2000. Intracellular Ca(2+) and Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3. *J Cell Biol.* 149:783-92.

Heizmann CW, Braun K. 1992. Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 15:259-64.

Hendrickson AE, Van Brederode JF, Mulligan KA, Celio MR. 1991. Development of the calcium-binding protein parvalbumin and calbindin in monkey striate cortex. *J Comp Neurol.* 307:626-46.

Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. 2001. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci.* 21:181.

Herzog E, Takamori S, Jahn R, Brose N, Wojcik SM. 2006. Synaptic and vesicular colocalization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J Neurochem.* 99:1011-8.

Hessl D, Rivera SM, Reiss AL. 2004. The neuroanatomy and neuroendocrinology of fragile X syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 10:17-24.

Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M. 1993. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet.* 3:36-43.

Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD. 1991. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 41:289-94.

Hoogeveen AT, Oostra BA. 1997. The fragile X syndrome. *J Inherit Metab Dis.* 20:139-51.

Howard V, Reed M. 1998. *Unbiased Stereology: Three-dimensional Measurement in Microscopy.*

Huang CM, Burkard R. 1986. Frequency sensitivities of auditory neurons in the cerebellum of the cat. *Brain Res.* 371:101-8.

Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. 2002. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7746-50.

Hudmon A, Kim SA, Kolb SJ, Stoops JK, Waxham MN. 2001. Light scattering and transmission electron microscopy studies reveal a mechanism for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II self-association. *J Neurochem.* 76:1364-75.

Huttner WB, DeGennaro LJ, Greengard P. 1981. Differential phosphorylation of multiple sites in purified protein I by cyclic AMP-dependent and calcium-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 256:1482-8.

Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P. 1983. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol.* 96:1374-88.

Irwin SA, Galvez R, Greenough WT. 2000. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb Cortex.* 10:1038-44.

Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP y cols. 2001. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet.* 98:161-7.

Ishida A, Kitani T, Fujisawa H. 1996. Evidence that autophosphorylation at Thr-286/Thr-287 is required for full activation of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochim Biophys Acta.* 1311:211-7.

Ivanco TL, Greenough WT. 2002. Altered mossy fiber distributions in adult *Fmr1* (FVB) knockout mice. *Hippocampus.* 12:47-54.

Jäkälä P, Hänninen T, Ryyänen M, Laakso M, Partanen K, Mannermaa A, Soininen H. 1997. Fragile-X: neuropsychological test performance, CGG triplet repeat lengths, and hippocampal volumes. *J Clin Invest.* 100:331-8.

Jancsó G, Karcsú S, Király E, Szebeni A, Tóth L, Bácsy E, Joó F, Párducz A. 1984. Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res.* 295:211-6.

Jin I, Hawkins RD. 2003. Presynaptic and postsynaptic mechanisms of a novel form of homosynaptic potentiation at aplysia sensory-motor neuron synapses. *J Neurosci.* 23:7288-97.

Jin P, Warren ST. 2000. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 9:901-8.

Joly C, Gomeza J, Brabet I, Curry K, Bockaert J, Pin JP. 1995. Molecular, functional, and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1. *J Neurosci.* 15:3970-81.

Kaneko T, Fujiyama F. 2002. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res.* 42:243-50.

Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H. 2002. Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J Comp Neurol.* 444:39-62.

Karls U, Müller U, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Harbers K. 1992. Structure, expression, and chromosome location of the gene for the beta subunit of brain-specific Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II identified by transgene integration in an embryonic lethal mouse mutant. *Mol Cell Biol.* 12:3644-52.

Kashani A, Betancur C, Giros B, Hirsch E, El Mestikawy S. 2007. Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease. *Neurobiol Aging.* 28:568-78.

Kates WR, Abrams MT, Kaufmann WE, Breiter SN, Reiss AL. 1997. Reliability and validity of MRI measurement of the amygdala and hippocampus in children with fragile X syndrome. *Psychiatry Res.* 75:31-48.

Kau AS, Meyer WA, Kaufmann WE. 2002. Early development in males with Fragile X syndrome: a review of the literature. *Microsc Res Tech.* 57:174-8.

Kelleher RJ, Bear MF. 2008. The autistic neuron: troubled translation? *Cell.* 135:401-6.

Kemppainen S, Pitkänen A. 2000. Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. *J Comp Neurol.* 426:441-67.

Kennedy MB, McGuinness T, Greengard P. 1983. A calcium/calmodulin-dependent protein kinase from mammalian brain that phosphorylates Synapsin I: partial purification and characterization. *J Neurosci.* 3:818-31.

