



DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGÍA Y
METODOLOGÍA DE LAS CIENCIAS DEL
COMPORTAMIENTO
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



INSTITUTO MEDITERRÁNEO PARA EL
AVANCE DE LA BIOTECNOLOGÍA Y LA
INVESTIGACIÓN SANITARIA

**PAPEL DEL RECEPTOR DEL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO
LPA₁ EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA Y LA
MEMORIA ESPACIAL EN SITUACIONES DE ESTRÉS
CRÓNICO**

**Memoria de Tesis presentada por D^a M^a ESTELA CASTILLA ORTEGA para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga, bajo la dirección de los
Drs. D. Luis J Santín Núñez y D. Guillermo Estivill Torrús**

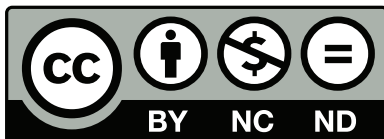
Málaga, 2011



SPICUM
servicio de publicaciones

AUTOR: María Estela Castilla Ortega

EDITA: Servicio de Publicaciones de la 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



D. LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ, Profesor Titular y Doctor en Psicología y D. GUILLERMO ESTIVILL TORRÚS, Doctor en Biología,

CERTIFICAN:

Que D^a ESTELA CASTILLA ORTEGA ha realizado en el Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Facultad de Psicología y en la Unidad de Investigación de la Fundación IMABIS y, bajo nuestra dirección, el presente trabajo de investigación titulado: **“Papel del receptor del ácido lisofosfatídico LPA₁ en la neurogénesis hipocampal adulta y la memoria espacial en situaciones de estrés crónico”**, y que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, considerando que reúne el rigor científico y las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga a 1 de Febrero de 2011

Fdo. Luis Javier Santín Núñez

Fdo. Guillermo Estivill Torrús

Yo, Estela Castilla Ortega, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación y que lo he realizado en el Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Facultad de Psicología y en el Laboratorio de Investigación y la Unidad de Microscopía de la Fundación IMABIS bajo la dirección del Dr. Luis Javier Santín Núñez y el Dr. Guillermo Estivill Torrús.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Málaga, a 1 de Febrero de 2011.



Fdo. Estela Castilla Ortega

Este trabajo ha sido financiado por:

Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU, AP2006-02582). Entidad financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia.

Título del proyecto: **Alteraciones cognitivas y emocionales inducidas por estrés: papel del ácido lisofosfatídico** (Exp.: SEJ2007-61187). Entidad financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia. Entidades participantes: Universidad de Málaga/ Fundación IMABIS. Investigador responsable: Luis Javier Santín Núñez

Título del proyecto: **Participación del ácido lisofosfatídico en la plasticidad del sistema nervioso central. Papel en la regulación de los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria.** (Exp.: FIS 02/ 1643). Entidad financiadora: FIS (Inst. Salud Carlos III; Ministerio de Sanidad y Consumo). Entidades participantes: Fundación IMABIS. Investigador responsable: Guillermo Estivill Torrús

Título del proyecto: **Alteraciones cognitivas y emocionales inducidas por estrés: papel del ácido lisofosfatídico** (Expediente: FIS PI07/ 0629). Entidad financiadora: FIS (Inst. Salud Carlos III; Ministerio de Sanidad y Consumo). Entidades participantes: Fundación IMABIS. Investigador responsable: Guillermo Estivill Torrús

Y se ha realizado al amparo del **Grupo del Plan Andaluz de Investigación, Neuropsicofarmacología de los Transmisores Lipídicos. Génesis neural y conducta** (código **CTS643**, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía), dirigido por el Dr. Guillermo Estivill Torrús.

A mi familia

- **Capítulo I: INTRODUCCIÓN**
 - 1 – El hipocampo
 - Anatomía de la formación hipocampal* _____ 19
 - Funciones cognitivas y emocionales del hipocampo* _____ 22
 - 2 – La neurogénesis hipocampal en el cerebro adulto
 - El estudio de la neurogénesis en el cerebro adulto* _____ 26
 - Neurogénesis y gliogénesis en el giro dentado del hipocampo* _____ 29
 - Implicación funcional de la neurogénesis hipocampal* _____ 32
 - Factores que regulan la neurogénesis hipocampal* _____ 36
 - 3 – El estrés crónico: efectos sobre la neurogénesis hipocampal
 - La respuesta de estrés* _____ 41
 - Efectos del estrés crónico sobre el hipocampo y la neurogénesis* _____ 45
 - 4 – El ácido lisofosfatídico (LPA)
 - El LPA: Estructura, síntesis y degradación* _____ 47
 - Receptores de LPA: Implicación en el sistema nervioso* _____ 50
- **Capítulo II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS** _____ 61
- **Capítulo III: PAPEL DEL RECEPTOR DE ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO LPA₁ EN LA CONDUCTA: EXPLORACIÓN, ANSIEDAD Y MEMORIA ESPACIAL**
 - 1 – Introducción _____ 65
 - 2 – Material y métodos
 - Animales* _____ 67
 - Habitación en el laberinto de hoyos* _____ 67
 - Aprendizaje espacial en el laberinto de hoyos* _____ 70
 - Análisis estadísticos* _____ 71
 - 3 – Resultados
 - Conducta en un contexto nuevo y habitación* _____ 73
 - Aprendizaje espacial: memoria espacial, exploración y ansiedad* _____ 76

<i>Relación entre las variables evaluadas en el laberinto de hoyos</i>	80
4 – Discusión	82

- **Capítulo IV: PAPEL DEL RECEPTOR DE ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO LPA₁ EN LAS ALTERACIONES HIPOCAMPALES INDUCIDAS POR ESTRÉS CRÓNICO: NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL Y MEMORIA ESPACIAL**

1 – Introducción	87
------------------	----

2 – Material y métodos

<i>Animales</i>	88
-----------------	----

<i>Estrés crónico</i>	88
-----------------------	----

2.a. Material y métodos: Neurogénesis hipocampal

<i>Administración de BrdU</i>	89
-------------------------------	----

<i>Fijación, corte y seriación del tejido</i>	90
---	----

<i>Inmunohistoquímica</i>	91
---------------------------	----

<i>Detección de apoptosis</i>	96
-------------------------------	----

<i>Cuantificación</i>	98
-----------------------	----

<i>Análisis estadísticos</i>	102
------------------------------	-----

2.b. Material y métodos: Determinación de corticosterona en suero _____ 103

2.c. Material y métodos: Laberinto de hoyos

<i>Habitación y aprendizaje espacial en el laberinto de hoyos</i>	104
---	-----

<i>Análisis estadísticos</i>	105
------------------------------	-----

3 – Resultados

3.a. Resultados: Neurogénesis hipocampal

<i>Proliferación, precursores neurales y elección del fenotipo neuronal o astrocitario</i>	106
--	-----

<i>Desarrollo de las nuevas neuronas: horizontalidad y árbol dendrítico</i>	108
---	-----

<i>Supervivencia</i>	109
----------------------	-----

<i>Apoptosis</i>	110
------------------	-----

<i>Estructura anatómica del hipocampo: volumen y densidad celular</i>	110
---	-----

3.b. Resultados: Niveles de corticosterona en suero _____ 112

3.c. Resultados: Análisis conductual en el laberinto de hoyos

<i>Memoria espacial a largo plazo y de trabajo</i>	113
--	-----

<i>Exploración y ansiedad</i>	115
-------------------------------	-----

<i>Relación entre las variables evaluadas</i>	116
---	-----

4 – Discusión

<i>Papel del receptor LPA₁ en la modulación de la neurogénesis hipocampal en condiciones basales y de estrés crónico</i>	118
<i>Papel del receptor LPA₁ en la respuesta del eje HHA al estrés</i>	121
<i>Papel del receptor LPA₁ en las consecuencias del estrés crónico sobre la memoria espacial</i>	124
<i>Relevancia clínica de los resultados: implicación para la esquizofrenia</i>	126
Capítulo V: CONCLUSIONES	131
ANEXOS:	
<i>ANEXO I: Tablas de soluciones factoriales</i>	135
<i>ANEXO II: Protocolos del fijador y de los tampones usados en inmunohistoquímica</i>	137
<i>ANEXO III: Publicación de los resultados</i>	139
REFERENCIAS	142
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	167
AGRADECIMIENTOS	169

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1.- El hipocampo

Anatomía de la formación hipocampal

El hipocampo es una compleja estructura cerebral en forma de "C" que se localiza en el lóbulo temporal medial. La primera descripción proviene del anatomista italiano Arantius, que en 1587 comparó su forma con la de un caballito de mar (*hippocampus* en latín), surgiendo así el nombre que el hipocampo recibe en la actualidad (Walther, 2002). Desde hace décadas, el hipocampo ha llamado la atención de los neuroanatomistas y ha sido objeto de estudio por su importante papel en la memoria (Scoville y Milner, 1957) y en la emoción (Papez, 1995), proponiéndose como una estructura clave en el sistema límbico encargado de la regulación emocional (Macleay, 1952). Anatómicamente, el hipocampo se compone de tres subdivisiones conocidas como el cuerno de Amón 1, 2 y 3 (CA1-3), en referencia al dios egipcio *Amun* (Walther, 2002). A su vez, en las áreas CA1-3 se distinguen tres estratos que se diferencian en su composición celular. El estrato piramidal tiene una densidad celular elevada y está formado principalmente por somas de neuronas piramidales. Las dendritas de estas neuronas constituyen la capa molecular, más superficial, y sus axones forman el *estratum oriens*, una capa más profunda que además incluye algunas neuronas no piramidales (Amaral y Witter, 1989; Witter, 1993; Figura 1).

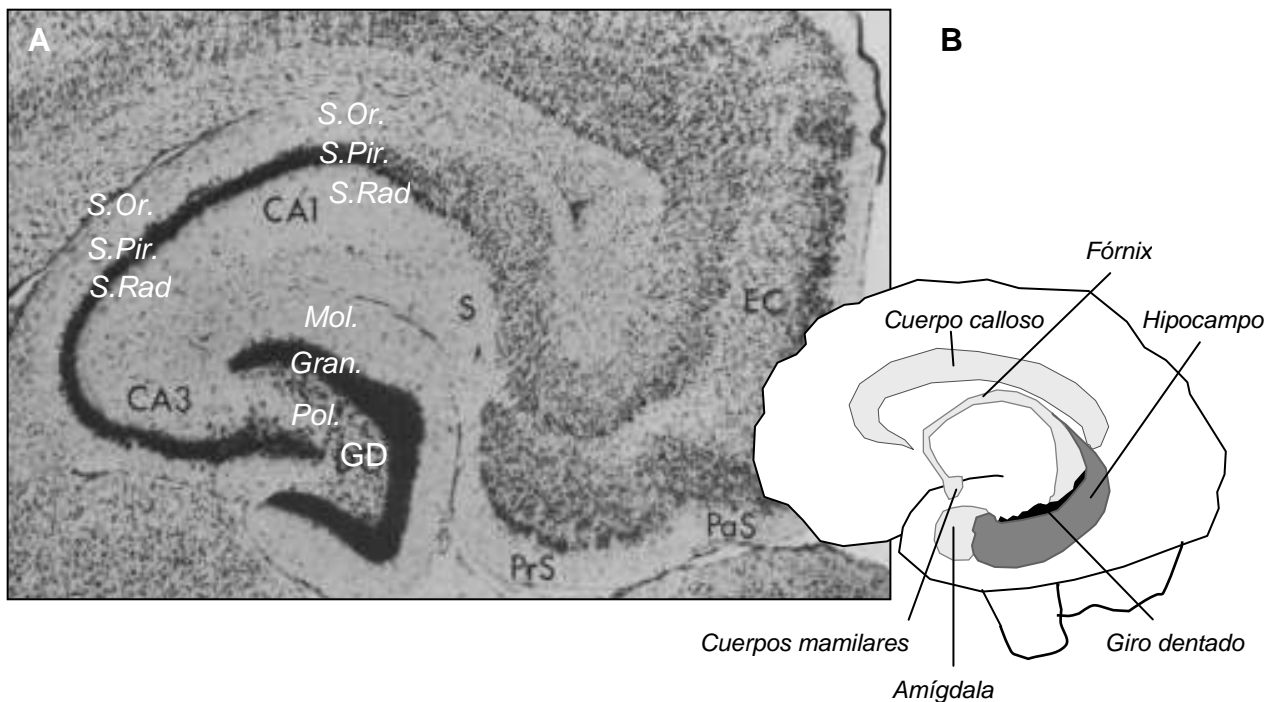


Figura 1. La formación hipocampal. (A) Formación hipocampal en una sección horizontal de cerebro de rata teñida con tionina (Amaral y Witter, 1989). CA1 y 3: Cuerno de Amón 1 y 3. GD: Giro dentado; S: Subículo; PrS: Presubículo; PaS: Parasubículo; CE: corteza entorrinal; S.Or.: Stratum oriens; S.Pir.: Stratum piramidal; S.Rad.: Stratum radiado; Mol.: Capa molecular; Gran.: Capa granular; Pol.: Capa polimórfica (o hilus). (B) Localización del hipocampo en el cerebro humano.

Rodeando al hipocampo se encuentra una banda de sustancia gris en forma de sierra conocida como *giro dentado*. El giro dentado también contiene tres tipos de capas

celulares. La capa granular está formada por núcleos de neuronas granulares, mientras que la capa molecular incluye las dendritas de estas células y la capa polimórfica o hilus incluye sus axones junto con varios tipos de interneuronas cuyas conexiones terminan en el propio giro dentado (Amaral y Witter, 1989; Witter, 1993; Figura 1). De ahora en adelante, el término *hipocampo* en esta Tesis Doctoral se referirá a las áreas CA1-3 junto con el giro dentado, dada la estrecha relación anatómica y funcional de estas estructuras. El hipocampo forma parte de la formación hipocámpal, un conjunto de áreas cerebrales que funcionan de forma integrada. La formación hipocámpal incluye, además del hipocampo propiamente dicho, el complejo subicular (compuesto por el subículo, el presubículo y el parasubículo) y la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989; Witter, 1993; Figura 1). En la parte anterior a la formación hipocámpal se encuentra el fórnix, un haz de fibras que parte del subículo conectando el hipocampo y el cerebro anterior (Aggleton y Brown, 1999; Cassel et al., 1997).

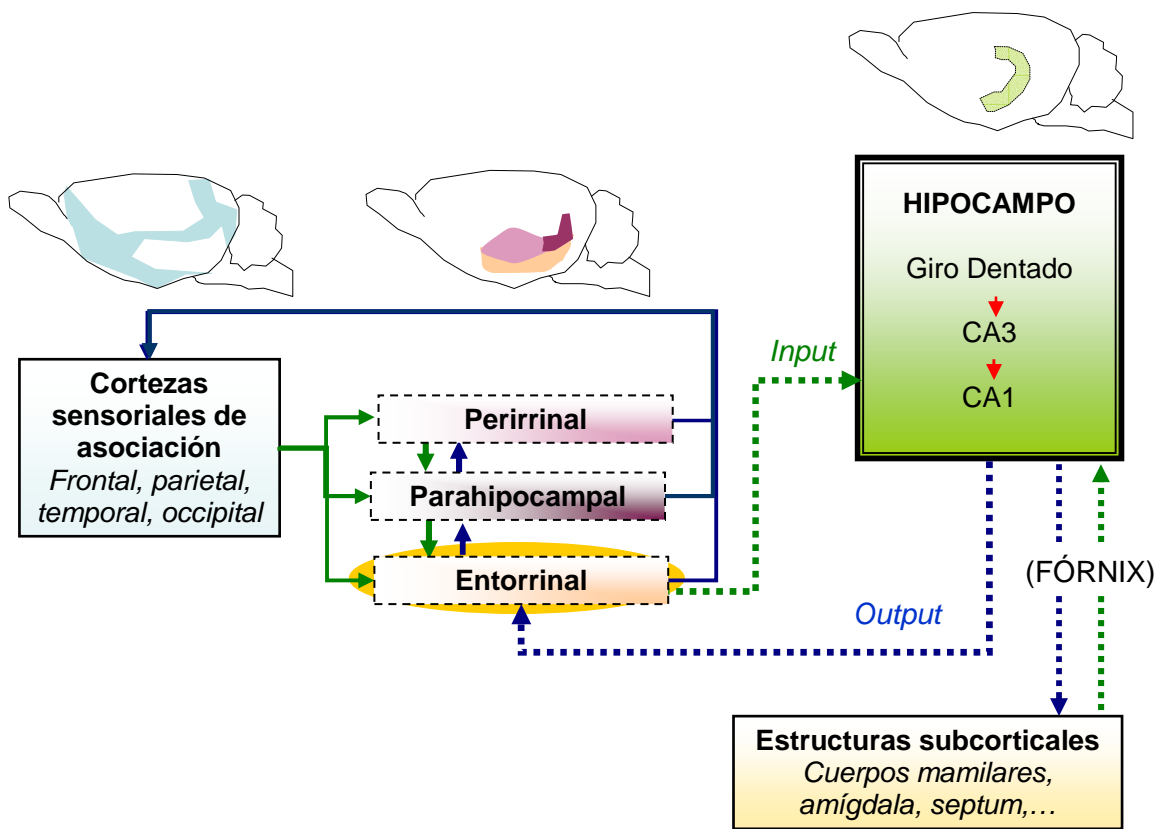


Figura 2. Anatomía general del sistema de memoria hipocámpal. Las cortezas de asociación proyectan información sensorial a la formación hipocámpal, que envía inputs al hipocampo. Éste procesa la información en un circuito intrínseco y la reenvía a la región parahipocámpal, que proyecta a las zonas corticales de las que recibe aferencias. El fórnix comunica el hipocampo con áreas subcorticales (Eichenbaum, 2000).

El hipocampo recibe y envía información hacia numerosas estructuras cerebrales, estableciendo numerosas conexiones. El principal input que llega al hipocampo es un input excitatorio glutamatérgico proveniente de la corteza entorrinal. La corteza entorrinal, a su vez recibe aferencias de regiones olfatorias (bulbo olfatorio, núcleo olfatorio anterior y corteza piriforme), del lóbulo temporal (corteza perirrinal, subículo y parasubículo) y del lóbulo frontal (corteza infralímbica, prelímbica, cingulada, dorsolateral y orbitofrontal) (Amaral y Witter, 1989; Heimer, 1968; Lopes da Silva et al., 1990; Witter, 1993; Figura 2). Todas estas proyecciones terminan en las capas superficiales de la corteza entorrinal (I-III, encargadas de enviar información al giro dentado) salvo las aferencias de las cortezas

frontales que terminan en las capas profundas (IV-VI, que contienen información de salida del hipocampo; Witter, 1993). Por otra parte, el hipocampo también recibe input de estructuras subcorticales que proyectan a la corteza entorrinal o al hipocampo directamente. Estas aferencias llegan principalmente a través del fórnix y se originan en el septum medial y banda diagonal de Broca (proyecciones colinérgicas y GABAérgicas), en los núcleos del rafe (proyección serotoninérgica), en el locus coeruleus (proyección noradrenérgica), en núcleos talámicos e hipotalámicos y en la amígdala (Aggleton y Brown, 1999; Cassel et al., 1997; Richter-Levin y Akirav, 2000; Zaborszky, 1982.). Las proyecciones amigdalinas que parten del complejo basolateral y alcanzan las cortezas entorrinal y subicular son de gran importancia para explicar la influencia de las emociones sobre la memoria (Phelps, 2004; Richter-Levin y Akirav, 2000).

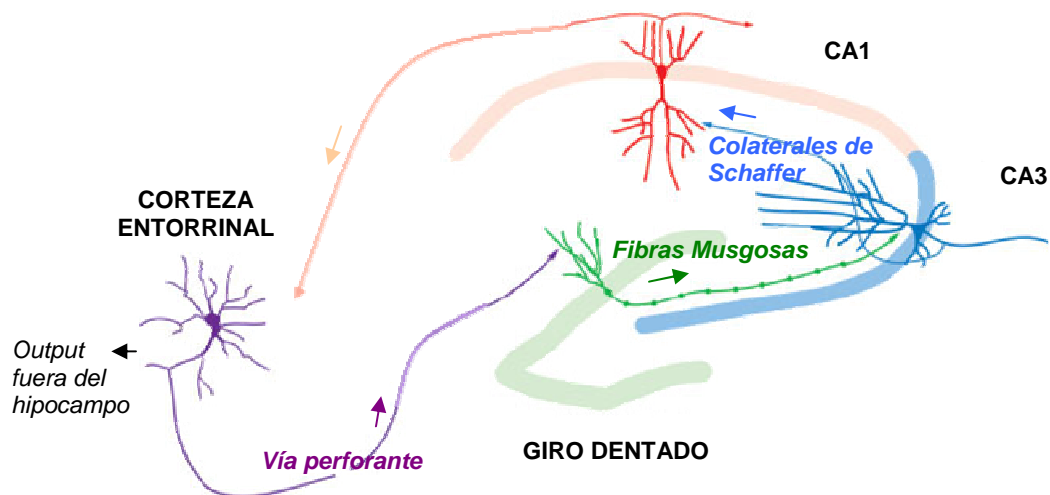


Figura 3. Circuito trisináptico del hipocampo. Modificado de Christie y Cameron, 2006.

Una vez que la información llega al hipocampo, ésta se procesa en un circuito intrínseco unidireccional que se conoce como circuito trisináptico y se describió en estudios ya clásicos (Amaral y Witter, 1989; Blackstad et al., 1970; Knowles, 1992; Ramón y Cajal, 1893). El principal neurotransmisor excitador que interviene en este circuito es el glutamato (90 % de neuronas hipocámpales, receptores postinápticos α AMPA y NMDA) y el ácido γ -aminobutírico (GABA) es su principal neurotransmisor inhibitorio (10 % de neuronas hipocámpales, receptores GABA-A y GABA-B) (Knowles, 1992; Vizi y Kiss, 1998). El circuito trisináptico comienza en la principal aferencia del hipocampo que, como se ha comentado, proviene de la corteza entorrinal. La corteza entorrinal alcanza la capa molecular del giro dentado traspasando el subículo a través de la llamada *vía perforante*. A su vez, las células granulares del giro dentado proyectan a las neuronas piramidales del área CA3 mediante las *fibras musgosas*, que además extienden axones colaterales hacia la capa polimórfica. Posteriormente, las neuronas de CA3 dirigen sus axones, conocidos como *colaterales de Schaffer*, al área CA1 (Amaral y Witter, 1989; Witter, 1993). Finalmente, las neuronas piramidales del CA1 proyectan la información a la corteza entorrinal, de forma directa o a través del subículo (Amaral y Witter, 1989; Witter, 1993; Figura 3).

Tras haberse procesado la información en el circuito trisináptico, el hipocampo envía eferencias a numerosas áreas cerebrales, proporcionando *feedback* a la mayoría de las estructuras de las que recibe aferencias. En este sentido, las capas profundas de la corteza entorrinal proyectan a las cortezas de asociación, especialmente a los dominios olfatorio y límbico (Witter, 1993). Por otra parte, la formación hipocámpal conecta con estructuras

subcorticales; principalmente a través del fórnix y con eferencias glutamatérgicas. Algunas de estas estructuras subcorticales son el septum, el accumbens, el estriado, los cuerpos mamilares y los núcleos anteriores del tálamo (Aggleton y Brown, 1999; Cassel et al., 1997). Las proyecciones del hipocampo al tálamo y a los cuerpos mamilares son importantes en la amnesia anterógrada (Aggleton y Brown, 1999). El hipocampo también proyecta hacia la amígdala basolateral desde la corteza entorrinal, el área CA1 y el subículo ventral. Esta proyección tiene un rol específico en el procesamiento de información contextual en tareas de condicionamiento del miedo (Richter-Levin y Akirav, 2000).

Funciones cognitivas y emocionales del hipocampo

Las primeras teorías atribuyeron al hipocampo una participación en el sentido del olfato, en base a sus extensas conexiones con las áreas olfatorias (Vanderwolf, 2001). Posteriormente, se propuso que el hipocampo intervendría en la inhibición conductual y en controlar algunos tipos de actividad motora y exploratoria, ya que los animales lesionados eran perseverantes e hiperactivos (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Vanderwolf, 2001). Hoy en día, estas teorías no se han desechado en su totalidad (Vanderwolf, 2001), pero el hipocampo se conoce principalmente por su importante papel en la memoria. Esta función quedó patente por primera vez en humanos en el estudio de Scoville y Milner (1957), que describieron que los pacientes con daño bilateral del lóbulo temporal medial eran incapaces de aprender información nueva (amnesia anterógrada), como sucede en el conocido caso del paciente H.M. (Corkin et al., 1997; Scoville y Milner, 1957). En términos generales, la *memoria* puede definirse como la capacidad de un organismo de retener información sobre sí mismo y su entorno y utilizarla con fines adaptativos (Fuster, 1995). Múltiples estudios han puesto de manifiesto que la memoria no es una entidad unitaria, sino que consiste en sistemas separados que dependen de distintas estructuras cerebrales. Según su contenido, la memoria se puede disociar en *memoria declarativa o explícita* (memoria consciente) y en *memoria no declarativa o implícita* (memoria no accesible a la conciencia) (Figura 4, véase la revisión de Squire y Zola-Morgan, 1996). La memoria declarativa comprende a la semántica (hechos o palabras que son independientes del contexto donde se han adquirido), la episódica (acontecimientos autobiográficos) y la espacial (lugares), mientras que la memoria no declarativa comprende procedimientos o habilidades que se manifiestan a través del rendimiento (p.ej., montar en bicicleta) y el aprendizaje asociativo y no asociativo básico (Thompson y Kim, 1996; Figura 4).

Los estudios clínicos muestran que la lesión bilateral en el hipocampo produce una profunda amnesia anterógrada que es específica para la memoria declarativa. Así, el paciente H.M., al que se le extirpó la mayor parte del lóbulo temporal, podía aprender nuevas habilidades sensoriomotoras pero era incapaz, por ejemplo, de recordar lo que había hecho a lo largo del día, de aprender los nombres de las personas que había conocido después de la operación o de aprender la distribución espacial de lugares nuevos (Corkin, 2002). Esto indica que el hipocampo es necesario para el procesamiento complejo que requiere la memoria declarativa, como el establecimiento de secuencias temporales en el caso de la memoria episódica (Fortin, Agster y Eichenbaum, 2002) o la asociación de múltiples estímulos para orientarse en un espacio, en el caso de la memoria espacial (Morris et al., 1982). En este sentido, se ha revelado que el hipocampo también participaría en la memoria implícita cuando ésta requiere establecer asociaciones temporales y/o espaciales de cierta complejidad. Así, es necesario para asociar estímulos separados en el tiempo (condicionamiento de huella; Gould et al., 1999), para asociar un evento con un entorno espacial (condicionamiento del miedo a un contexto; Anagnostaras, Gale y Fanselow, 2001) y para la habituación o sensibilización a un contexto (Honey et al., 2007; Leussis y Bolivar, 2006, Figura 4). Por el contrario, el hipocampo no participaría en la memoria implícita referida a la asociación de estímulos simples (p.ej. un tono y una descarga) que coinciden en tiempo y espacio ni en la habituación a un estímulo sencillo (Anagnostaras, Gale y Fanselow, 2001; Gould et al., 1999).

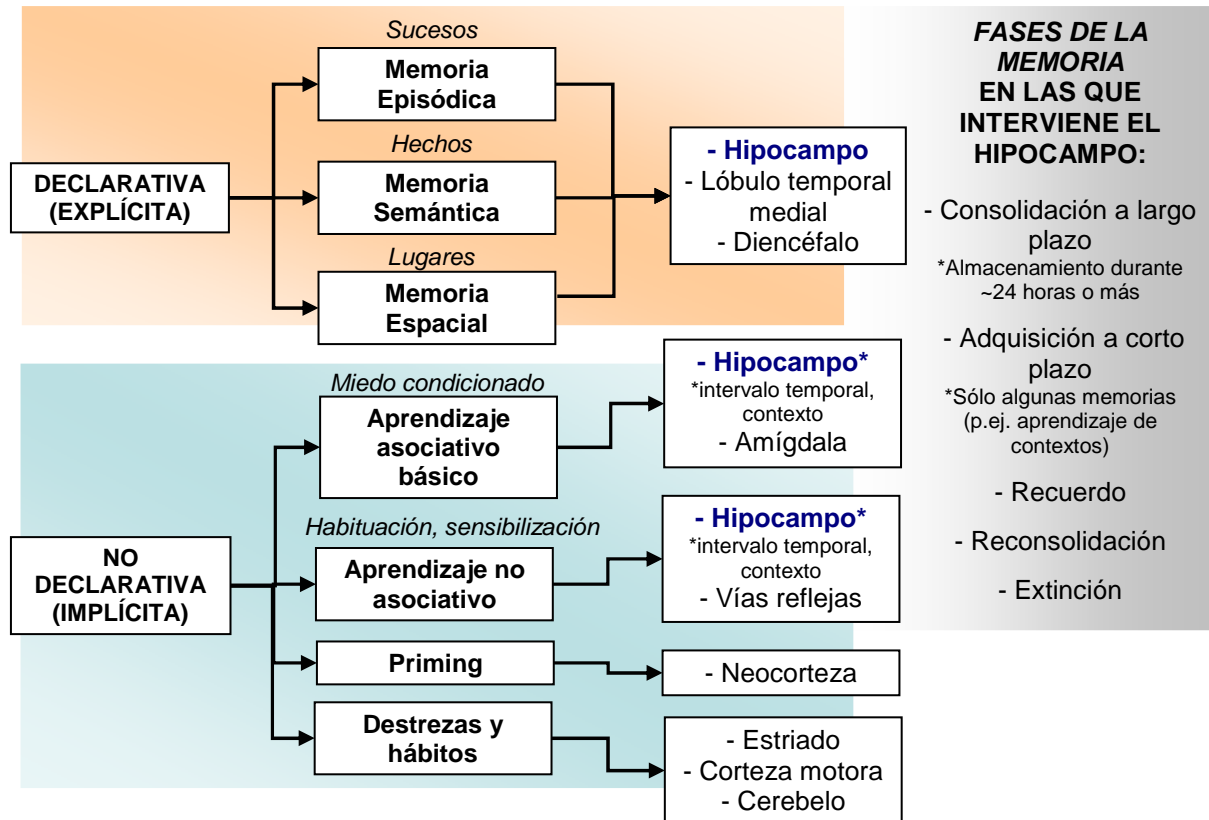
CONTENIDOS DE LA MEMORIA:

Figura 4. Tipos y fases de la memoria que dependen del hipocampo. El hipocampo soporta la memoria declarativa, pero también la no declarativa si ésta implica asociaciones contextuales o temporales complejas. Es necesario para la consolidación a largo plazo, pero también puede intervenir en la adquisición, recuerdo, reconsolidación y extinción, según el tipo de memoria y su antigüedad (referencias en el texto).

Para comprender el papel del hipocampo también es necesario mencionar otra clasificación de la memoria, complementaria a la anterior, basada en el tiempo en el que la información es accesible. La *memoria a corto plazo* tiene una duración de segundos o minutos. Cuando esta información temporal es objeto de manipulación o procesamiento, se conoce como *memoria de trabajo*. Por otra parte, la *memoria a largo plazo* o *memoria de referencia* puede abarcar horas, días e incluso años. En este sentido, el proceso por el que la memoria se establece en un almacén permanente se denomina *consolidación*, mientras que el *recuerdo* es otra fase de la memoria en la cuál ésta se recupera del almacén y vuelve a ser accesible. Al volverse a almacenar, sería susceptible de sufrir modificaciones, lo cual se conoce como *reconsolidación* (revisado en Sandi, Venero y Cordero, 2001). Los pacientes con daño hipocampal son capaces de mantener la información declarativa durante unos minutos pero no tras intervalos temporales largos (Corkin et al., 1997; Sandi, Venero y Cordero, 2001; Scoville y Milner, 1957). Por tanto, el hipocampo sería necesario para la consolidación a largo plazo de ésta información, permitiendo su almacenamiento durante un período de tiempo prolongado (Eichenbaum, 2000). Así, el hipocampo no es necesario para reconocer un objeto cuando ha transcurrido poco tiempo desde su presentación, pero sí es necesario para reconocerlo tras un intervalo temporal largo (Clark, Zola-Morgan y Squire, 2000). Sin embargo, algunas memorias hipocampales son altamente complejas en tanto que demandan la asociación de numerosos estímulos, como es el caso de la memoria espacial. Estas memorias parecen requerir mayor implicación hipocampal

(Broadbent, Squire y Clark, 2004; Dupret et al., 2008) y, en estos casos, el hipocampo también es necesario para su adquisición a corto plazo, como se ha demostrado en las tareas de memoria espacial a corto plazo y de trabajo (e.j., Florian y Roulet, 2004; Morris et al., 1982; Ramos, 2009; Yoon et al., 2008, Figura 4).

Un aspecto importante es que la información consolidada debe quedar almacenada fuera del hipocampo tras ser procesada por él, no siendo éste su almacén permanente. Esto explica que los pacientes lesionados en el hipocampo presenten un déficit de amnesia anterógrada y conserven los recuerdos previos a la lesión. En este sentido, la zona donde queda almacenada permanentemente la información a largo plazo parece localizarse en la corteza (Frankland y Bontempi, 2005). Sin embargo, también se han descrito casos de pérdida de información previa a la lesión (amnesia retrógrada) en pacientes hipocampales y en animales de experimentación (p.ej., Martin, de Hoz y Morris, 2005; Ramos, 2009). Estas evidencias, aunque menos frecuentes que los casos de amnesia anterógrada, han suscitando controversia en cuanto al posible papel del hipocampo en la recuperación o recuerdo de la memoria. Existen diversas teorías en este sentido (revisadas en Moscovitch et al., 2006) y algunas apuntan que el hipocampo intervendría en la recuperación de las memorias hipocampales consolidadas recientemente pero no en las más remotas, pudiendo existir un gradiente temporal para la amnesia retrógrada. Además, el hipocampo también participa en la reconsolidación de los recuerdos, y los mecanismos moleculares de este proceso son distintos a los de la consolidación (Lee, Everitt y Thomas, 2004).

El deterioro de la memoria hipocampal se ha observado en numerosos estudios en animales y humanos tras lesión unilateral o bilateral de la formación hipocampal, o específicamente de sus subdivisiones, como el área CA1 (Arai et al., 2006t), CA3 (Aznar, Rasmussen y Zimmer, 1998), el giro dentado (Conrad y Roy, 1993), las cortezas del lóbulo temporal (Ploner et al., 2000) o en las conexiones de la formación hipocampal, como las fibras del fórnix que comunican el hipocampo con el tálamo y los cuerpos mamilares (Aggleton y Brown, 1999). Esto indicaría que todo el sistema hipocampal participa en la memoria. Sin embargo, cada una de sus subdivisiones podría soportar procesos diferentes. En este sentido, el giro dentado y el área CA3 parecen especializarse en el procesamiento de patrones espaciales, mientras que el área CA1 parece más implicada en la información temporal y en la consolidación (Daumas et al., 2005; Kesner, Lee y Gilbert, 2004).