Keuker JI, Vollmann-Honsdorf GK, Fuchs E. 2001. How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain Res Brain Res Protoc.* 7:211-21.

Klemmer P, Meredith RM, Holmgren CD, Klychnikov OI, Stahl-Zeng J, Loos M y cols. 2011. Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype. *J Biol Chem.* 286:25495-504.

Kluger G, Böhm I, Laub MC, Waldenmaier C. 1996. Epilepsy and fragile X gene mutations. *Pediatr Neurol.* 15:358-60.

Kolehmainen K. 1994. Population genetics of fragile X: a multiple allele model with variable risk of CGG repeat expansion. *Am J Med Genet.* 51:428-35.

Kolodziej SJ, Hudmon A, Waxham MN, Stoops JK. 2000. Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase II alpha and truncated CaM kinase II alpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains. *J Biol Chem.* 275:14354-9.

Komuro H, Rakic P. 1996. Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron.* 17:275-85.

Kooy RF, D'Hooge R, Reyniers E, Bakker CE, Nagels G, De Boulle K y cols. 1996. Transgenic mouse model for the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 64:241-5.

Kooy RF, Reyniers E, Verhoye M, Sijbers J, Bakker CE, Oostra BA, Willems PJ, Van Der Linden A. 1999. Neuroanatomy of the fragile X knockout mouse brain studied using in vivo high resolution magnetic resonance imaging. *Eur J Hum Genet.* 7:526-32.

Kooy RF, Willemsen R, Oostra BA. 2000. Fragile X syndrome at the turn of the century. *Mol Med Today.* 6:193-8.

Kunst CB, Warren ST. 1994. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell.* 77:853-61.

Kunst CB, Zerylnick C, Karickhoff L, Eichler E, Bullard J, Chalifoux M y cols. 1996. FMR1 in global populations. *Am J Hum Genet.* 58:513-22.

Legáz I, Olmos L, Real MA, Guirado S, Dávila JC, Medina L. 2005. Development of neurons and fibers containing calcium binding proteins in the pallial amygdala of mouse, with special emphasis on those of the basolateral amygdalar complex. *J Comp Neurol.* 488:492-513.

Leuba G, Kraftsik R, Saini K. 1998. Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases. *Exp Neurol.* 152:278-91.

Levenga J, de Vrij FM, Buijsen RA, Li T, Nieuwenhuizen IM, Pop A, Oostra BA, Willemsen R. 2011. Subregion-specific dendritic spine abnormalities in the hippocampus of *Fmr1* KO mice. *Neurobiol Learn Mem.* 95:467-72.

Levitt P, Eagleson KL, Powell EM. 2004. Regulation of neocortical interneuron development and the implications for neurodevelopmental disorders. *Trends Neurosci.* 27:400-6.

Levitt P, Rakic P, De Camilli P, Greengard P. 1984. Emergence of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase immunoreactivity in developing rhesus monkey cerebellum: correlative immunocytochemical and electron microscopic analysis. *J Neurosci.* 4:2553-64.

Li L, Chin LS, Shupliakov O, Brodin L, Sihra TS, Hvalby O y cols. 1995. Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9235-9.

Li Y, Zhao X. 2014. Concise review: Fragile X proteins in stem cell maintenance and differentiation. *Stem Cells.* 32:1724-33.

Liao L, Park SK, Xu T, Vanderklish P, Yates JR. 2008. Quantitative proteomic analysis of primary neurons reveals diverse changes in synaptic protein content in *fmr1* knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:15281-6.

Lin CR, Kapiloff MS, Durgerian S, Tatemoto K, Russo AF, Hanson P, Schulman H, Rosenfeld MG. 1987. Molecular cloning of a brain-specific calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:5962-6.

Liu XB, Munoz A, Jones EG. 1998. Changes in subcellular localization of metabotropic glutamate receptor subtypes during postnatal development of mouse thalamus. *J Comp Neurol.* 395:450-465.

Llinás R1, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P. 1991. Regulation by synapsin I and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II of the transmitter release in squid giant synapse. *J Physiol.* 436:257-82.

Llinás R, McGuinness TL, Leonard CS, Sugimori M, Greengard P. 1985. Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:3035-9.

Lohmann SM, Ueda T, Greengard P. 1978. Ontogeny of synaptic phosphoproteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:4037-41.

Lohith TG, Osterweil EK, Fujita M, Jenko KJ, Bear MF, Innis RB. 2013. Is metabotropic glutamate receptor 5 upregulated in prefrontal cortex in fragile X syndrome? *Mol Autism.* 4:15.