Además de su función cognitiva, al hipocampo se le atribuye una importante implicación emocional (Maclean, 1952; Papez, 1995). El hipocampo es necesario para la expresión de la respuesta de ansiedad incondicionada y también para algunos tipos de condicionamiento del miedo (de huella o a un contexto; Bannerman et al., 2004), como ya se ha comentado previamente. Además, el hipocampo regula la respuesta de estrés actuando sobre el eje hipotalámico hipofisario adrenal (ver el apartado 3 de esta introducción). La literatura indica que las funciones cognitivas-espaciales se localizarían preferentemente en el hipocampo dorsal y las emocionales en el hipocampo ventral, entendido como el 50 % del volumen hipocampal desde el polo temporal (Bannerman et al., 2004). Esta disociación funcional también tiene evidencias neuroanatómicas, pues la información sensorial procesada en las cortezas de asociación llega principalmente al hipocampo dorsal mientras que el ventral conecta mayoritariamente con la amígdala, la corteza prefrontal medial, el hipotálamo y otras estructuras implicadas en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (revisado en Bannerman et al., 2004; Bertoglio, Joca y Guimaraes, 2006).

Finalmente, es importante destacar que en el hipocampo se han descrito diversos fenómenos celulares que serían responsables de su funcionalidad. En este sentido, las llamadas *células de lugar* son neuronas hipocampales que presentan una elevada tasa de descarga únicamente cuando el animal se halla en un lugar determinado (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). Este llamativo fenómeno vincula al hipocampo con el procesamiento del espacio y ha llevado a proponer que soportaría la representación neural de un mapa cognitivo, de forma que una neurona representaría una región del entorno y el conjunto de

neuronas representarían el entorno completo (Best, White y Minai, 2001; O'Keefe y Nadel, 1978). Las células de lugar se corresponden principalmente con las células piramidales de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo dorsal, aunque las neuronas granulares del giro dentado también han demostrado propiedades espaciales, algo menos específicas (Best, White y Minai, 2001). En este sentido, la memoria espacial es quizás la memoria dependiente de hipocampo que se ha estudiado más extensamente en animales de experimentación, empleándose numerosos paradigmas comportamentales como el laberinto acuático, el laberinto de hoyos y el laberinto radial (Hodges, 1996; Morris et al., 1982; Olton y Papas, 1979).

Por otra parte, la potenciación a largo plazo (PLP) se ha descrito en todas las vías del circuito trisináptico y consiste en un aumento mantenido en el tiempo de los potenciales postinápticos excitatorios de las neuronas hipocampales tras estimulación eléctrica breve y de alta frecuencia (tétanos) (Bliss y Lomo, 1973; Eichenbaum, 2000). Este fenómeno plástico se considera la base fisiológica de la memoria y el aprendizaje y, al inducirse rápidamente, podría intervenir en la codificación rápida de información (Alger y Teyler, 1976; revisado en Eichenbaum, 2003). En concreto, la PLP parece mediar la consolidación a largo plazo de la memoria sin intervenir en otros procesos mnésicos como la memoria a corto plazo, la recuperación y la reconsolidación (Pastalkova et al., 2006). La PLP se explicaría por un incremento de la efectividad sináptica de la neurona presináptica (p.ej. aumento de la liberación de glutamato) y/o por un incremento de la excitabilidad de la neurona postsináptica (p.ej., aumento de receptores glutamatérgicos) (Bliss y Lomo, 1973). A la larga, podrían producirse cambios anatómicos en las sinapsis, como un incremento del número de espinas dendríticas o del área sináptica. Complementariamente a la PLP, la depresión a largo plazo (DLP) es un mecanismo que disminuye la eficacia sináptica, modulando también la codificación de información (Eichenbaum, 2003).

Otro fenómeno plástico que tiene una importante implicación para la función hipocampal es la neurogénesis en el giro dentado. La neurogénesis hipocampal es uno de los aspectos centrales de esta Tesis Doctoral y por tanto se abordará en profundidad a continuación.

2.- La neurogénesis hipocampal en el cerebro adulto

El estudio de la neurogénesis en el cerebro adulto

Hasta el siglo pasado, la ausencia de génesis neuronal en la edad adulta era uno de los dogmas de la Neurociencia. El cerebro dispondría de un número limitado de neuronas generadas durante el neurodesarrollo y éstas no podrían reponerse en etapas posteriores al nacimiento. La primera evidencia de neurogénesis en el cerebro adulto se remonta a los trabajos de Altman y Das (1965), que identificaron nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo de rata. Estos autores emplearon la administración de timidina radioactiva (^3H timidina), que se incorpora en las células en fase S y puede detectarse en las células postmitóticas mediante autorradiografía (Taupin, 2007; Taupin y Gage, 2002, Figura 6). De este modo, variando el tiempo entre la administración del marcador y la extracción del tejido es posible estudiar las nuevas células en diferentes edades tras su división, siendo posible evaluar su proliferación, migración y supervivencia (Taupin, 2007).

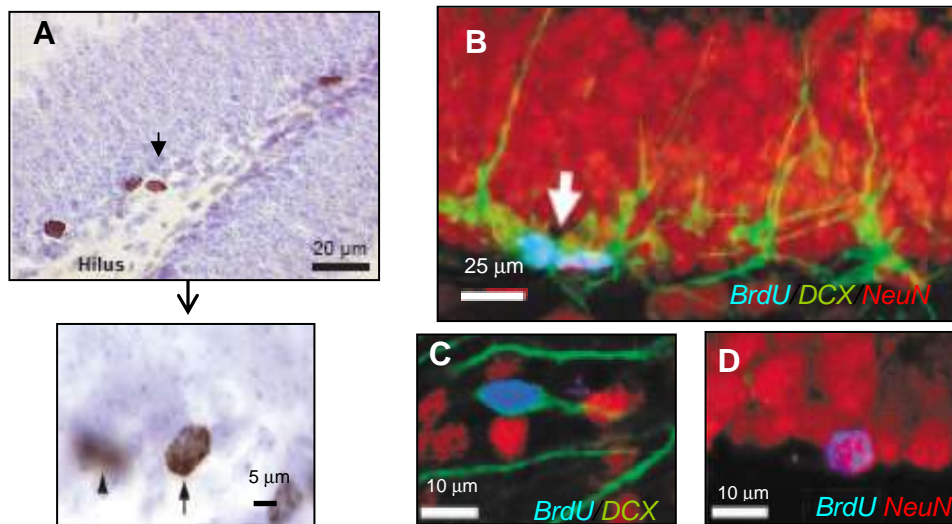


Figura 5. Marcaje de las nuevas células con BrdU. (A) Núcleos BrdU+ en el giro dentado, contrateñido con hematoxilina. (B) Inmunohistoquímica con fluorescencia que muestra núcleos de BrdU indiferenciados, que luego se diferencian en neurona joven DCX+ (C) y adulta NeuN+ (D). (Brown et al., 2003; Christie y Cameron, 2006; Dupret et al., 2007; Dupret et al., 2008).

Sin embargo, la investigación de Altman y Das tuvo un impacto escaso durante los años posteriores, hasta que en la década de los 90 se crearon nuevos métodos para marcar las células en división como la 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Arias-Carrión, Olivares-Buñuelos y Drucker-Colin, 2007; Corotto, Henegar y Maruniak, 1993; Hoshino et al., 1992; Luskin, 1993; Taupin y Gage, 2002). La BrdU es un análogo sintético de la timidina que, al igual que la ^3H timidina, se incorpora rápidamente en las células en fase S (a lo largo de un período de 2 h después de su administración) y es visible en las células hijas (Taupin, 2007, Figura 5A, C, Figura 5). La BrdU se prefiere a la ^3H timidina en tanto que no requiere el uso de material radioactivo y puede detectarse por inmunohistoquímica tradicional, un método más rápido que la autorradiografía. Otro importante avance fue el hallazgo de marcadores endógenos de neurona o glía, que, en combinación con la BrdU, permitieron determinar el fenotipo de las nuevas células (Christie y Cameron, 2006; Taupin, 2007; Taupin y Gage, 2002). De este modo, la colocalización por inmunohistoquímica de BrdU con marcadores

característicos de neurona joven y adulta ha revelado que las nuevas células que nacen en el cerebro adulto se diferencian en neuronas jóvenes que continúan su maduración y migración hasta incorporarse en circuitos cerebrales existentes (Christie y Cameron, 2006). El método de la BrdU aportó, a finales de los 90, la primera descripción de neurogénesis hipocampal adulta en humanos (Eriksson et al., 1998).

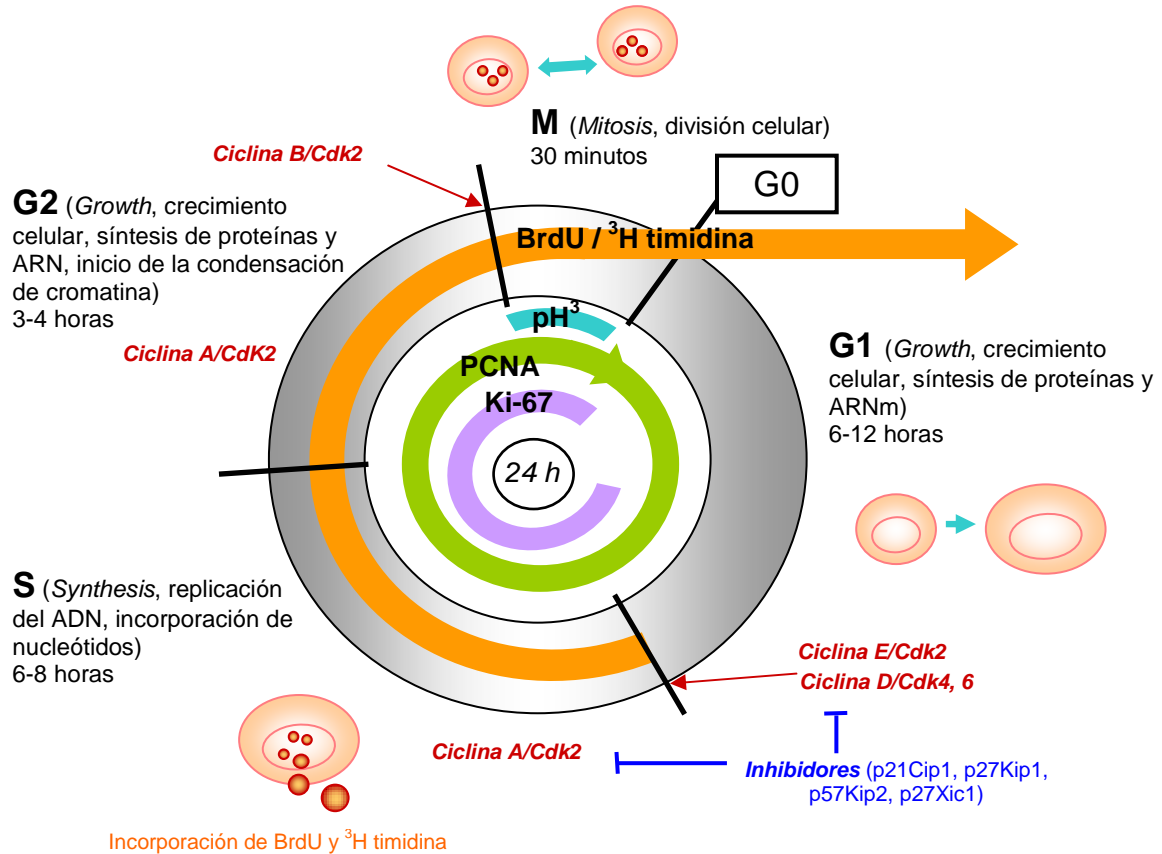


Figura 6. El ciclo celular. La BrdU y la ³H Timidina se incorporan en la fase S del ciclo y permanecen en las células hijas, mientras que los marcadores endógenos de proliferación celular (PCNA, Ki-67, pH³, ver texto) se expresan temporalmente en las fases activas del ciclo. Las proteínas ciclinas, acopladas a quinasas dependientes de ciclina (Cdk; de cyclin dependent protein kinases) forman complejos ciclina/Cdk que controlan el ciclo celular. Son críticas para la transición de una fase a otra. Los inhibidores de las Cdk (Ciclin kinase inhibitor proteins) provocan que la célula quede arrestada en una fase del ciclo y no pueda continuar a la siguiente (Alberts et al., 1992; Mandyam, Harburg y Eisch, 2007). Ver texto para las abreviaturas.

Al margen de los marcadores del fenotipo celular, que se expresan en las células postmitóticas diferenciadas, la célula en división expresa marcadores endógenos durante las fases activas del ciclo celular (Figura 6). Por ejemplo, la proteína PCNA (de *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) se expresa en todas las fases activas del ciclo (G1, S, G2, M) y permanece brevemente en las células postmitóticas en G0. El Ki-67 también se expresa en las fases activas, pero su expresión comienza avanzada la fase G1 y no permanece en G0, mientras que la histona H³ fosforilada (pH³; de *phosphorylated Histone H³*) es un marcador exclusivo de la fase de mitosis (Mandyam, Harburg y Eisch, 2007). Los marcadores endógenos de proliferación no sustituyen completamente al BrdU porque, al no permanecer en las células hijas, no permiten estudiar su destino. Sin embargo, su uso combinado con la BrdU puede ser recomendable para estudiar la longitud de las diferentes fases del ciclo (p.ej. Cayre et al., 2005; Mandyam, Harburg y Eisch, 2007) o bien para confirmar los datos obtenidos con BrdU en la evaluación de la proliferación celular. En este sentido, el marcaje

con BrdU puede presentar algunos problemas, como la determinación de la dosis óptima, su posible incorporación en células que reparan el ADN, su desaparición progresiva en las células hijas tras divisiones sucesivas y el estrés generado a consecuencia de su administración por vía intraperitoneal (Christie y Cameron, 2006; Rakic, 2002a; Taupin, 2007). En cualquier caso, la BrdU es el método más empleado en la actualidad para el estudio de la neurogénesis (Taupin, 2007).

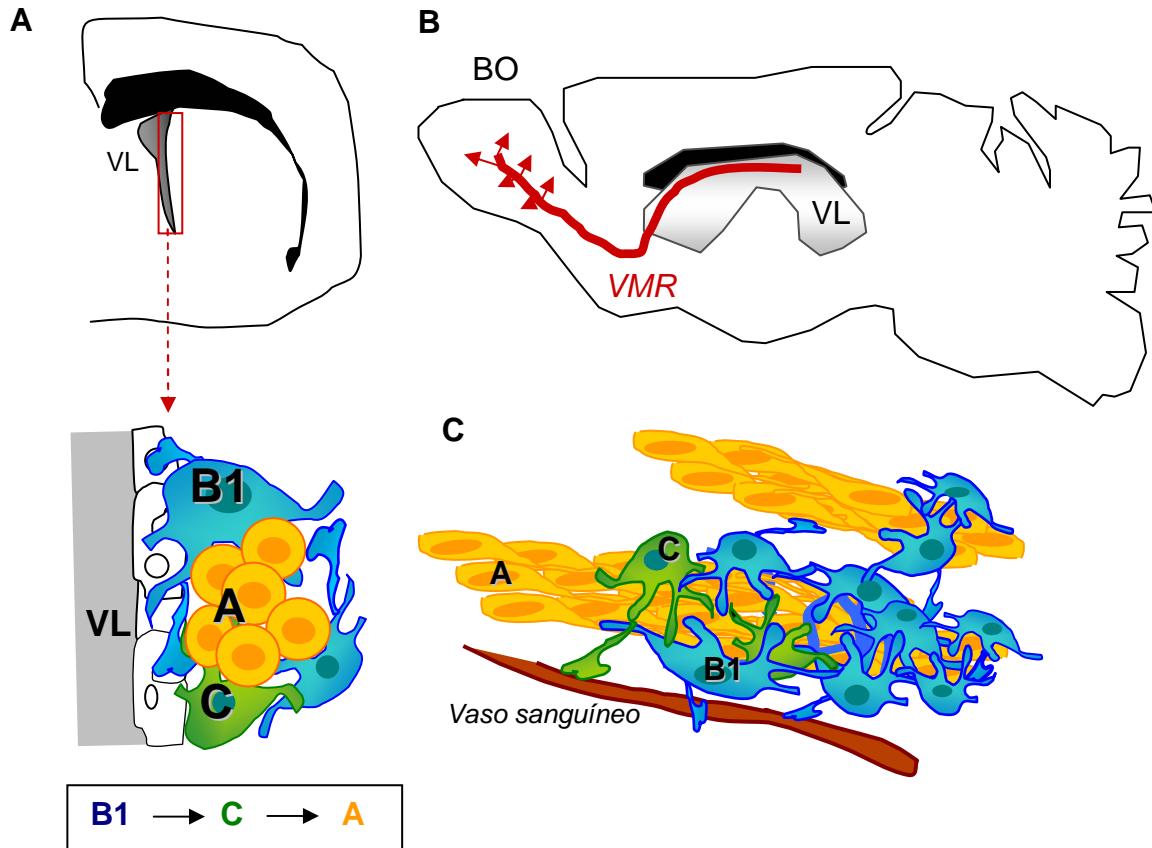


Figura 7. Neurogénesis en la zona subventricular adulta. (A) Sección coronal de cerebro de ratón, representando la zona subventricular y sus tipos celulares (ver texto). (B) Vía migratoria rostral (VMR) desde el ventrículo lateral (VL) hasta el bulbo olfatorio (BO). (C) Cadenas de migración (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002).

Gracias a la BrdU y a técnicas similares, la neurogénesis adulta es un fenómeno ampliamente reconocido hoy en día. Se han identificado diversas zonas proliferativas en el cerebro adulto, como el cuerno de Amón (Rietze, Poulin y Weiss, 2000), la zona subcallosal (Laskowski et al., 2007) e incluso la corteza cerebral (Rakic, 2002b). Sin embargo, las dos zonas neurogénicas principales son la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo. En cuanto a la zona subventricular adulta (ZSV), ésta se localiza en las paredes de los ventrículos laterales y contiene astrocitos que actúan como células precursoras de proliferación lenta (células B1) que dan lugar a células transitorias de amplificación (células C). Las células C son progenitores de proliferación activa que originan neuroblastos inmaduros (células A). Los neuroblastos forman cadenas de migración y se desplazan tangencialmente hacia el bulbo olfatorio, originando la vía migratoria rostral, gracias a los astrocitos que sirven de soporte y secretan factores de crecimiento que favorecen el proceso de migración y la supervivencia de las neuronas jóvenes (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996; Luskin, 1993; Figura 7). En la primera fase de la migración, la células tipo A conservan su capacidad de división, aunque posteriormente maduran y salen del ciclo. Al

final de la vía migratoria, cambian su migración tangencial por migración radial e invaden el tejido del bulbo donde maduran en neuronas adultas GABAérgicas y dopaminérgicas, que parecen implicadas en la discriminación olfativa (revisado en Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Arias-Carrión, Olivares-Buñuelos y Drucker-Colin, 2007; Figura 7B, C). Por otra parte, la función de la neurogénesis hipocampal es más conocida que la de la ZSV y parece tener una implicación importante en procesos emocionales y cognitivos (Leuner, Gould y Shors, 2006). Por este motivo, esta Tesis Doctoral se centrará en la neurogénesis en el hipocampo.

Neurogénesis y gliogénesis en el giro dentado del hipocampo

La neurogénesis hipocampal adulta se identificó en los estudios pioneros de Altman y Das (1965) y se describió por primera vez en humanos en la década de los 90 (Eriksson et al., 1998). Hoy en día se acepta que, constantemente, se generan nuevas neuronas en el giro dentado de los mamíferos adultos, incluyendo los humanos (revisado en Seri et al., 2004). En términos numéricos, unas 250.000 nuevas neuronas se incorporan al mes en el giro dentado de los roedores y constituyen un 6 % de la población celular de esta zona (Cameron y McKay, 2001; Seri et al., 2004). El nacimiento de las nuevas células se origina en la zona subgranular del giro dentado (ZSG), una fina capa que delimita la región granular y la polimórfica o hilus. La neurogénesis en la ZSG no podría darse sin la presencia de células precursoras o progenitoras. Por definición, estas células precursoras tendrían la capacidad de autorenovarse (división simétrica en la que se generan nuevas células precursoras) y de generar distintos tipos celulares (división asimétrica, en la que se genera una célula precursora junto con una célula de otro fenotipo, en este caso neuronal o glial) (Cameron y McKay, 2001; Gotz y Huttner, 2005).

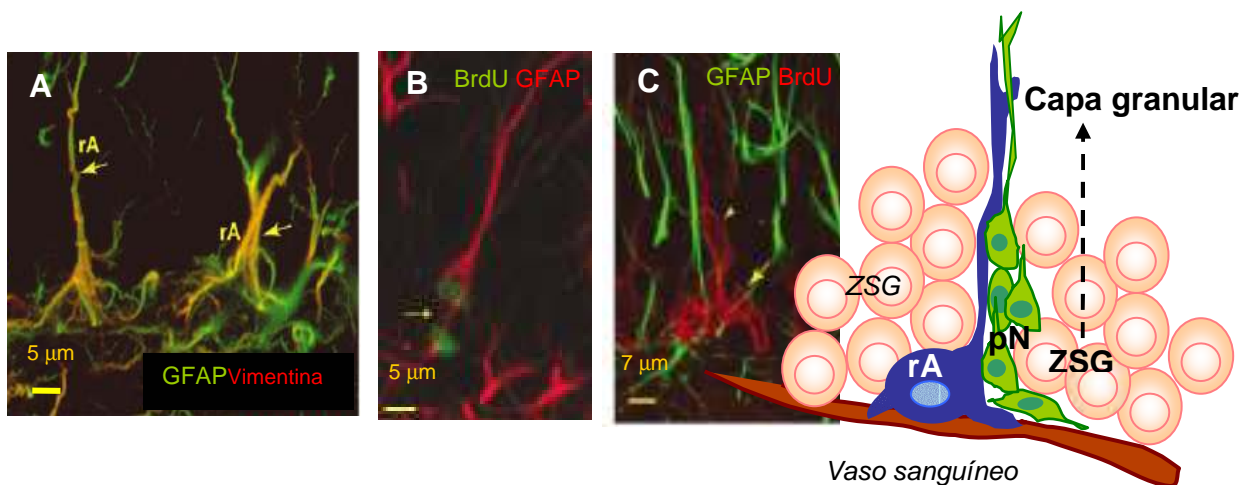


Figura 8. Precursores neurales de la ZSG. (A) Los precursores son astrocitos radiales (rA) que expresan GFAP y vimentina. (B) Precursor en mitosis, conserva su forma radial durante la división. (C) Clúster de precursores neuronales (pN) junto a un astrocito radial, a la derecha puede apreciarse un esquema (Seri 2004).

Se ha identificado que las células precursoras de la ZSG son astrocitos con morfología radial (células B) unipolar o bipolar (Seri et al., 2004; Seri et al., 2001; 2004). Estas células se asemejan a los astrocitos maduros en sus propiedades electrofisiológicas (Filippov et al., 2003; Fukuda et al., 2003) y en la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Sin embargo, expresan marcadores característicos de células madre como la nestina y la vimentina, y no expresan otros marcadores astrocitarios como la proteína glial S-100 β (QitarCameron y McKay, 2001; Fukuda et al., 2003; Seri et al., 2004; Steiner et al., 2004). También se distinguen de los astrocitos por su morfología radial en lugar de estrellada, con una ramificación basal que contacta con vasos sanguíneos de los cuales pueden recibir

señales necesarias para la proliferación celular, contribuyendo a mantener el microambiente necesario para la neurogénesis (Palmer, Willhoite y Gage, 2000; Seri et al., 2004; Steiner et al., 2004; Figura 8). Las células postmitóticas se organizan en clústers de proliferación en torno a estos precursores, lo que sugiere que el progenitor interactúa con las nuevas células favoreciendo su maduración (Seri et al., 2004; Song, Stevens y Gage, 2002a; Figura 8). De hecho, las ramificaciones de las neuronas jóvenes en diferenciación se asocian a las de los astrocitos radiales, que contribuirían a su diferenciación neuronal y también a guiar la migración progresiva de estas células hacia el interior de la capa granular (Seri et al., 2004; Song, Stevens y Gage, 2002a).

Tras la mitosis, los precursores de la ZSG podrán diferenciarse en neuronas o células gliales que se incorporarán al giro dentado. El fenotipo neuronal es más frecuente que el glial, pues un 70 % de las células postmitóticas se hallan diferenciadas en neuronas a los 21 días de la mitosis, frente a un 15-30 % diferenciadas en glía (Cameron et al., 1993; Steiner et al., 2004; Figura 9). En el caso de la génesis neuronal, los precursores radiales se dividen generando precursores neuronales de pequeño tamaño (células D1) que aún conservan su capacidad de división. Expresan el marcador de neurona inmadura doblecortina (DCX), la proteína de adhesión celular neuronal (PSA-NCAM) y nestina, pero no GFAP (Seri et al., 2004; Steiner et al., 2004; Figura 9). A los pocos días, estos precursores neuronales maduran en neuronas jóvenes (células DCX+, PSA-NCAM+, calretinina+) que pierden la capacidad mitótica (Steiner et al., 2004) y comienzan a migrar desde la ZSG hasta la capa granular del giro dentado (Brandt et al., 2003; Cameron et al., 1993; Figura 9). Durante esta etapa, las neuronas jóvenes reciben inputs GABAérgicos que son cruciales para su maduración y diferenciación (revisado en Zhao, Deng y Gage, 2008) y extienden ramificaciones verticales al área CA3 aunque también se encuentran, en menor proporción, extendiendo ramificaciones horizontales o hacia el hilus. A juzgar por la longitud de sus axones, es posible que estas células intervengan en algún circuito hipocampal a partir de una semana de edad (Hastings y Gould, 1999). Además, estas neuronas jóvenes presentan propiedades electrofisiológicas únicas que las diferencian de las neuronas adultas. En este sentido, responden al GABA con potenciales de acción excitatorios y su potenciación a largo plazo tiene un umbral más bajo, es más robusta y el GABA no la inhibe (Gould y Gross, 2002; Leuner y Gould, 2010; Overstreet-Wadiche y Westbrook, 2006; Snyder, Kee y Wojtowicz, 2001; Wang, Scott y Wojtowicz, 2000). Por otra parte, serían capaces de formar más ramificaciones y sinapsis en menos tiempo (Gould y Gross, 2002) y, aunque su output sináptico no ha podido testarse, es posible que también posea características únicas (Ge et al., 2008). De este modo, la plasticidad de las nuevas neuronas hipocampales es mayor que la de las adultas, de forma que las conexiones que establecen son altamente modulables por las demandas del entorno.

A partir de las tres semanas, las neuronas jóvenes habrán madurado en neuronas granulares adultas que estarán funcionalmente integradas en el circuito de fibras musgosas que comunican el giro dentado con el área CA3 (estudios revisados en Farioli-Vecchioli et al., 2008). Desde este momento, presentan todas las características de las neuronas granulares adultas de sistema nervioso central: son polarizadas, forman ramificaciones y sinapsis eficientes, reciben inputs glutamatérgicos respondiendo con potenciales de acción excitatorios, inputs GABAérgicos inhibitorios y liberan neurotransmisores clásicos (Song, Stevens y Gage, 2002b; van Praag et al., 2002; Zhao, Deng y Gage, 2008). Estas células expresan marcadores de neurona adulta como la proteína nuclear específica neuronal (NeuN) y la calbindina, y no expresan marcadores de neuronas jóvenes como la DCX (Brown et al., 2003; Cameron et al., 1993; Kuhn, Dickinson-Anson y Gage, 1996; Figura 9). A pesar de la expresión de marcadores característicos de neuronas GABAérgicas, como las ligadoras de calcio calretinina y calbindina, las nuevas neuronas parecen ser excitatorias, al igual que la mayoría de las neuronas granulares (Brandt et al., 2003).

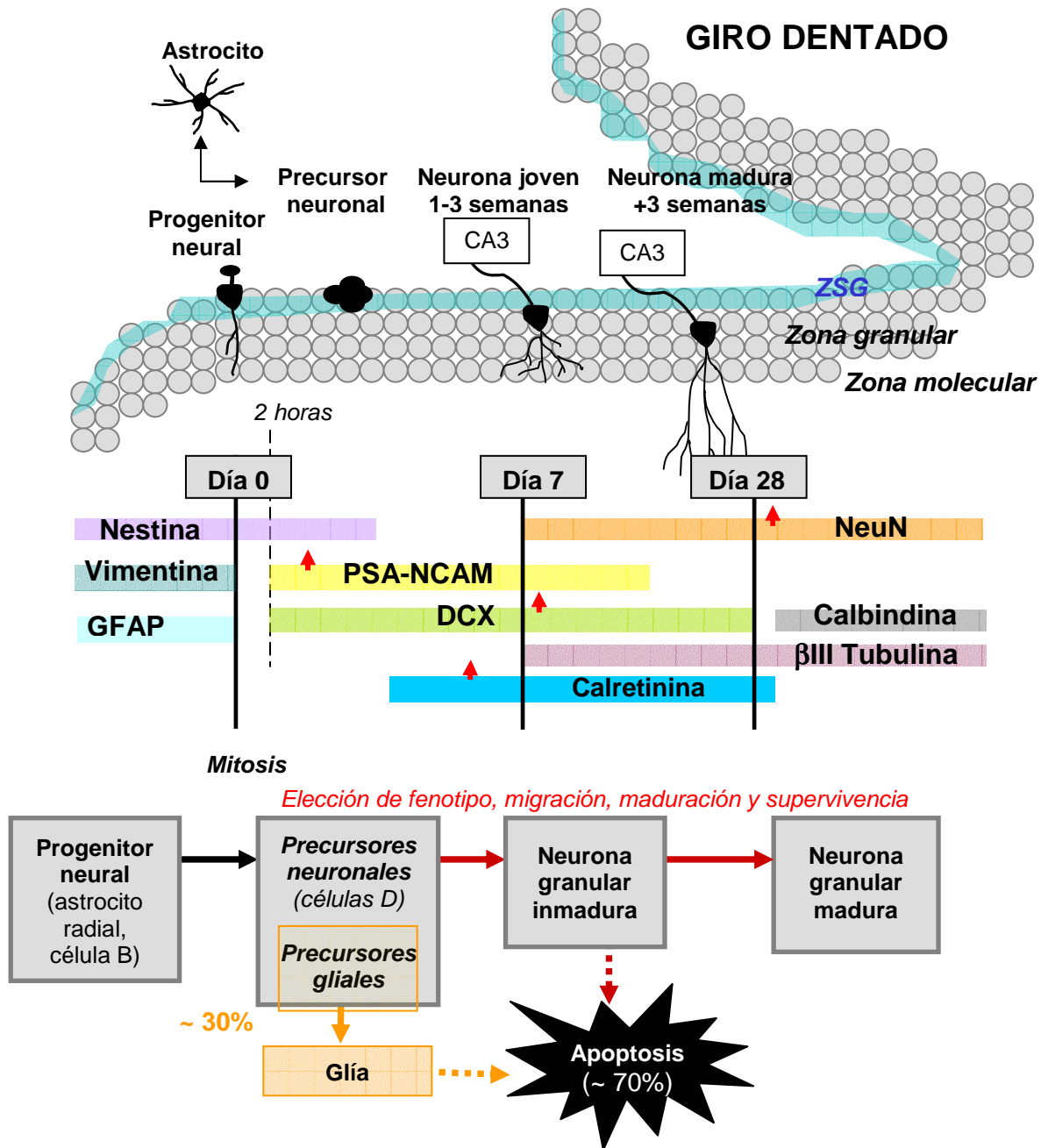


Figura 9. Etapas de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. ZM: zona molecular; ZG: zona granular; ZSG: zona subgranular. Los marcadores se refieren al fenotipo neuronal. Las flechas indican su pico de máxima expresión. Referencias en el texto.

Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de las nuevas neuronas que se generan en la ZSG mueren antes de alcanzar la madurez (Steiner et al., 2004). Así, se encuentra que la mitad de las células nacidas en la ZSG ha muerto tras una semana desde su nacimiento, y esta supervivencia se reduce a una quinta parte tras 21 días (Steiner et al., 2004; Figura 9). Esta muerte celular está mediada, al menos en gran medida, por la apoptosis. De este modo, en condiciones normales se halla un número elevado de células apoptóticas en el giro dentado que se localizan especialmente en la ZSG, lo cual sugiere que se tratan de nuevas células (Gould, Woolley y McEwen, 1990). La elevada tasa de muerte contribuiría a explicar el hecho que el giro dentado no aumente gradualmente de

tamaño a pesar del constante nacimiento de células. Más allá de esto, la apoptosis de las nuevas neuronas tiene un importante rol funcional (Dupret et al., 2007). Se ha descrito que el aprendizaje produce un aumento de la supervivencia de las neuronas relativamente jóvenes (aproximadamente una semana), que se acompaña de un incremento de proliferación y de muerte apoptótica de las células más inmaduras (Dupret et al., 2007). La apoptosis contribuiría a eliminar las señales inespecíficas de las neuronas que son demasiado jóvenes para intervenir en el aprendizaje, promoviendo la integración de las neuronas que han podido responder a la tarea y favoreciendo así la memoria (Dupret et al., 2007). Las nuevas neuronas que se incorporarán permanentemente a los circuitos del giro dentado son aquellas que sobreviven el primer mes, caracterizado por una alta frecuencia de muerte. A partir del mes de vida, esas nuevas neuronas tienen una esperanza de supervivencia mayor, pudiendo permanecer meses o incluso años en la capa granular (Dayer et al., 2003; Eriksson et al., 1998).

Los precursores radiales de la ZSG también pueden diferenciarse en células gliales (15-30 % de los casos). El fenotipo de estas células es principalmente astrocitario, mientras que se genera escasa microglía y oligodendrocitos (Steiner et al., 2004). La gliogénesis parece ocurrir de forma independiente a la neurogénesis, en tanto que la elección del fenotipo es temprana (los precursores neuronales expresan DCX pocas horas después de la mitosis) y no se halla co-expresión de marcadores neuronales y gliales (ausencia de colocación DCX/GFAP; Steiner et al., 2004). Además, algunos trabajos en situaciones de estrés sugieren que la gliogénesis y neurogénesis en la ZSG se regularían por mecanismos distintos (Oomen et al., 2009; Wong y Herbert, 2006). Esto implica que es poco probable que las nuevas neuronas y células gliales compartan un precursor común más tardío que los precursores radiales. Sin embargo, no puede descartarse completamente esta posibilidad teniendo en cuenta que se han identificado distintos tipos celulares en la ZSG cuya función se desconoce y que podrían actuar como precursores intermedios (Steiner et al., 2004). En este sentido, se ha descrito un subtipo de astrocitos horizontales en la ZSG que expresan GFAP y S-100 β pero no nestina, a diferencia de los radiales. Estas células pueden dividirse y presentan marcadores propios de precursores oligodendrocíticos. La función de estos astrocitos horizontales se desconoce, pero es posible que deriven de los radiales y constituyan un precursor temprano de la oligodendroglía (Seri et al., 2004). Por otra parte, las células que proliferan en la ZSG también se pueden diferenciar en células endoteliales (Palmer, Willhoite y Gage, 2000). Esto podría explicar la existencia de células BrdU+ de fenotipo desconocido en estudios en los cuales se rastrean los destinos neuronal y glial.