Lonart G, Simsek-Duran F. 2006. Deletion of synapsins I and II genes alters the size of vesicular pools and rabphilin phosphorylation. *Brain Res.* 1107:42-51.

López-Bendito G, Shigemoto R, Luján R, Juiz JM. 2001. Developmental changes in the localisation of the mGluR1alpha subtype of metabotropic glutamate receptors in Purkinje cells. *Neuroscience.* 105:413-29.

Lu B, Greengard P, Poo MM. 1992. Exogenous synapsin I promotes functional maturation of developing neuromuscular synapses. *Neuron*. 8:521-9.

Lu FM, Hawkins RD. 2006. Presynaptic and postsynaptic Ca(2+) and CamKII contribute to long-term potentiation at synapses between individual CA3 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:4264-9.

Lu E, Llano DA, Sherman SM. 2009. Different distributions of calbindin and calretinin immunostaining across the medial and dorsal divisions of the mouse medial geniculate body. *Hear Res* 257:16-23.

Lubs HA. 1969. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet*. 21:231-44.

Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P. 1996. Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 8:1488-1500.

Lujan R, Roberts JD, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P. 1997. Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat*. 13:219-241.

Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G. 2005. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*. 130:567-80.

Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ, Brothman A, Desnick RJ, Grier RE, Hirsch B y cols. 2001. Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. *Genet Med*.3:200-5.

Malter HE, Iber JC, Willemsen R, de Graaff E, Tarleton JC, Leisti J, Warren ST, Oostra BA. 1997. Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. *Nat Genet*.15:165-9.

Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348-52.

Marin-Padilla M. 1967. Number and distribution of the apical dendritic spines of the layer V pyramidal cells in man. *J Comp Neurol*. 131:475-90.

Marsden KC, Shemesh A, Bayer KU, Carroll RC. 2010. Selective translocation of Ca2+/calmodulin protein kinase IIalpha (CaMKIIalpha) to inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:20559-64.

Martin J, Bell J. 1943. A pedigree of mental defect showing sex linkage. *Arch Neurol Psychiat* 6: 154-7.

Martin LJ, Blackstone CD, Haganir RL, Price DL. 1992. Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* 9:259-70.

Martinez-Guijarro FJ, Freund TF. 1992. Distribution of GABAergic interneurons immunoreactive for calretinin, calbindin D28K, and parvalbumin in the cerebral cortex of the lizard *Podarcis hispanica*. *J Comp Neurol*. 322:449-60.

Masliah E, Ge N, Achim CL, Wiley CA. 1995. Differential vulnerability of calbindin-immunoreactive neurons in HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 54:350-7.

Mason CA. 1986. Axon development in mouse cerebellum: embryonic axon forms and expression of synapsin I. *Neuroscience*. 19:1319-33.

Mazzocco MM, Pennington BF, Hagerman RJ. 1993. The neurocognitive phenotype of female carriers of fragile X: additional evidence for specificity. *J Dev Behav Pediatr*. 14:328-35.

McConkie-Rosell A, Lachiewicz AM, Spiridigliozzi GA, Tarleton J, Schoenwald S, Phelan MC, Goonewardena P, Ding X, Brown WT. 1993. Evidence that methylation of the FMR-I locus is responsible for variable phenotypic expression of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*. 53:800-9.

Melloni RH. 1993. Dynamics of Neuron-Specific Gene Expression During Development and in Response to Selective Lesions of the Rat Central Nervous System: A Dissertation. University of Massachusetts Medical School.

Melloni RH Jr, Apostolides PJ, Hamos JE, DeGennaro LJ. 1994. Dynamics of synapsin I gene expression during the establishment and restoration of functional synapses in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 58:683-703.

Melloni RH Jr, DeGennaro LJ. 1994. Temporal onset of synapsin I gene expression coincides with neuronal differentiation during the development of the nervous system. *J Comp Neurol*. 342:449-62.

Menon V, Kwon H, Eliez S, Taylor AK, Reiss AL. 2000. Functional brain activation during cognition is related to FMR1 gene expression. *Brain Res*. 877:367-70.

Mestikawy S, Wallén-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE. 2011. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci*. 12:204-16.

Miller SG, Patton BL, Kennedy MB. 1988. Sequences of autophosphorylation sites in neuronal type II CaM kinase that control Ca²⁺(+)-independent activity. *Neuron*. 1:593-604.

Minakami R, Iida K, Hirakawa N, Sugiyama H. 1995. The expression of two splice variants of metabotropic glutamate receptor subtype 5 in the rat brain and neuronal cells during development. *J Neurochem*. 65:1536-42.