Implicación funcional de la neurogénesis hipocampal

A pesar del gran número de estudios que se han llevado a cabo, la función de las nuevas neuronas en la ZSG del giro dentado aún está por determinar (revisado en Leuner y Gould, 2010). Una posibilidad es que sirvan para reemplazar a las neuronas granulares adultas que mueren a lo largo de la vida. Sin embargo, esta opción es poco probable por el hecho de que la mayor parte de la muerte neuronal en el giro dentado ocurre precisamente en las nuevas neuronas (Dayer et al., 2003; Leuner y Gould, 2010). Por tanto, estas células parecen tener una función específica.

Abundante evidencia demuestra que las nuevas neuronas del giro dentado participan en las funciones cognitivas que dependen del hipocampo (revisado en Leuner y Gould, 2010; Leuner, Gould y Shors, 2006). En este sentido, se ha hallado correlación estadística positiva entre el número de nuevas neuronas de la ZSG y el rendimiento en tareas de memoria hipocampal, en roedores (Drapeau et al., 2003; Kempermann y Gage, 2002) y también en humanos (Coras et al., *en prensa*). Por otra parte, la inhibición de la neurogénesis (p.ej., mediante irradiación o toxinas) deteriora la consolidación, adquisición y recuerdo de la memoria espacial a largo plazo (p.ej. Jessberger et al., 2009; Snyder, Kee

y Wojtowicz, 2001), el uso de estrategias espaciales de navegación (Garthe, Behr y Kempermann, 2009), el condicionamiento del miedo a un contexto o a un tono con intervalos largos (Hernandez-Rabaza et al., 2009; Shors et al., 2002) y el reconocimiento de objeto (Jessberger et al., 2009, Figura 10), entre otras memorias hipocampales. Por otra parte, cuando la neurogénesis se incrementa (p.ej., mediante enriquecimiento ambiental), la función hipocampal se potencia y los animales mejoran su rendimiento en estas tareas (Van der Borght et al., 2007). Además, la relación entre la neurogénesis y el aprendizaje es bidireccional, ya que la proliferación, maduración y supervivencia de las nuevas neuronas se potencia al realizar tareas de aprendizaje hipocampal (Tronel et al., 2010). Así, la neurogénesis adulta aumenta con el entrenamiento de condicionamiento de huella y en el laberinto acuático (Gould et al., 1999) pero, sin embargo, el aprendizaje que no requiere del hipocampo (como el condicionamiento sin intervalos temporales o el laberinto acuático con plataforma visible) no afecta a la neurogénesis (Gould et al., 1999; revisado en Leuner y Gould, 2010). Estudios recientes demuestran que las tareas que estimulan la neurogénesis no sólo deben ser hipocampales, sino que también deben tener una dificultad adecuada (Epp, Haack y Galea, 2010; Leuner y Gould, 2010; Leuner, Gould y Shors, 2006; Waddell y Shors, 2008) y aprenderse correctamente (Drapeau et al., 2007; Leuner y Gould, 2010; Leuner et al., 2004). Como se ha comentado, el aumento de la supervivencia y proliferación inducido por el aprendizaje se acompañaría de un incremento de la muerte celular por apoptosis que eliminaría aquellas neuronas jóvenes que no fueran necesarias para la tarea y favorecería la integración de las restantes (Dupret et al., 2007).

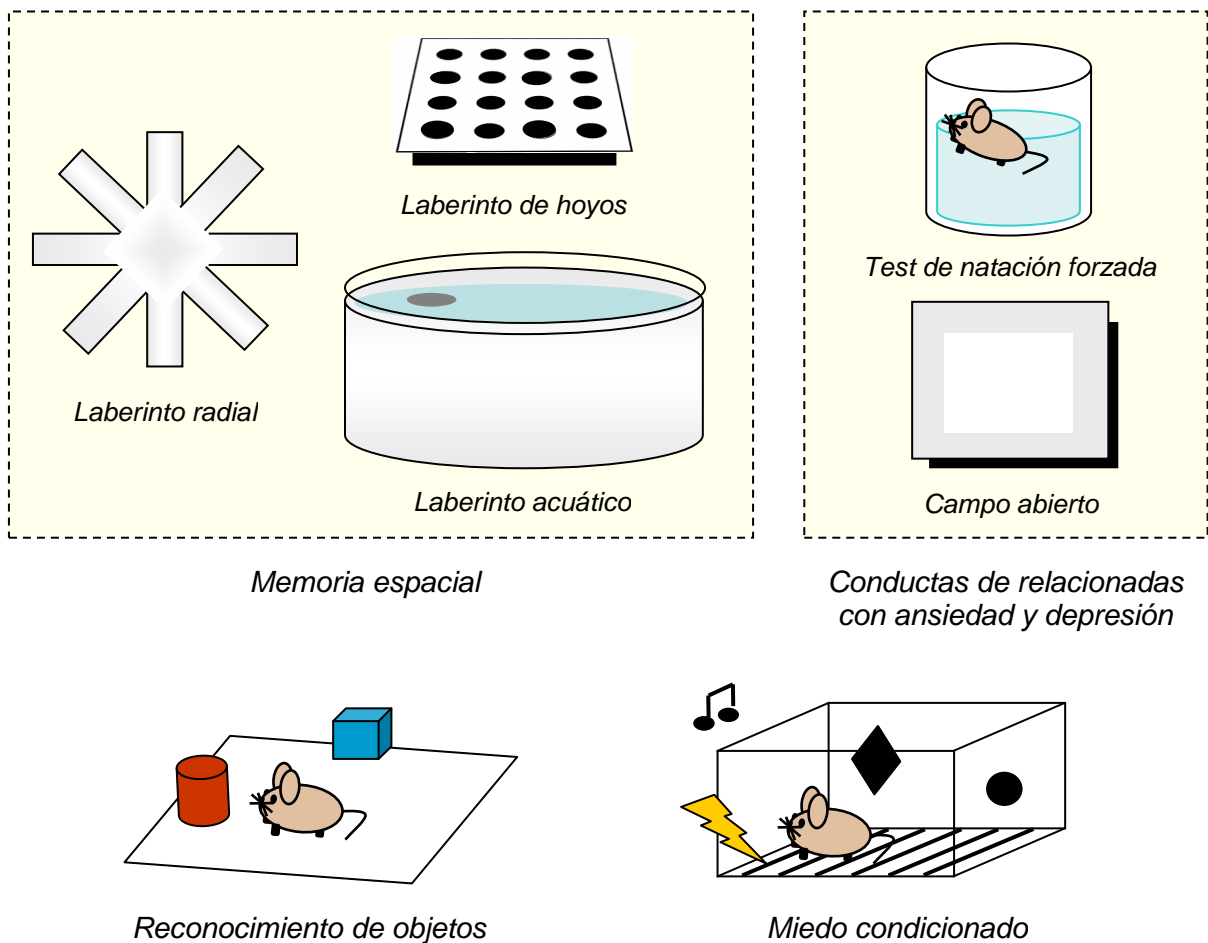


Figura 10. Funciones cognitivas y emocionales relacionadas con la neurogénesis. Se representan algunos paradigmas comportamentales empleados en la evaluación de estas funciones. La participación de la neurogénesis podría variar en función de diversos aspectos de la tarea, como por ejemplo la longitud del intervalo temporal entre ensayos. Referencias en el texto.

Sin embargo, también existen evidencias en contra de la relación entre la neurogénesis y el aprendizaje hipocampal. En este sentido, algunos estudios no hallan afectación del rendimiento cognitivo tras eliminar las nuevas neuronas (Jaholkowski et al., 2009; revisado en Dupret et al., 2008; Leuner y Gould, 2010; Leuner, Gould y Shors, 2006) e, incluso, se ha descrito que eliminar la neurogénesis favorece algunas funciones como la memoria de trabajo espacial en tareas con elevada interferencia (Saxe et al., 2007). Por otra parte, el aumento de la neurogénesis a consecuencia del aprendizaje hipocampal tampoco se replica en todos los trabajos (Leuner y Gould, 2010; Leuner, Gould y Shors, 2006).

Esta disparidad de resultados podría explicarse, al menos en parte, por las diferencias metodológicas entre estudios que emplean distintas cepas de animales, métodos de ablación de la neurogénesis y paradigmas conductuales (Garthe, Behr y Kempermann, 2009). En cuanto al método de ablación, algunos procedimientos como la radiación pueden dañar también la estructura del hipocampo o la salud general del animal, y recientemente se están reemplazando por otras estrategias menos invasivas (Dupret et al., 2008). También se ha sugerido que la función de la neurogénesis podría ser específica para ciertos tipos de memoria hipocampal. Existen resultados contradictorios en cuanto a las tareas hipocampales concretas en las que la neurogénesis participaría (Dupret et al., 2008; Hernandez-Rabaza et al., 2009; Saxe et al., 2006; Shors et al., 2002). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la neurogénesis sería necesaria para las formas de aprendizaje hipocampal más complejas, como la memoria espacial, y no para las más simples como la habituación o el reconocimiento de objeto (Dupret et al., 2008; Goodman et al., *en prensa*). Además, la participación de la neurogénesis en la memoria espacial puede ser necesaria sólo si la demanda cognitiva de la tarea es elevada (p.ej., retener la información durante intervalos temporales largos; Winocur et al., 2006), pero no debe ser tan elevada que impida el aprendizaje del animal (Epp, Haack y Galea, 2010). Por otro lado, el efecto del aprendizaje sobre la neurogénesis es un fenómeno complejo, pues el incremento de supervivencia y desarrollo de arborización de las neuronas jóvenes se acompaña de la eliminación de las más inmaduras (Dobrossy et al., 2003; Dupret et al., 2007).

Por tanto, además del tipo de tarea conductual y de su dificultad, en el estudio de la relación entre la neurogénesis y el aprendizaje también habrá que tener en cuenta la edad de las neuronas evaluadas. En relación con esto, se ha propuesto que únicamente las nuevas neuronas que alcanzan la madurez (tres-cuatro semanas de edad) participarían en las tareas de memoria hipocampal y, por tanto, la eliminación de las neuronas inmaduras no tendría consecuencias inmediatas sobre la memoria (Dupret et al., 2008; Leuner y Gould, 2010). Al contrario, otros datos apuntan que las nuevas neuronas podrían soportar una función relevante bastante antes de alcanzar su madurez. Como hemos señalado previamente, las nuevas neuronas poseen axones desarrollados, inputs sinápticos y emiten potenciales de acción en la primera semana de vida. Además, sus propiedades electrofisiológicas son únicas y presentan una elevada plasticidad (Leuner y Gould, 2010). De hecho, las neuronas cuya supervivencia se incrementa tras el aprendizaje no son las más inmaduras sino las que tienen aproximadamente una semana de edad antes de empezar la tarea, lo cual indica que éstas podrían participar en la memoria (Dupret et al., 2007; Epp, Spritzer y Galea, 2007). Esto también explicaría la ausencia de incremento de la supervivencia en algunos estudios en los que las nuevas neuronas no se evalúan en la ventana temporal adecuada (Epp, Spritzer y Galea, 2007; Epp y Galea, 2009). En concreto, un reciente trabajo (Kee et al., 2007b) sugiere que las neuronas de una semana no participan en la memoria espacial, pero sí lo hacen a las dos semanas, cuando comienzan a recibir inputs glutamatérgicos pero aún son inmaduras (ver siguiente apartado). Además, se ha descrito que la adquisición y recuerdo de la memoria hipocampal es deficitaria tras alterar las ramificaciones de las neuronas jóvenes DCX+, mientras que las nuevas neuronas maduras no demostraron estar implicadas (Farioli-Vecchioli et al., 2008).

Si las neuronas jóvenes participan en la memoria hipocampal durante un tiempo limitado tras su generación, cuando presentan propiedades plásticas especiales, sería necesario ajustar el momento de ablación de estas células y el inicio y duración de la tarea de aprendizaje para poder detectar el déficit cognitivo. La posibilidad de que las nuevas neuronas sean útiles únicamente durante un momento temporal concreto es plausible, en tanto que el hipocampo interviene en la consolidación de la memoria pero no es un almacén permanente de ésta. Así, las nuevas neuronas podrían participar en el momento de la consolidación y posteriormente morir por apoptosis, sin necesidad de integrarse indefinidamente en ningún circuito. Quizás la opción más probable es que las neuronas de diferentes edades (jóvenes, nuevas neuronas maduras y neuronas maduras previas) estén mejor capacitadas para funciones distintas que podrían complementarse unas a otras (Leuner y Gould, 2010). Las nuevas neuronas podrían estar implicadas en la modulación y refinamiento de los circuitos del giro dentado (Imayoshi et al., 2008), adaptándose a las demandas del ambiente de una forma más eficaz y soportando una función única e imprescindible para el aprendizaje, a pesar de que su número es relativamente escaso. Así, en tareas de memoria espacial las nuevas neuronas se activan con más frecuencia que las neuronas adultas que forman el giro dentado (Kee et al., 2007b), lo cual refleja que poseen una función específica e importante.

Finalmente, cabe destacar la relevancia clínica de la neurogénesis hipocampal por su vinculación con la psicopatología cognitiva y emocional (revisado en Eisch et al., 2008). La deplección de la neurogénesis incrementa las respuestas de ansiedad incondicionada, y se relacionan con los trastornos del estado de ánimo (Revest et al., 2009). En este sentido, la alteración de la neurogénesis parece ser un fenómeno clave en la depresión mayor. Los pacientes con este trastorno presentan déficit de memoria declarativa y un déficit neurogénico que repercute en una ligera reducción del volumen hipocampal (Leuner y Gould, 2010; Pittenger y Duman, 2008). Además, el estrés (uno de los factores precipitantes de la depresión) disminuye la neurogénesis, mientras que el tratamiento con antidepresivos (que estimulan los sistemas monoaminérgicos) la aumenta (Gould et al., 1997; Malberg et al., 2000). Se propone, incluso, que el efecto de los antidepresivos estaría mediado por la estimulación de la neurogénesis y que ésta sería necesaria para su acción terapéutica (Leuner y Gould, 2010; Pittenger y Duman, 2008). Así, al inhibir el incremento de la neurogénesis que inducen estos fármacos, éstos no reducen las conductas de depresión ni de ansiedad (Airan et al., 2007; Santarelli et al., 2003). Sin embargo, aunque la neurogénesis constituye un elemento importante en el tratamiento de la depresión, la neurogénesis no parece participar en el estado de ánimo basal ni en la patogénesis del trastorno depresivo (Eisch et al., 2008), y los mecanismos fisiológicos que subyacen a estos procesos serían diferentes.

Por otra parte, la neurogénesis hipocampal también se ha vinculado a la esquizofrenia, pues se ha descrito una reducción de la proliferación en el hipocampo de pacientes esquizofrénicos (Reif et al., 2007). Adicionalmente, uno de los genes que se proponen como factores de vulnerabilidad a la esquizofrenia, el DISC1 (*Disrupted-In-Schizophrenia 1*), está implicado en la neurogénesis hipocampal adulta. La ausencia de DISC1 altera el desarrollo de las nuevas neuronas y su integración funcional (Duan et al., 2007) y también reduce la proliferación de los precursores en la ZSG a través de una salida prematura del ciclo celular (Mao et al., 2009). El deterioro de la neurogénesis adulta en la esquizofrenia podría tener consecuencias funcionales y contribuir a explicar el cuadro de alteraciones cognitivas de los pacientes esquizofrénicos, que frecuentemente presentan una alteración de la memoria a largo plazo (Aleman et al., 1999). La neurogénesis también se altera tras el consumo de sustancias adictivas como los opiáceos (Eisch et al., 2000), la nicotina (Abrous et al., 2002), el alcohol (Nixon and Crews, 2002) y la cocaína (Noonan et al., 2008). En cuanto a la cocaína, la inhibición de la neurogénesis promueve su consumo. Además, la cocaína parece resultar más reforzante para los animales sin neurogénesis, y este efecto parece específico de la droga ya que no se halla con reforzadores naturales como la

glucosa (Eisch et al., 2008; Snyder et al., 2005). Por otra parte, la inhibición de la neurogénesis después del consumo de cocaína produce un aumento de las conductas de búsqueda de droga en el contexto donde ésta se administró (conducta de *craving*), y estas conductas tardan más en desaparecer (Snyder et al., 2005). Así, la neurogénesis podría controlar, a través de la conexión del hipocampo con otras estructuras límbicas, el refuerzo inducido por sustancias adictivas y la extinción de las conductas de búsqueda de drogas en contextos asociados a la sustancia.

En base a lo anteriormente expuesto, se puede concluir que la neurogénesis adulta en el giro dentado es relevante para explicar la conducta, normal y patológica, relacionada con el hipocampo. Por tanto, gran parte de la investigación se ha centrado en los factores que modulan este proceso y en sus efectos sobre el comportamiento.

Factores que regulan la neurogénesis hipocampal

La neurogénesis es un proceso variable, no estático, ya que depende de las señales químicas de su entorno (microambiente) (Peterson, 2002). Así, la neurogénesis hipocampal adulta es modulada de manera positiva o negativa por diversos *factores internos*, como los neurotransmisores, los factores de crecimiento o neurotróficos y las hormonas, además de por factores genéticos. La neurogénesis también se regula por *factores externos* como la complejidad ambiental, el ejercicio físico, el aprendizaje que depende del hipocampo y las experiencias estresantes. Estos factores actúan diferencialmente sobre la proliferación, diferenciación y supervivencia de las nuevas células, lo cual indica que las distintas etapas de la neurogénesis se regulan por mecanismos distintos (Arias-Carrión, Olivares-Bunuelos y Drucker-Colin, 2007; Balu y Lucki, 2009; Lee y Son, 2009; Leuner y Gould, 2010).

Factores moduladores	Efecto sobre la neurogénesis hipocampal	
	Proliferación	Supervivencia, diferenciación
Factores internos		
Glutamato (NMDA)	v, ^	v
GABA	=	^
5-HT, NA, DA	^	=
Estrógenos	^	=
Glucocorticoides	v	v
Edad	v	v
BDNF	=, ^	^
NGF	=	^
VEGF	^	^
IGF-1	^	^
Factores externos		
Enriquecimiento ambiental*	=	^
Ejercicio físico voluntario	^	^
Aprendizaje hipocampal	^	^
Estrés	v	v

Tabla 1. Algunos factores moduladores de la neurogénesis hipocampal. Referencias en el texto. ^: incremento, v: disminución, =: sin efecto. *Enriquecimiento ambiental sin ejercicio.

Varios sistemas de neurotransmisión intervienen en la neurogénesis. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro y está presente en aproximadamente un 10 % de las neuronas hipocampales (Vizi y Kiss, 1998). La señalización por GABA no está implicada en la proliferación celular, pero es crucial para la integración sináptica y

supervivencia de las nuevas neuronas durante su etapa inmadura. Se ha demostrado que los precursores neuronales (células D) y las neuronas jóvenes de hasta 1-2 semanas de edad reciben exclusivamente inputs GABAérgicos (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006; Markwardt y Overstreet-Wadiche, 2008; Overstreet-Wadiche y Westbrook, 2006; Overstreet Wadiche et al., 2005; Zhao, Deng y Gage, 2008). Durante esta etapa, las nuevas neuronas tienen características especiales por las cuales responden al GABA con potenciales excitatorios, que regularían su diferenciación e integración sináptica en función de la experiencia (Espósito et al., 2005; Zhao, Deng y Gage, 2008, Figura 11). De este modo, la administración de GABA facilita la diferenciación de progenitores neuronales aislados del hipocampo (Earnheart et al., 2007; Tozuka et al., 2005), mientras que la deplección de la subunidad α -2 del receptor GABA-A reduce la supervivencia de las nuevas neuronas e incrementa las respuestas de ansiedad, pero sin afectar a la proliferación (Earnheart et al., 2007). Tras activarse la señalización por glutamato, a la segunda o tercera semana de vida, las neuronas desarrollarán una respuesta inhibitoria al GABA. Esta secuencia de conectividad (silente --> respuesta excitatoria al GABA --> respuesta excitatoria al glutamato --> respuesta inhibitoria al GABA) se asemeja a la secuencia propia de la integración de las células hipocampales durante el neurodesarrollo (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006; Overstreet Wadiche et al., 2005; Zhao, Deng y Gage, 2008).

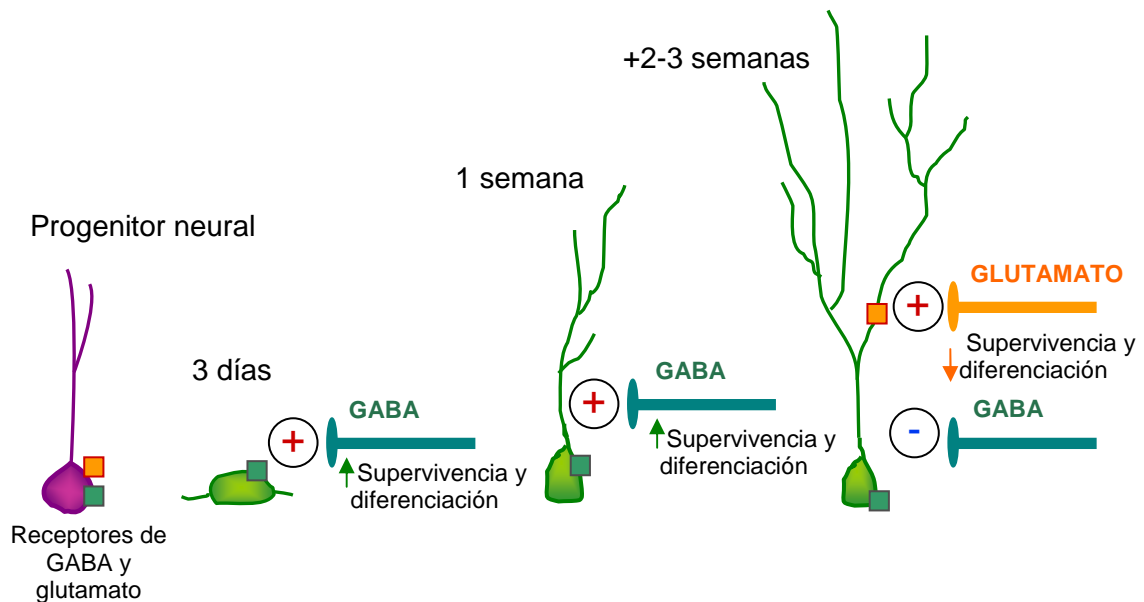


Figura 11. Modulación de la Neurogénesis hipocampal por el GABA y el glutamato. Los inputs GABAérgicos provienen de interneuronas GABAérgicas del giro dentado, mientras que los glutamatérgicos provienen principalmente de la vía perforante (Espósito et al 2005). +: potencial postsináptico excitatorio; -: potencial postsináptico inhibitorio.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del cerebro y el más abundante en el hipocampo. Posee receptores metabotrópicos (receptores mGlu) e ionotrópicos, entre los que se encuentran los NMDA, AMPA y kainato. El glutamato regula la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. En un principio parece limitar estos procesos, aunque su papel puede ser más complejo e involucrar varios mecanismos y receptores (Cameron, McEwen y Gould, 1995). Los receptores NMDA se expresan en los astrocitos radiales progenitores de la ZSG, pero desaparecen en los progenitores neuronales postmitóticos (células D, Nacher et al., 2007). A pesar de esto, la proliferación se promueve al aplicar tanto agonistas como antagonistas de los receptores NMDA (Joo et al., 2007; Maekawa et al., 2009; Nacher et al., 2001; revisado en Arias-Carrión, Olivares-Buñuelos y Drucker-Colin, 2007; Gage, Kempermann y Song, 2008). Si se lesiona la principal aferencia

glutamatérgica del giro dentado, la vía perforante, la proliferación aumenta (Cameron, McEwen y Gould, 1995). El glutamato también intervendría en una fase más tardía del desarrollo neuronal, pues las nuevas neuronas a partir de dos-tres semanas de edad reciben inputs glutamatérgicos (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006, Figura 11). En esta etapa, el bloqueo de los receptores NMDA puede favorecer la diferenciación y supervivencia, expresándose más rápido los marcadores neuronales (Cameron, McEwen y Gould, 1995; Gage, Kempermann y Song, 2008).

Las monoaminas como la serotonina (5-HT), la dopamina (DA) y la noradrenalina (NA) también se han relacionado con la neurogénesis, específicamente con la promoción de la proliferación celular. En este sentido, los efectos promotores de la neurogénesis que poseen los fármacos antidepressivos (p.ej. inhibidores selectivos de la recaptación de la 5-HT o de la enzima monoamino-oxidasa, MAO) se relacionan con la estimulación de las vías monoaminérgicas (p.ej., Huang y Herbert, 2006). La SZG recibe aferencias serotoninérgicas del núcleo medial del rafe (Daszuta et al., 1991). La participación de la 5-HT en la neurogénesis hipocampal se ha demostrado en varios estudios. La lesión del sistema o inhibición de su síntesis disminuye la proliferación en el giro dentado, y se potencia tras la administración de agentes que estimulan su neurotransmisión (Brezun y Daszuta, 1999; Huang y Herbert, 2006). El bloqueo del receptor 5-HT_{1A} reduce la proliferación (Radley Jacobs Brain res 2002), aunque otros receptores de los 15 identificados para la 5-HT podrían participar en estos efectos. La dopamina llega a la ZSV desde el área tegmental ventral y también es necesaria para la proliferación, ejerciendo este efecto por la activación de receptores dopaminérgicos en las células precursoras de las zonas proliferativas (revisado en Arias-Carrión, Olivares-Buñuelos y Drucker-Colin, 2007). La noradrenalina, liberada principalmente por el locus coeruleus, también es necesaria para la proliferación, sin intervenir en la diferenciación o supervivencia (Kulkarni, Jha y Vaidya, 2002).

Aunque menos estudiados, la neurogénesis hipocampal también se regula por otros sistemas de señalización intercelular, como la acetilcolina (Cooper-Kuhn, Winkler y Kuhn, 2004) o el óxido nítrico (Packer et al., 2003). Por otra parte, la estrecha asociación de las células en proliferación con la vasculatura indica que los factores liberados por los vasos sanguíneos tendrán un impacto directo sobre las células precursoras (Palmer, Willhoite y Gage, 2000). Así, la neurogénesis se modula por señales hormonales y por factores tróficos liberados en la sangre. Las hormonas liberadas por las gónadas, estrógenos y andrógenos, incrementan la neurogénesis. En ratas hembras, la neurogénesis es mayor en la fase del ciclo en la que los estrógenos están más elevados (proestro) y menor cuando los niveles de estrógenos se reducen (Tanapat et al., 1999). En concreto, la exposición aguda al estradiol promueve la proliferación, sin afectar a la supervivencia (Tanapat et al., 1999). Los mecanismos responsables de la acción proliferativa de los estrógenos podrían implicar la activación del sistema de neurotransmisión serotoninérgico (Banasr et al., 2004) y también la activación directa de los receptores α y β para estas moléculas, que se expresan en las células en proliferación en el hipocampo (Mazzucco et al., 2006; revisado en Galea, 2008). El papel de los andrógenos en la neurogénesis hipocampal es aún ambiguo, aunque algunas evidencias indican que podrían favorecer la supervivencia de las nuevas células (Galea, 2008; Balu y Lucki, 2009). Por otra parte, los glucocorticoides son potentes reguladores negativos de la neurogénesis, inhibiendo la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Wong y Herbert, 2004). Estas hormonas median los efectos perjudiciales de la respuesta de estrés sobre el hipocampo y la neurogénesis, y su acción se comentará con más detalle en el siguiente apartado. Los glucocorticoides también son responsables de la depleción de la neurogénesis a consecuencia de la edad. Desde los primeros estudios se describió que las células en proliferación de la ZSG disminuyen a medida que roedores y primates envejecen (Altman y Das, 1965; Seki y Arai, 1995), afectándose también la supervivencia (Cowen et al., 2008). Investigaciones que aplican la adrenalectomía sugieren que este efecto requiere la acción de los glucocorticoides, cuyos niveles aumentan con el envejecimiento (Cameron y McKay, 1999).

Los factores tróficos también se relacionan estrechamente con la neurogénesis hipocampal. Sus efectos podrían ser directos, actuando sobre las nuevas células, o indirectos, actuando sobre otros tipos celulares del nicho neurogénico que podrían modular la neurogénesis (Zhao, Deng y Gage, 2008). El factor vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) está implicado en la formación de los vasos sanguíneos y estimula la proliferación y supervivencia de las nuevas neuronas (Jin et al., 2002; Schanzer et al., 2004). El factor similar a la insulina (*insulin-like growth factor-1*; IGF-1), además de sintetizarse en el cerebro, se produce en el hígado y llega al cerebro a través de la sangre. La administración de este factor incrementa la neurogénesis hipocampal promoviendo la proliferación y diferenciación (Aberg et al., 2000), y los animales transgénicos con niveles bajos de IGF-1 muestran menos neurogénesis y déficit espaciales (Trejo, Llorens-Martin y Torres-Aleman, 2008). Las neurotrofinas son un tipo de factores tróficos liberados por neuronas y glía que incluyen al factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain derived neurotrophic factor*, BDNF) y al factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*, NGF), entre otras. El BDNF es la más estudiada. Su liberación se induce por la PLP y tiene un papel esencial en el establecimiento de cambios sinápticos en el hipocampo y en otras estructuras (Patterson et al., 1992). Los datos indican que el BDNF puede estimular la proliferación, supervivencia y diferenciación de las nuevas neuronas hipocampales y está implicado en la memoria hipocampal (Revisado en Balu y Lucki, 2009; Grote y Hannan, 2007). Aunque existe evidencia en contra (Sairanen et al., 2005), un reciente trabajo con mutantes condicionales para el BDNF (Choi et al., 2009) indica que, en condiciones basales, esta molécula estaría más implicada en la diferenciación y supervivencia de las nuevas neuronas que en la proliferación y elección del fenotipo neuronal. En relación a esto, las nuevas neuronas expresan el principal receptor de BDNF, el TrkB, y su eliminación altera su desarrollo dendrítico y supervivencia, además de incrementar las conductas de ansiedad (Bergami, Berninger y Canossa, 2009; Bergami et al., 2008). En cuanto al NGF, su infusión en el ventrículo lateral promueve la supervivencia de las nuevas células sin alterar la proliferación (Frielingsdorf et al., 2007).



Figura 12. Ejemplo de ambiente enriquecido (izquierda) vs condición estándar (derecha) (Wurbel, 2007). El ambiente enriquecido estimula la neurogénesis hipocampal.

La neurogénesis hipocampal también se regula por factores externos. El estudio pionero de Barnea y Nottebohm (1994) reveló que la complejidad ambiental influye sobre la neurogénesis. Los animales que se mantienen en un ambiente enriquecido (Figura 12) presentan un incremento de la proliferación y supervivencia de las nuevas neuronas de la ZSG en comparación con los animales estabulados en condiciones estándar (Kempermann, Kuhn y Gage, 1997). Al contrario, los animales estabulados en un ambiente empobrecido (p.ej. con aislamiento social) muestran un deterioro de la neurogénesis (Lu et al., 2003). Es interesante mencionar que el enriquecimiento parece estimular únicamente a las nuevas

neuronas que tienen una edad concreta (aproximadamente 1-2 semanas), lo cual sugiere que existe un período limitado en el cual las neuronas jóvenes son sensibles a la modulación por parte de la experiencia (Tashiro, Makino y Gage, 2007). Los protocolos de enriquecimiento ambiental son variados y suelen combinar estimulación sensorial (material para nido, variedad de objetos, olores, alimentos, texturas,...), motora (ruedas de ejercicio, escaleras, túneles,...), social (estabulación en grupos de varios animales) e, incluso, cognitiva (tareas de aprendizaje). Por este motivo, no es sencillo determinar qué factor o factores ambientales son en concreto los responsables de los efectos neurogénicos del enriquecimiento (van Praag, Kempermann y Gage, 2000). Se ha determinado que el ejercicio físico en sí mismo incrementa la proliferación de las nuevas neuronas hipocampales y también su supervivencia y desarrollo dendrítico (revisado en Olson et al., 2006). Cuando el ejercicio se elimina de los protocolos de enriquecimiento ambiental, el enriquecimiento parece tener un efecto específico en la supervivencia sin afectar a la proliferación (Olson et al., 2006). La estimulación social también resulta suficiente para favorecer la supervivencia de las nuevas células, aunque se ha investigado con menos frecuencia que el ejercicio (Branchi et al., 2006; Lu et al., 2003)

La acción de los factores ambientales sobre la neurogénesis está mediada por factores internos. En este sentido, los efectos neurogénicos del enriquecimiento y el ejercicio parecen implicar mecanismos diferentes (Olson et al., 2006), aunque en ambos intervendría la acción de los factores de crecimiento. Así, ambos tratamientos potencian el BDNF (revisado en Olson et al., 2006) y se ha demostrado que esta molécula es necesaria para mediar el beneficio de el ambiente enriquecido (que incluye ejercicio) sobre la neurogénesis hipocampal (Rossi et al., 2006). En el caso del ejercicio, el aumento de BDNF estaría mediado por receptores NMDA de glutamato (Kitamura, Mishina y Sugiyama, 2003). El IGF-1 y el VEGF también median los efectos estimulantes del ejercicio físico sobre la neurogénesis (Carro et al., 2000; Fabel et al., 2003; Trejo, Carro y Torres-Aleman, 2001; Trejo, Llorens-Martin y Torres-Aleman, 2008) y, posiblemente, también el de los antidepresivos (Khawaja et al., 2004).

Los tratamientos que favorecen la neurogénesis como el enriquecimiento ambiental y el ejercicio físico suelen acompañarse de una potenciación de la memoria hipocampal, como la memoria espacial y el reconocimiento de objeto (Bruel-Jungerman, Laroche y Rampon, 2005; Christie et al., 2005; Frick y Fernandez, 2003). Sin embargo, existe controversia sobre si esa potenciación sería consecuencia directa del aumento de neurogénesis, ya que se hallan evidencias a favor (Bruel-Jungerman, Laroche y Rampon, 2005; Clark et al., 2008) y en contra de este supuesto (Meshi et al., 2006; Ueda, Sakakibara y Yoshimoto, 2005). Como ya se ha discutido en el apartado anterior sobre la funcionalidad de la neurogénesis, el aprendizaje dependiente de hipocampo, en sí mismo, incrementa la proliferación, supervivencia y diferenciación de las nuevas neuronas, por lo que también puede considerarse como un factor modulador de este proceso (Leuner y Gould, 2010). El mecanismo de esta potenciación no es conocido, aunque se ha descrito que el aprendizaje espacial potencia la acción del BDNF en el giro dentado (Gooney et al., 2002) y también induce cambios en los niveles de glucocorticoides (Sandi, Loscertales y Guaza, 1997).

El estrés es un factor ambiental con numerosos efectos negativos en el hipocampo, la función hipocampal y la neurogénesis, que se tratarán a continuación.