Mineur YS, Sluyter F, de Wit S, Oostra BA, Crusio WE. 2002. Behavioral and neuroanatomical characterization of the Fmr1 knockout mouse. *Hippocampus*. 212:39-46.

Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, Carbonetto S, Weiler IJ, Greenough WT, Eberwine J. 2003. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron*. 37:417-31.

Moechars D, Weston MC, Leo S, Callaerts-Vegh Z, Goris I, Daneels G, Buist A y cols. 2006. Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci*. 26:12055-66.

Moore RY, Bernstein ME. 1989. Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *J Neurosci*. 9:2151-62.

Moreno-López B, González-Forero D. 2006. Nitric oxide and synaptic dynamics in the adult brain: physiopathological aspects. *Rev Neurosci*. 17:309-57.

Moretti R, Bava A, Torre P, Antonello RM, Cazzato G. 2002. Reading errors in patients with cerebellar vermis lesions. *J Neurol*. 249:461-8.

Morris EP, Török K. 2001. Oligomeric structure of alpha-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Mol Biol*. 308:1-8.

Mouton-Liger F, Thomas S, Rattenbach R, Magnol L, Larigaldie V, Ledru A, Herault Y, Verney C, Créau N. 2011. PCP4 (PEP19) overexpression induces premature neuronal differentiation associated with Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase II- δ activation in mouse models of Down syndrome. *J Comp Neurol*. 519:2779-802.

Muddashetty RS, Kelić S, Gross C, Xu M, Bassell GJ. 2007. Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*. 27:5338-48.

Munir F, Cornish KM, Wilding J. 2000. A neuropsychological profile of attention deficits in young males with fragile X syndrome. *Neuropsychologia*. 38:1261-70.

Münkle MC, Waldvogel HJ, Faull RL. 2000. The distribution of calbindin, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the human thalamus. *J. Neuroanat* 19: 55-173.

Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P. 1998. Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J Med Genet*. 35:637-40.

Musumeci SA, Bosco P, Calabrese G, Bakker C, De Sarro GB, Elia M, Ferri R, Oostra BA. 2000. Audiogenic seizures susceptibility in transgenic mice with fragile X syndrome. *Epilepsia*. 41:19-23.

Musumeci SA, Colognola RM, Ferri R, Gigli GL, Petrella MA, Sanfilippo S, Bergonzi P, Tassinari CA. 1988. Fragile-X syndrome: a particular epileptogenic EEG pattern. *Epilepsia*. 29:41-7.

Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G. 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res*. 305:187-202.

Nichols RA, Chilcote TJ, Czernik AJ, Greengard P. 1992. Synapsin I regulates glutamate release from rat brain synaptosomes. *J Neurochem*. 58:783-5.

Nichols RA, Sihra TS, Czernik AJ, Nairn AC, Greengard P. 1990. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II increases glutamate and noradrenaline release from synaptosomes. *Nature*. 343:647-51.

Nielsen DM, Derber WJ, McClellan DA, Crnic LS. 2002. Alterations in the auditory startle response in Fmr1 targeted mutant mouse models of fragile X syndrome. *Brain Res*. 927:8-17.

Niere F, Wilkerson JR, Huber KM. 2012. Evidence for a fragile X mental retardation protein-mediated translational switch in metabotropic glutamate receptor-triggered Arc translation and long-term depression. *J Neurosci*. 32:5924-36.

Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. 2001. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci*. 21:5139-46.

Ninan I, Arancio O. 2004. Presynaptic CaMKII is necessary for synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons. *Neuron*. 42:129-41.

Nolin SL, Glicksman A, Houck GE Jr, Brown WT, Dobkin CS. 1994. Mosaicism in fragile X affected males. *Am J Med Genet*. 51:509-12.

Nolin SL, Houck GE Jr, Gargano AD, Blumstein H, Dobkin CS, Brown WT. 1999. FMR1 CGG-repeat instability in single sperm and lymphocytes of fragile-X premutation males. *Am J Hum Genet*. 65:680-8.

Nussbaum RL, Ledbetter DH. 1995. The fragile X syndrome. In *Metabolic Basis of Inherited Disease, Seventh Edition*, Scriver CR, Beaudet A, Sly WS and Valle D (eds). New York: MacGraw-Hill, pp. 795-810.

Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boué J, Bertheas MF, Mandel JL. 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 252:1097-102.

Ohsako S, Nakazawa H, Sekihara S, Ikai A, Yamauchi T. 1991. Role of threonine-286 as autophosphorylation site for appearance of Ca²⁺(+)-independent activity of calmodulin-dependent protein kinase II alpha subunit. *J Biochem*. 109:137-43.

Olmos-Serrano JL, Corbin JG, Burns MP. 2011. The GABA(A) receptor agonist THIP ameliorates specific behavioral deficits in the mouse model of fragile X syndrome. *Dev Neurosci.* 33:395-403.

Olmos-Serrano JL, Paluszkiewicz SM, Martin BS, Kaufmann WE, Corbin JG, Huntsman MM. 2010. Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci.* 30:9929-38.

Ong WY, He Y, Tan KK, Garey LJ. 1998. Differential localisation of the metabotropic glutamate receptor mGluR1a and the ionotropic glutamate receptor GluR2/3 in neurons of the human cerebral cortex. *Exp Brain Res.* 119:367-374.

Oostra BA, Chiurazzi P. 2001. The fragile X gene and its function. *Clin Genet.* 60:399-408.

Ouimet CC, McGuinness TL, Greengard P. 1984. Immunocytochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:5604-8.

Paradee W, Melikian HE, Rasmussen DL, Kenneson A, Conn PJ, Warren ST. 1999. Fragile X mouse: strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function. *Neuroscience.* 94:185-92.

Pasti L, Carmignoto G, Pozzan T, Battini R, Ferrari S, Lally G, Emson PC. 1999. Cellular calcium handling in brain slices from calbindin D28k-deficient mice. *Neuroreport.* 10:2367-72.

Peier AM, McIlwain KL, Kenneson A, Warren ST, Paylor R, Nelson DL. 2000. (Over) correction of FMR1 deficiency with YAC transgenics: behavioral and physical features. *Hum Mol Genet.* 9:1145-59.

Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST. 2007. The pathophysiology of fragile X syndrome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 8:109-29.

Pillai-Nair N, Panicker AK, Rodriguiz RM, Gilmore KL, Demyanenko GP, Huang JZ, Wetsel WC, Maness PF. 2005. Neural cell adhesion molecule-secreting transgenic mice display abnormalities in GABAergic interneurons and alterations in behavior. *J Neurosci.* 25:4659-71.

Pop AS, Gomez-Mancilla B, Neri G, Willemsen R, Gasparini F. 2014. Fragile X syndrome: a preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology (Berl).* 231:1217-26.

Qin M, Xia Z, Huang T, Smith CB. 2011. Effects of chronic immobilization stress on anxiety-like behavior and basolateral amygdala morphology in Fmr1 knockout mice. *Neuroscience.* 194:282-90.

Real MA, Simón MP, Heredia R, de Diego Y, Guirado S. 2011. Phenotypic changes in calbindin D28K immunoreactivity in the hippocampus of Fmr1 knockout mice. *J Comp Neurol.* 519:2622-36.

Reddy KS. 2005. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Med Genet.*6:3.

Reiss AL, Abrams MT, Greenlaw R, Freund L, Denckla MB. 1995. Neurodevelopmental effects of the FMR-1 full mutation in humans. *Nat Med.* 1:159-67.

Reiss AL, Patel S, Kumar AJ, Freund L. 1988. Preliminary communication: neuroanatomical variations of the posterior fossa in men with the fragile X (Martin-Bell) syndrome. *Am J Med Genet.* 31:407-14.

Résibois A, Rogers JH. 1992. Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 46:101-34.

Reynolds S, Lane SJ. 2008. Diagnostic validity of sensory over-responsivity: a review of the literature and case reports. *J Autism Dev Disord.* 38:516-29.

Richards RI, Kondo I, Holman K, Yamauchi M, Seki N, Kishi K, Staples A, Sutherland GR, Hori T. 1994. Haplotype analysis at the FRAXA locus in the Japanese population. *Am J Med Genet.* 51:412-6.

Rifé M, Badenas C, Mallolas J, Jiménez L, Cervera R, Maya A, Glover G, Rivera F, Milà M. 2003. Incidence of fragile X in 5,000 consecutive newborn males. *Genet Test.* 7:339-43.

Romano C, Van den Pol AN, O'Malley KL. 1996. Enhanced early developmental expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat brain: protein, mRNA splice variants, and regional distribution. *J Comp Neurol.* 367:403-12.

Romano C, Sesma MA, McDonald CT, O'Malley K, Van den Pol AN, Olney JW. 1995. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *Comp Neurol.* 355:455-69.

Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, Wolff JR, Hammer RE, Malenka RC, Südhof TC. 1995. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature.* 375:488-93.

Rosenthal G, Gilman S, Koeppe RA, Kluin KJ, Markel DS, Junck L, Gebarski SS. 1988. Motor dysfunction in olivopontocerebellar atrophy is related to cerebral metabolic rate studied with positron emission tomography. *Ann Neurol.* 24:414-9.