3.- El estrés crónico: efectos sobre la neurogénesis hipocampal

La respuesta de estrés

El estrés, y en concreto el estrés crónico, es un potente modulador de la neurogénesis y función hipocampal. En la actualidad, su estudio es un campo de gran interés debido a la elevada frecuencia del estrés en nuestra sociedad y a su papel en el inicio y desarrollo de alteraciones conductuales, en interacción con otros factores ambientales y con factores genéticos (Enoch, 2010; Jones y Fernyhough, 2007; Kessler, Price y Wortman, 1985; Pittenger y Duman, 2008). El estudio científico del estrés comenzó a principios del siglo XX. En los años 20, el fisiólogo Walter Cannon introdujo el concepto de “homeostasis” (del griego *homos* –similar- y *estasis* –posición-), refiriéndose a los mecanismos fisiológicos que, ante cambios externos, el organismo pondría en marcha para regular su medio interno con el fin de mantenerlo en un estado constante (Cannon, 1929). Más adelante, Hans Selye definió el estrés como una respuesta inespecífica a las demandas del entorno para lograr la adaptación del organismo, que se desarrollaría en tres fases: alarma de reacción inicial, adaptación y, si el estresor se mantiene en el tiempo, agotamiento (“síndrome general de adaptación”, Selye, 1936).

Por tanto, el estrés puede definirse como una respuesta física y conductual que se activa cuando los organismos perciben estímulos internos o externos que amenazan su equilibrio (estresores) y cuyo objetivo es hacer frente a las demandas del entorno para normalizar la homeostasis (Sandi, Venero y Cordero, 2001). Tal y como sugerían los estudios iniciales (Selye, 1936), la respuesta de estrés se puede desencadenar a consecuencia de múltiples estresores. Éstos pueden ser estímulos físicos-sistémicos (por ejemplo, una contusión que estimula las vías nociceptivas, Palkovits, Baffi y Pacak, 1999), o estímulos psicológicos-procesuales, que suponen una aversión innata para el sujeto (p.ej. la cercanía de un depredador, Figueiredo et al., 2003) o bien son neutros pero han sido previamente asociados a estímulos aversivos (Herman et al., 2005; Van de Kar et al., 1991).

El estrés conlleva una respuesta de activación autonómica y neuroendocrina, ambas reguladas por estructuras del sistema nervioso central entre las que destaca el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV). La activación del sistema nervioso simpático es la respuesta más rápida al estrés y prepara a diversos órganos para hacer frente a la amenaza (p.ej., aumentando la presión sanguínea y el latido cardíaco), pero decae rápidamente dando lugar a la activación parasimpática. El NPV activa y modula estas respuestas mediante sus conexiones con diversos núcleos del tronco y de la médula que controlan el sistema nervioso autónomo, como el núcleo del tracto solitario, el parabraquial y el nervio vago (Ulrich-Lai y Herman, 2009).

Algo más lentamente, tiene lugar la respuesta neuroendocrina al estrés. Por una parte, la activación simpática produce la estimulación del *sistema simpático adrenomedular*. Ésta conlleva la liberación de adrenalina periférica en la médula de las glándulas adrenales que, a través del nervio vago, estimula la actividad de las neuronas noradrenérgicas en el locus coeruleus y otras estructuras (Roozendaal et al., 2006). Esta activación del locus coeruleus tiene consecuencias a nivel central, produciendo un incremento de los niveles de NA en la mayor parte del cerebro, incluyendo en la amígdala y en el lóbulo temporal medial (Henckens et al., 2009). Otro elemento clave en la respuesta neuroendocrina al estrés consiste en la activación del *eje hipotálamo hipofisario adrenal* (HHA). Las células neurosecretoras del NPV sintetizan y segregan la hormona liberadora de la corticotropina (CRH, de *corticotropin releasing hormone*) y la arginina-vasopresina (AVP). Estas

neurohormonas, tras ser liberadas por el núcleo paraventricular, actúan de forma sinérgica para promover la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la hipófisis anterior, que estimula la producción de glucocorticoides en la corteza adrenal y su liberación a la circulación sanguínea (O'Connor, O'Halloran y Shanahan, 2000). Por tanto, la activación del eje HHA resulta en un aumento de los niveles de hormonas glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) cuya función es incrementar los niveles de glucosa en sangre para hacer frente a las demandas energéticas en situaciones de estrés. En condiciones basales, los niveles de estas hormonas son bajos y se liberan en función de un ritmo circadiano, con un pico de liberación por la mañana en humanos y por la tarde en roedores (Atkinson y Waddell, 1997; Crofford et al., 2004; Jozsa et al., 2005; Kolber, Wiczorek y Muglia, 2008; Figura 13).

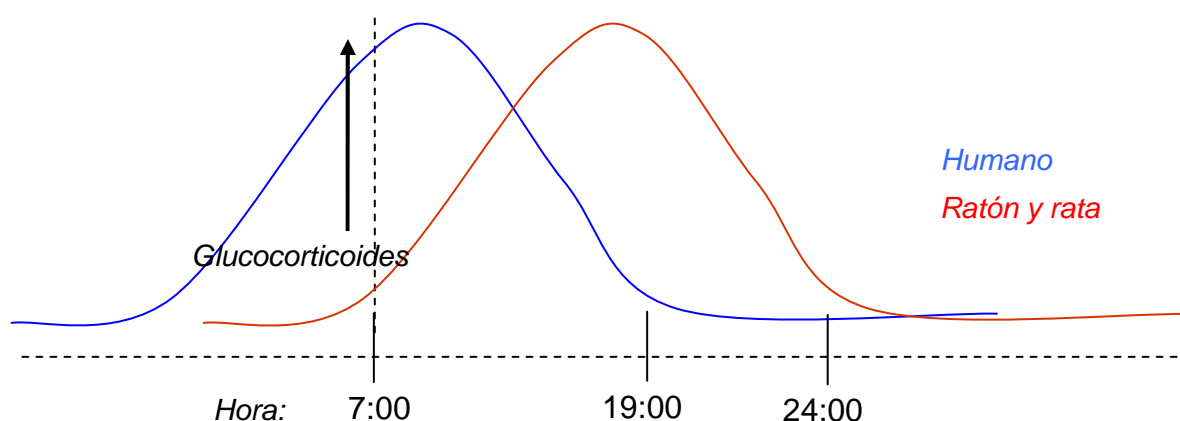


Figura 13. Ritmo circadiano de los glucocorticoides en humanos (cortisol) y roedores (corticosterona).

Debido a su naturaleza lipofílica, los glucocorticoides atraviesan la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro donde actúan sobre receptores para la hormona, presentes en abundancia. Hay dos tipos de receptores de glucocorticoides: el receptor para mineralocorticoides (MR, *mineralocorticoid receptor*) que se expresan en áreas límbicas como el hipocampo, el septum y la amígdala; y el receptor de glucocorticoides (GR, *glucocorticoid receptor*) que se expresa especialmente en el hipocampo y el septum lateral, y de forma moderada en la amígdala, el locus coeruleus y el NPV (revisado en Joels y Baram, 2009). Los MR tienen una alta afinidad para los glucocorticoides y por tanto se encuentran ocupados en situaciones basales o de estimulación del eje HHA. Los GR sin embargo tienen una afinidad menor y por tanto comienzan a ocuparse cuando los niveles hormonales son elevados, como en el pico diario de secreción de glucocorticoides o en situaciones de estrés (Reul y de Kloet, 1985). Ambos receptores son nucleares y en su estado inactivo se encuentran en el citoplasma unidos a otras moléculas (chaperonas). Al ligarse a la hormona, el receptor se activa y la molécula chaperona se disocia, permitiendo la translocación del receptor al núcleo donde modula la expresión génica (Joels y Baram, 2009). Recientemente, se ha sugerido la existencia de otros mecanismos que no implicarían la regulación genómica y que podrían explicar la acción rápida de los glucocorticoides. Estos mecanismos actuarían en situaciones de estrés agudo y parecen implicar la activación de los receptores MR (Joels et al., 2007; O'Connor, O'Halloran y Shanahan, 2000).

Tras la desaparición del estresor, se activa un feedback de control negativo hacia distintos componentes del sistema HHA para frenar la respuesta de estrés y recuperar el equilibrio homeostático (Chrousos, 1995; O'Connor, O'Halloran y Shanahan, 2000, Figura 14), de manera que los niveles de glucocorticoides en sangre se normalizan transcurridas 2-6 h desde la exposición al estresor (Joels et al., 2007; Murakami et al., 2005, Figura 14).

Los propios glucocorticoides promueven la inhibición del eje. Por una parte, inhiben la liberación de CRH y ACTH actuando directamente sobre el NPV y la hipófisis (Lupien et al., 2009). Por otra parte, modulan la actividad de otras estructuras del sistema nervioso central que inhiben o estimulan el NPV (Figura 14). A nivel de receptores, se ha propuesto que los GR regularían el feedback de los glucocorticoides en situaciones de estrés, mientras que los MR regularían el ritmo circadiano del eje HHA (revisado en Herman et al., 2005).

El hipocampo es una estructura con abundante expresión de receptores MR y GR y es clave en la inhibición del eje HHA. Por ejemplo, su estimulación reduce los niveles de glucocorticoides, mientras que la extirpación del hipocampo o la sección del fórnix conlleva una hipersecreción de estas hormonas (Herman et al., 1989). La inhibición hipocampal parece especialmente relevante en la recuperación de los niveles basales de glucocorticoides tras un estresor y es menos evidente en ausencia de estrés, lo cual implica un papel específico de esta estructura en la finalización de la respuesta de estrés (Herman et al., 2005; Ulrich-Lai y Herman, 2009). Además, la intervención del hipocampo tendría lugar ante estresores específicos como la inmovilización o la exposición a ambientes nuevos (ambos estresores psicológicos), pero no con estresores físicos como la hipoxia (Herman et al., 2005; Ulrich-Lai y Herman, 2009). Es interesante destacar que la neurogénesis hipocampal podría estar implicada en la inhibición de la respuesta de estrés que ejerce el hipocampo (Schloesser, Manji y Martinowich, 2009), ya que la eliminación de la neurogénesis se traduce en un aumento de los niveles de corticosterona en respuesta a un estresor. Por otra parte, la corteza prefrontal (corteza prelímbica y cingulada anterior) también inhibe la respuesta de estrés, pero su papel es complejo en tanto que algunas de sus áreas inducen la activación de la respuesta (corteza infralímbica). Los núcleos basolateral y central de la amígdala, implicados en el procesamiento del miedo, se encargan de la activación del eje, y en presencia de glucocorticoides parecen potenciar aún más su respuesta en lugar de inhibirla (Herman et al., 2005, Figura 14).

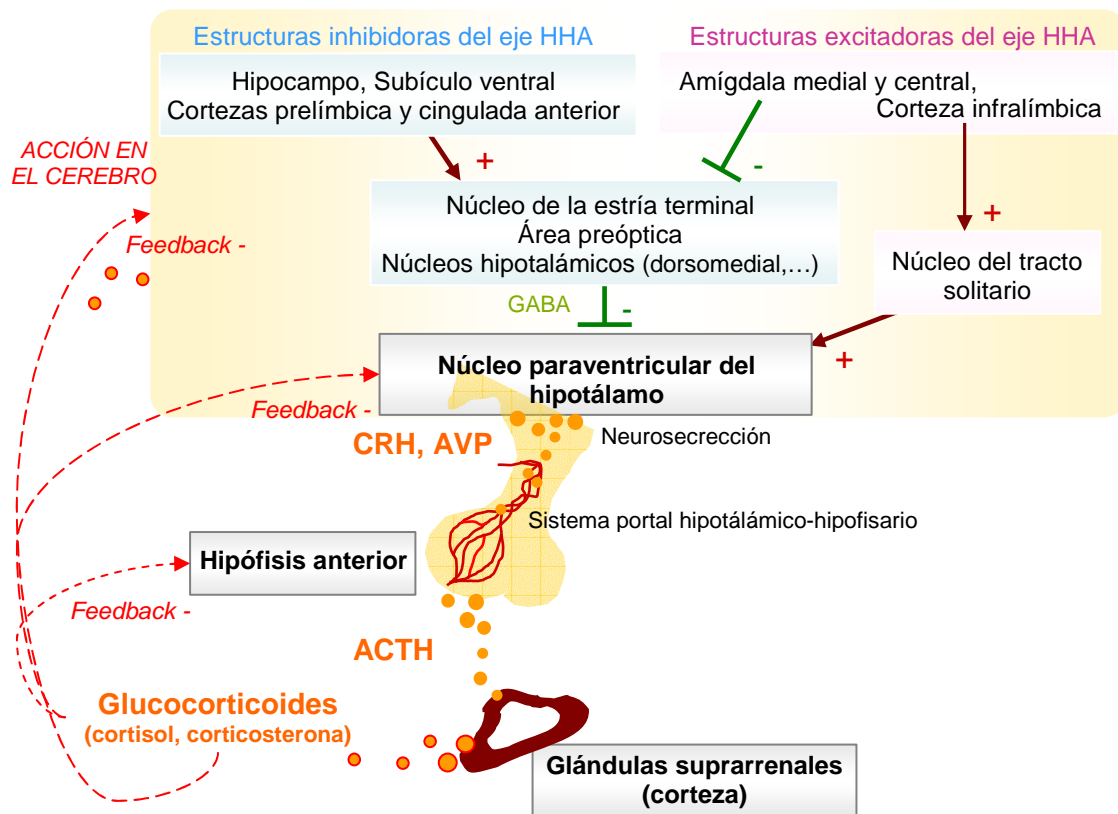
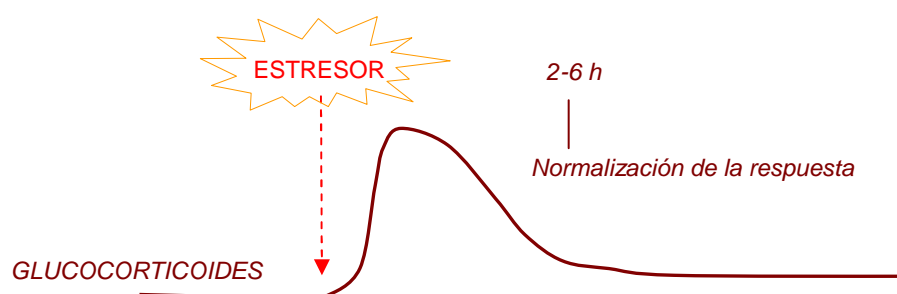


Figura 14. Eje hipotálamo hipofisario adrenal y control central de su respuesta.



Estado basal	Estrés agudo	Estrés crónico
Excitabilidad basal del hipocampo y del locus coeruleus.	Aumento de excitabilidad del hipocampo (CA1, 3, GD) y del locus coeruleus.	Excitabilidad basal del hipocampo y del locus coeruleus, pero se altera en respuesta a estímulos.
PLP eficiente.	Aumento de la PLP (CA1,3, GD).	PLP ineficiente y DLP más fuerte.
Niveles bajos de glucocorticoides (activación de receptores MR, vía genómica).	Niveles elevados de glucocorticoides (efectos rápidos por vía no genómica). Ocupación de los receptores MR y GR (feedback inhibitorio).	Niveles bajos de corticosterona (activación de receptores MR, vía genómica), en ocasiones hiper o hipocortisolemia. Alteración de la respuesta de los receptores GR y del feedback inhibitorio.
	Potenciación de la alerta, la atención, la adquisición y consolidación de información (efecto de "U" invertida en función de los niveles de glucocorticoides).	Alteración de la morfología del hipocampo (dendritas, sinapsis, muerte celular, deterioro de la neurogénesis), corteza prefrontal, amígdala y otras estructuras. Deterioro de la memoria hipocampal, conductas de ansiedad y depresión. Se pueden facilitar algunas formas de condicionamiento del miedo por hiperactividad de la amígdala.

Figura 15. Características del estrés agudo y el estrés crónico (adaptado de Joels et al., 2007).

La respuesta de estrés agudo suele ser funcional porque favorece la adaptación del individuo al medio, incrementando los niveles de energía disponible. El incremento de la NA se asocia con efectos periféricos como la dilatación pupilar, y promueve la alerta y el procesamiento de la información sobre el estresor favoreciendo la consolidación de la memoria relacionada con el estímulo estresante (Aston-Jones y Cohen, 2005; Henckens et al., 2009; Ramos, 2009; Roozendaal, 2000; Roozendaal et al., 2006). Por otra parte, la administración aguda de glucocorticoides también favorece la adquisición, consolidación y recuerdo de la memoria hipocampal en función de su dosis, hallándose un efecto de "U" invertida (Akirav et al., 2004; Roozendaal et al., 2006). De hecho, las tareas de memoria espacial producen un incremento moderado de los glucocorticoides que es necesario para el aprendizaje (Sandi, Loscertales y Guaza, 1997; Vaher et al., 1994). En concreto, la estimulación de los receptores MR hipocampales se asocia a un aumento de la PLP y al beneficio cognitivo, mientras que la estimulación de los receptores GR (que tendría lugar tras una muy elevada activación del eje) se asocia a un deterioro de la plasticidad hipocampal (Avital, Segal y Richter-Levin, 2006; Roozendaal, 2000). Así, una situación de estrés agudo demasiado aversiva que estimulara en exceso el eje HHA (p.ej. dosis de glucocorticoides combinadas con tareas de aprendizaje estresantes) podría deteriorar la consolidación en lugar de potenciarla (revisado en Roozendaal, 2000). La potenciación de la consolidación de la memoria tras estrés agudo también necesita la participación de la amígdala basolateral, que potencia la función mnésica mediante conexiones neuronales ipsilaterales con el hipocampo (Roozendaal, 2000; Roozendaal et al., 2006).