Rousseau F, Robb LJ, Rouillard P, Der Kaloustian VM. 1994. No mental retardation in a man with 40% abnormal methylation at the FMR-1 locus and transmission of sperm cell mutations as premutations. *Hum Mol Genet.* 3:927-30.

Rudelli RD, Brown WT, Wisniewski K, Jenkins EC, Laure-Kamionowska M, Connell F, Wisniewski HM. 1985. Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathol.* 67:289-95.

Sakata-Haga H, Kanemoto M, Maruyama D, Hoshi K, Mogi K y cols. 2001. Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res.* 902:143-55.

Sakurada K, Kato H, Nagumo H, Hiraoka H, Furuya K, Ikuhara T. 2002. Synapsin I is phosphorylated at Ser603 by p21-activated kinases (PAKs) in vitro and in PC12 cells stimulated with bradykinin. *J Biol Chem.* 277:45473-9.

Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. 1979. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science.* 206:700-2.

Schwaller B, Brückner G, Celio MR, Härtig W. 1999. A polyclonal goat antiserum against the calcium-binding protein calretinin is a versatile tool for various immunochemical techniques. *J Neurosci Methods* 92: 137-44.

Schwaller B, Buchwald P, Blümcke I, Celio MR, Hunziker W. 1993. Characterization of a polyclonal antiserum against the purified human recombinant calcium binding protein calretinin. *Cell Calcium.* 14:639-48.

Schwegler H, Crusio WE. 1995. Correlations between radial-maze learning and structural variations of septum and hippocampus in rodents. *Behav Brain Res.* 67:29-41.

Schwegler H, Crusio WE, Brust I. 1990. Hippocampal mossy fibers and radial-maze learning in the mouse: a correlation with spatial working memory but not with non-spatial reference memory. *Neuroscience.* 34:293-8.

Schlötterer C, Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20:211-5.

Segal M, Kreher U, Greenberger V, Braun K. 2003. Is fragile X mental retardation protein involved in activity-induced plasticity of dendritic spines? *Brain Res.* 972:9-15.

Selby L, Zhang C, Sun QQ. 2007. Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurosci Lett.* 412:227-32.

Slonimsky JD, Mattaliano MD, Moon JI, Griffith LC, Birren SJ. 2006. Role for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the p75-mediated regulation of sympathetic cholinergic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2915-9.

Shakiryanova D, Klose MK, Zhou Y, Gu T, Deitcher DL, Atwood HL, Hewes RS, Levitan ES. 2007. Presynaptic ryanodine receptor-activated calmodulin kinase II increases vesicle mobility and potentiates neuropeptide release. *J Neurosci.* 27:7799-806.

Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB y cols. 1985. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet.* 69:289-99.

Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. 2005. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genet Med.* 7:584-7.

Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. 1992. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol.* 322:121-135

Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev.* 45:250-65.

Siesjö BK. 1986. Cellular calcium metabolism, seizures, and ischemia. *Mayo Clin Proc.* 61:299-302.

Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. 1992a. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 257:206-11.

Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. 1992b. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 257:201-6.

Sinden RR. 2001. Neurodegenerative diseases. Origins of instability. *Nature.* 411:757-8.

Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. 1993. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell.* 74:291-8.

Skinner M, Hooper S, Hatton DD, Roberts J, Mirrett P, Schaaf J, Sullivan K, Wheeler A, Bailey DB Jr. 2005. Mapping nonverbal IQ in young boys with fragile X syndrome. *Am J Med Genet A.* 132:25-32.

Slonimsky JD, Mattaliano MD, Moon JI, Griffith LC, Birren SJ. 2006. Role for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the p75-mediated regulation of sympathetic cholinergic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2915-9.

Smeets HJ, Smits AP, Verheij CE, Theelen JP, Willemsen R, van de Burgt I, Hoogeveen AT, Oosterwijk JC, Oostra BA. 1995. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. *Hum Mol Genet.* 4:2103-8.

Sterio DC. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy,* 134:127-136.

Stone LM, Browning MD, Finger TE. 1994. Differential distribution of the synapsins in the rat olfactory bulb. *J Neurosci.* 14:301-9.

Storm-Mathisen J, Leknes AK, Bore AT, Vaaland JL, Edminson P, Haug FM, Ottersen OP. 1983. First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature*. 301:517-20.

Stratton M, Lee IH, Bhattacharyya M, Christensen SM, Chao LH, Schulman H, Groves JT, Kuriyan J. 2013. Activation-triggered subunit exchange between CaMKII holoenzymes facilitates the spread of kinase activity. *Elife*. 3:e01610.

Südhof TC, Czernik AJ, Kao HT, Takei K, Johnston PA, Horiuchi A y cols. 1989. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science*.245:1474-80.

Swanger SA, Yao X, Gross C, Bassell GJ. 2011. Automated 4D analysis of dendritic spine morphology: applications to stimulus-induced spine remodeling and pharmacological rescue in a disease model. *Mol Brain*. 4:38.

Takamori S. 2006. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res*. 55:343-51.

Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. 2000. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*. 407:189-94.

Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. 2001. Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci*. 21:182.

Tao-Cheng JH, Vinade L, Smith C, Winters CA, Ward R, Brightman MW, Reese TS, Dosemeci A. 2001. Sustained elevation of calcium induces Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II clusters in hippocampal neurons. *Neuroscience*. 106:69-78.

Tassone F, Hagerman RJ, Iklé DN, Dyer PN, Lampe M, Willemsen R, Oostra BA, Taylor AK. 1999. FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 84:250-61.

Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ. 2000. Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet*. 66:6-15.

Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Hagerman PJ. 2001. A majority of fragile X males with methylated, full mutation alleles have significant levels of FMR1 messenger RNA. *J Med Genet*. 38:453-6.

Taylor AK, Tassone F, Dyer PN, Hersch SM, Harris JB, Greenough WT, Hagerman RJ. 1999. Tissue heterogeneity of the FMR1 mutation in a high-functioning male with fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 84:233-9.

Thomas AM, Bui N, Graham D, Perkins JR, Yuva-Paylor LA, Paylor R. 2011. Genetic reduction of group 1 metabotropic glutamate receptors alters select behaviors in a mouse model for fragile X syndrome. *Behav Brain Res.* 223:310-21.

Till SM, Li HL, Miniaci MC, Kandel ER, Choi YB. 2010. A presynaptic role for FMRP during protein synthesis-dependent long-term plasticity in *Aplysia*. *Learn Mem.* 18:39-48.

Till SM, Wijetunge LS, Seidel VG, Harlow E, Wright AK, Bagni C, Contractor A, Gillingwater TH, Kind PC. 2012. Altered maturation of the primary somatosensory cortex in a mouse model of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 21:2143-56.

Tobimatsu T, Fujisawa H. 1989. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem.* 264:17907-12.

Tsiouris JA, Brown WT. 2004. Neuropsychiatric symptoms of fragile X syndrome: pathophysiology and pharmacotherapy. *CNS Drugs.* 18:687-703.

Turk J, Cornish K. 1998. Face recognition and emotion perception in boys with fragile-X syndrome. *J Intellect Disabil Res.* 42:490-9.

Turman JE Jr, Hiyama L, Castillo M, Chandler SH. 2001. Expression of group I and II metabotropic glutamate receptors in trigeminal neurons during postnatal development. *Dev Neurosci.* 23:41-54.

Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. 1996. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 64:196-7.

Valtorta F, Iezzi N, Benfenati F, Lu B, Poo MM, Greengard P. 1995. Accelerated structural maturation induced by synapsin I at developing neuromuscular synapses of *Xenopus laevis*. *Eur J Neurosci.* 7:261-70.

Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Kharazia VN, Schmidt HH, Nakane M, Rustioni A. 1993. Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA. *Neurosci Lett.* 157:157-61.

Van den Pol AN, Kogelman L, Ghosh P, Liljelund P, Blackstone C. 1994. Developmental regulation of the hypothalamic metabotropic glutamate receptor mGluR1. *J Neurosci.* 14:3816-34.

Van Dam D, D'Hooge R, Hauben E, Reyniers E, Gantois I, Bakker CE, Oostra BA, Kooy RF, De Deyn PP. 2000. Spatial learning, contextual fear conditioning and conditioned emotional response in *Fmr1* knockout mice. *Behav Brain Res.* 117:127-36.

Varoqui H, Schäfer MK, Zhu H, Weihe E, Erickson JD. 2002. Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci.* 22:142-55.

Veenman CL, Reiner A. 1994. The distribution of GABA-containing perikarya, fibers, and terminals in the forebrain and midbrain of pigeons, with particular reference to the basal ganglia and its projection targets. *J Comp Neurol.* 339:209-50.

Velayos JL, Jiménez-Castellanos J Jr, Reinoso-Suárez F. 1989. Topographical organization of the projections from the reticular thalamic nucleus to the intralaminar and medial thalamic nuclei in the cat. *J Comp Neurol.* 279:457-69.

Verheij C, de Graaff E, Bakker CE, Willemsen R, Willems PJ, Meijer N, Galjaard H, Reuser AJ, Oostra BA, Hoogeveen AT. 1995. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet.* 4:895-901.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O y cols. 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coister region exhincident with a breakpoint clbiting length variation in fragile X syndrome. 65:905-14.

Vest RS, O'Leary H, Bayer KU. 2009. Differential regulation by ATP versus ADP further links CaMKII aggregation to ischemic conditions. 583:3577-81.

Vincent SR, Kimura H. 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 46:755-84.

Vinueza Veloz MF, Buijsen RA, Willemsen R, Cupido A, Bosman LW, Koekkoek SK, Potters JW, Oostra BA, De Zeeuw CI. 2012. The effect of an mGluR5 inhibitor on procedural memory and avoidance discrimination impairments in Fmr1 KO mice. *Genes Brain Behav.* 11:325-31.

Walaas SI, Gorelick FS, Greengard P. 1989. Presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in nerve terminals of rat brain. *Synapse.* 3:356-62.

Wang ZW. 2008. Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol Neurobiol.* 38:153-66.

Wang JL, Chang WT, Tong CW, Kohno K, Huang AM. 2009. Human synapsin I mediates the function of nuclear respiratory factor 1 in neurite outgrowth in neuroblastoma IMR-32 cells. *J Neurosci Res.* 87:2255-63.

Wang J, Huo FQ, Li YQ, Chen T, Han F, Tang JS. 2005. Thalamic nucleus submedius receives GABAergic projection from thalamic reticular nucleus in the rat. *Neuroscience.* 134:515-23.

Waxham MN, Aronowski J, Westgate SA, Kelly PT. 1990. Mutagenesis of Thr-286 in monomeric Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II eliminates Ca²⁺/calmodulin-independent activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1273-7.

Waxham MN, Malenka RC, Kelly PT, Mauk MD. 1993. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates hippocampal synaptic transmission. *Brain Res.* 609:1-8.

Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT. 1997. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5395-400.

Weiler IJ, Spangler CC, Klintsova AY, Grossman AW, Kim SH, Bertaina-Anglade V y cols. 2004. Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter-activated protein translation at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17504-9.

Weiss S, Pin JP, Sebben M, Kemp DE, Sladeczek F, Gabrion J, Bockaert J. 1986. Synaptogenesis of cultured striatal neurons in serum-free medium: a morphological and biochemical study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:2238-42.

White EL, Weinfeld L, Lev DL. 1997. A survey of morphogenesis during the early postnatal period in PMBSF barrels of mouse Sml cortex with emphasis on barrel D4. *Somatosens Mot Res.* 14:34-55.

Willemsen R, Anar B, De Diego Otero Y, de Vries BB, Hilhorst-Hofstee Y, Smits A, van Looveren E, Willems PJ, Galjaard H, Oostra BA. 1999. Noninvasive test for fragile X syndrome, using hair root analysis. *Am J Hum Genet.* 65:98-103.

Willemsen R, Oostra BA, Bassell GJ, Dichtenberg J. 2004. The fragile X syndrome: from molecular genetics to neurobiology. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 10:60-7.

Wisniewski KE, Segan SM, Mizejeski CM, Sersen EA, Rudelli RD. 1991. The Fra(X) syndrome: neurological, electrophysiological, and neuropathological abnormalities. *Am J Med Genet.* 38:476-80.

Wöhrle D, Schwemmle S, Steinbach P. 1996. DNA methylation and triplet repeat stability: new proposals addressing actual questions on the CGG repeat of fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 64:266-7.

Wolff PH, Gardner J, Paccla J, Lappen J. 1989. The greeting behavior of fragile X males. *Am J Ment Retard.* 93:406-11.

Xu Q, Zhu Z, Xu J, Gu W, Zhao Z. 2012. Depressed nNOS expression during spine transition in the developing hippocampus of FMR1 KO mice. *Braz J Med Biol Res.* 45:1234-9.

Yan YH, Winarto A, Mansjoer I, Hendrickson A. 1996. Parvalbumin, calbindin, and calretinin mark distinct pathways during development of monkey dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurobiol.* 31:189-209.

Zhang Y, Brown MR, Hyland C, Chen Y, Kronengold J, Fleming MR, Kohn AB, Moroz LL, Kaczmarek LK. 2012. Regulation of neuronal excitability by interaction of fragile X mental retardation protein with slack potassium channel. *J Neurosci.* 32:15318-27.

Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss G. 1995. The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J.* 14:5358-66.

Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C. 2003. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell.* 112:317-27.