Sin embargo, el estrés crónico (normalmente definido como la presencia del estresor durante tres semanas o más) se considera una condición patológica con efectos negativos sobre el sistema inmune, el cerebro y la conducta (Jeckel et al., 2010; Joels et al., 2007). Gran parte de la literatura sobre el estrés crónico se ha centrado en la alteración del eje HHA a consecuencia de su activación mantenida en el tiempo. Los niveles de glucocorticoides suelen encontrarse elevados durante los primeros días de estrés crónico (aproximadamente durante la primera semana) y posteriormente pueden volver a los niveles iniciales (Joels et al., 2007; Kant et al., 1987, Figura 15), aunque también es frecuente encontrar hiper o hipocortisolemia (p.ej., Torner et al., 2009). El nivel basal de glucocorticoides tras estrés crónico sugiere una adaptación al estresor. Ésta es más probable cuando el estrés crónico consiste en un único estímulo repetido en el tiempo que cuando el protocolo de estrés alterna varios estresores (Magariños y McEwen, 1995; revisado en Joels et al., 2007). En cualquier caso, la reacción ante nuevos estresores suele ser mayor en los animales estresados crónicamente, lo cual sugiere una alteración del eje (Joels et al., 2007). La administración de dexametasona (un glucocorticoide sintético) no reduce los niveles de glucocorticoides en situaciones de estrés crónico y evidencia una inhibición deficitaria del eje HHA (p.ej., Mizoguchi et al., 2001). Esto puede deberse a cambios en la densidad y/o afinidad de los receptores adrenales (Roozendaal, 2000) y en los receptores MR y GR de áreas cerebrales encargadas de la inhibición del eje, como el hipocampo (Zhe, Fang y Yuxiu, 2008, Figura 15).

Efectos del estrés crónico sobre el hipocampo y la neurogénesis

El estrés crónico se asocia con la neurodegeneración en diferentes áreas cerebrales, especialmente el hipocampo. Estas consecuencias están mediadas, al menos en parte, por la acción prolongada de los glucocorticoides, ya que el hipocampo posee numerosos receptores para estas moléculas (Zhe, Fang y Yuxiu, 2008). El estrés crónico deteriora la conectividad hipocampal, produciendo acortamiento y desarborización dendrítica de las regiones CA1 y CA3 (especialmente en las dendritas apicales) y alteración de las sinapsis (Alfarez et al., 2008; Donohue et al., 2006; Gould, Woolley y McEwen, 1990; Magariños et al., 1996; Magariños, Verdugo y McEwen, 1997; McLaughlin et al., 2005; Vyas et al., 2002). También se hallan alteraciones en la morfología de las neuronas hipocampales (Fuchs, Uno y Flugge, 1995) y otros cambios estructurales en el hipocampo, como una reducción del volumen (Lee y Son, 2009) que puede afectar a las capas celulares acompañándose de disminución del número de neuronas (Sousa, Madeira y Paula-Barbosa, 1998). En concordancia, el estrés crónico promueve la muerte celular que podría estar mediada, al menos en parte, por la apoptosis (Lucassen et al., 2001). Además, el estrés crónico reduce la presencia de moléculas relevantes para la morfología y supervivencia celular en el hipocampo, como el BDNF (Murakami et al., 2005). A nivel fisiológico, es más difícil establecer PLP en las neuronas hipocampales de animales estresados crónicamente, mientras que se fortalece la DLP (Joels et al., 2007).

A las alteraciones morfológicas y plásticas en el hipocampo a consecuencia del estrés crónico, hay que añadir el deterioro de la neurogénesis hipocampal. El estrés crónico (y en ocasiones también el agudo, Gould et al., 1998) inhibe varias etapas de la neurogénesis, disminuyendo la proliferación (Heine et al., 2005), la supervivencia (Torner et al., 2009), la elección del fenotipo neuronal y la diferenciación en neurona madura (Oomen et al., 2009; Torner et al., 2009). Los mecanismos mediante los cuales el estrés crónico regula la neurogénesis hipocampal no se han determinado, y existen varias posibilidades no excluyentes entre sí. En cuanto a la proliferación, el estrés crónico reduce los factores de crecimiento asociados a vasculatura como el VEGF, y la población proliferativa asociada a vasos sanguíneos se afecta más gravemente por el estrés crónico que la proliferación no asociada a vasos (Heine et al., 2005). Además, la disminución de factores neurotróficos en el hipocampo también puede afectar a las diferentes etapas de la neurogénesis (Choi et al.,

2009; Scharfman et al., 2005). Otra posibilidad es la potenciación de factores inhibidores del ciclo celular, como el kip27, que arrestaría a las células en las fases tempranas del ciclo (Heine et al., 2004a). Por otra parte, los glucocorticoides son críticos para regular la proliferación, diferenciación y supervivencia de las nuevas células hipocampales, así como para regular los niveles de factores neurotróficos (Montaron et al., 2006; Murray, Smith y Hutson, 2008; Smith et al., 1995; Wong y Herbert, 2004). Aunque existe algún resultado en sentido opuesto, parece que la estimulación de ambos receptores de glucocorticoides, MR y GR, tiene efectos negativos sobre la neurogénesis (Wong y Herbert, 2005). Estos efectos pueden ser indirectos o bien directos sobre las nuevas células, que expresan receptores MR y GR conforme avanza su maduración (Cameron, Woolley y Gould, 1993; Garcia et al., 2004). También hay que considerar que efecto del estrés crónico sobre el hipocampo y la neurogénesis depende de numerosos factores relacionados con el protocolo de estrés. En este sentido, los estresores controlables e impredecibles ejercen una mayor activación del eje HHA en comparación con los controlables o predecibles (Joels et al., 2007), lo cual influiría en la neurogénesis. Por ejemplo, el estrés de inmovilización (que puede ser altamente predecible) y el estrés crónico de intensidad moderada reducen la supervivencia de las nuevas células sin afectar a la proliferación (Lee y Son, 2009; Torner et al., 2009). Además, el efecto de algunos estresores sobre la neurogénesis, como la inmovilización, puede ser diferente en ratas y ratones (Bain, Dwyer y Rusak, 2004).

En cualquier caso, el estrés crónico se considera uno de los más potentes inhibidores de la neurogénesis adulta en el giro dentado. En concordancia, produce alteraciones conductuales relacionadas con la función hipocampal, como la memoria espacial a largo plazo y de trabajo (revisado en Conrad, 2010), el condicionamiento del miedo (Miracle et al., 2006), el reconocimiento de objetos (Beck y Luine, 1999) y el aumento de conductas relacionadas con la ansiedad y depresión (Murray, Smith y Hutson, 2008). Sin descartar otros mecanismos complementarios, el deterioro conductual inducido por estrés crónico se ha asociado a la reducción de la neurogénesis hipocampal (Lagace et al., 2010). Además, la reducción de la neurogénesis podría explicar el papel del estrés como desencadenante de patología cognitiva y emocional en trastornos como la depresión mayor y la esquizofrenia (Kempermann, Krebs y Fabel, 2008; Pittenger y Duman, 2008). Por tanto, resulta relevante el estudio de nuevas moléculas que pudieran regular la afectación de la neurogénesis en situaciones de estrés crónico, como es el caso del ácido lisofosfatídico.

4.- El Ácido Lisofosfatídico (LPA)

El LPA: Estructura, síntesis y degradación

Los lisofosfolípidos son moléculas que intervienen en la biosíntesis de la membrana lipídica, pero han ganado un gran interés en la última década por sus funciones de señalización extracelular. El ácido lisofosfatídico (LPA, 1- ó 2 acil-*sn*-glicerol-3-fosfato, Figura 16) es un lisofosfolípido endógeno biológicamente activo que se une a receptores de membrana específicos acoplados a proteína G (LPA₁₋₆). En ratones y humanos, el LPA está presente en gran cantidad de fluidos como el suero (Aoki et al., 2002), la saliva (Sugiura et al., 2002), el fluido seminal (Hama et al., 2002), el fluido folicular (Tokumura et al., 1999) y el líquido cefalorraquídeo (Sato et al., 2005), siendo el suero la fuente de LPA mejor caracterizada. El LPA promueve la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de las células, y sus receptores se expresan en abundantes tejidos y tipos celulares (Choi et al., 2010; Fujiwara et al., 2003; Noguchi et al., 2009; Pilpel y Segal, 2006; Rhee et al., 2006). De este modo, el LPA interviene en importantes procesos biológicos como la neurogénesis, la mielinización, la formación de vasos sanguíneos, la reproducción, la inducción del dolor neuropático y la progresión tumoral (Aoki, Inoue y Okudaira, 2008; Fukushima et al., 2001; Sengupta et al., 2004; Tokumura, 2004), siendo incluso relevante en procesos cognitivos como la consolidación de la memoria espacial a largo plazo (Dash et al., 2004). En el sistema nervioso, el papel del LPA como promotor de la neurogénesis y gliogénesis es crucial durante el neurodesarrollo (Choi et al., 2010; Estivill-Torrús et al., 2008; Moolenaar, van Meeteren y Giepmans, 2004; Noguchi et al., 2009) y también en la neurogénesis adulta (Matas-Rico et al., 2008).

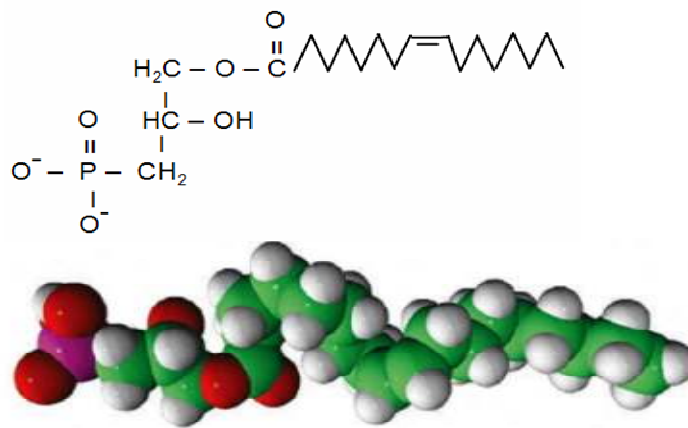


Figura 16. Estructura química del LPA. El LPA es un lípido simple con una estructura de fosfato (PO_4^{3-}) y glicerol ($C_3H_8O_3$) sobre la que se asienta una cadena lipídica de grado de saturación y longitud variables.

Se conocen dos vías principales para la síntesis del LPA: a partir de lisofosfolípidos, en el suero y en el plasma, y a partir de ácido fosfatídico, en la membrana celular. En el suero y el plasma, el LPA se sintetiza a partir de lisofosfolípidos como la lisofosfatidilcolina, la lisofosfatidiletanolamina y la lisofosfatidilserina (Aoki, 2004). Estos lisofosfolípidos se pueden producir por la acción de las enzimas fosfolipasas A_1 y A_2 sobre fosfolípidos segregados por plaquetas activadas durante la coagulación de la sangre (Figura 17); o bien a partir de lipoproteínas plasmáticas por la acción de enzimas como la lecitincolesterol

acetiltransferasa o similares a la fosfolipasa A₁ (Aoki, 2004; Aoki, Inoue y Okudaira, 2008; Aoki et al., 2002). De este modo, los lisofosfolípidos se pueden sintetizar por una vía dependiente o independiente de las plaquetas, de forma que cada una de estas vías es responsable de, aproximadamente, la producción de la mitad del LPA presente en el suero (Aoki et al., 2002). En ambos casos, los lisofosfolípidos se convierten en LPA gracias a la acción de la enzima autotaxina (Figura 17). La autotaxina (ATX, enzima lisofosfolipasa-D) es abundante en la sangre y promueve la migración celular, además de estar implicada en la progresión tumoral, el dolor neuropático, la obesidad y la diabetes (revisado en Aoki, Inoue y Okudaira, 2008). Los niveles de ATX correlacionan con los de LPA y se ha comprobado que en su ausencia no se produce LPA en el suero ni en el plasma (Aoki, Inoue y Okudaira, 2008; Tanaka et al., 2006; Tsuda et al., 2006). La autotaxina también está presente en el líquido cefalorraquídeo e interviene en la síntesis del LPA en este medio (Sato et al., 2005).

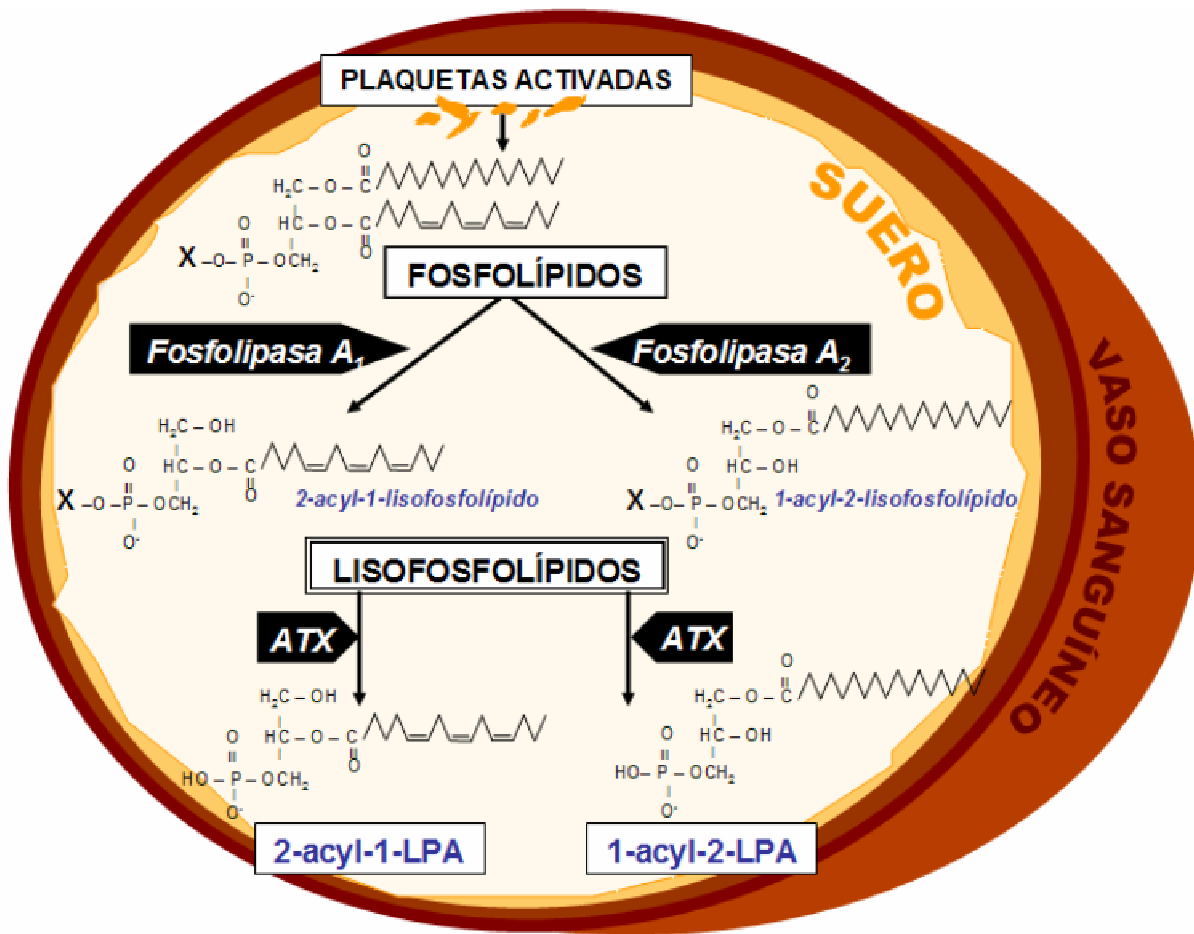


Figura 17. Vía de síntesis del LPA en el suero a partir de lisofosfolípidos, mediada por las plaquetas. En esta vía, los lisofosfolípidos se producen a partir de los fosfolípidos liberados por las plaquetas activadas durante la coagulación de la sangre. Existe otra vía de síntesis de LPA en el suero en la que los lisofosfolípidos se producen independientemente de las plaquetas (ver texto). Ambas vías son igualmente importantes y requieren la acción de la autotaxina (ATX). Figura adaptada de Aoki, 2004; Aoki, Inoue y Okudaira, 2008.

Por otra parte, el LPA también puede sintetizarse en la membrana de las células. Este mecanismo se ha descrito en plaquetas y células cancerígenas (Aoki, Inoue y Okudaira, 2008; Fourcade et al., 1995; Shen et al., 1998), aunque las enzimas fosfolipasas implicadas en este proceso se han identificado también en otros tipos celulares, como en neuronas y células gliales (Nardicchi et al., 2007; Woelk et al., 1981). En esta vía, el LPA

se sintetiza a partir de ácido fosfatídico, que se genera en la capa interior de la membrana celular a partir de diacilglicerol o de fosfolípidos, y luego se transloca a la capa exterior mediante un mecanismo aún desconocido (Aoki, 2004; Aoki, Inoue y Okudaira, 2008; Figura 18). La localización del ácido fosfatídico en la capa exterior de la membrana lipídica es fundamental para que pueda ser sustrato de las enzimas fosfolipasas A_1 y A_2 , cuya reacción con el ácido fosfatídico da lugar al LPA que es liberado al medio extracelular (Figura 18). La cantidad de LPA que se sintetiza por esta vía es bastante inferior a la que se sintetiza en el suero, ya que el ácido fosfatídico es un componente escaso en las células (Aoki, Inoue y Okudaira, 2008). Sin embargo, esta vía permite generar LPA rápidamente y en respuesta a estímulos, por lo que podría tener un rol funcional relevante (Aoki, 2004; Aoki, Inoue y Okudaira, 2008). Finalmente, existe una vía de síntesis intracelular de LPA a partir del glicerol 3-fosfato. El LPA sintetizado a partir de esta vía constituye un metabolito importante para la síntesis intracelular de productos como triacilglicerol u otros lisofosfolípidos, pero no se conoce que se libere al medio extracelular (Dircks y Sul, 1999).

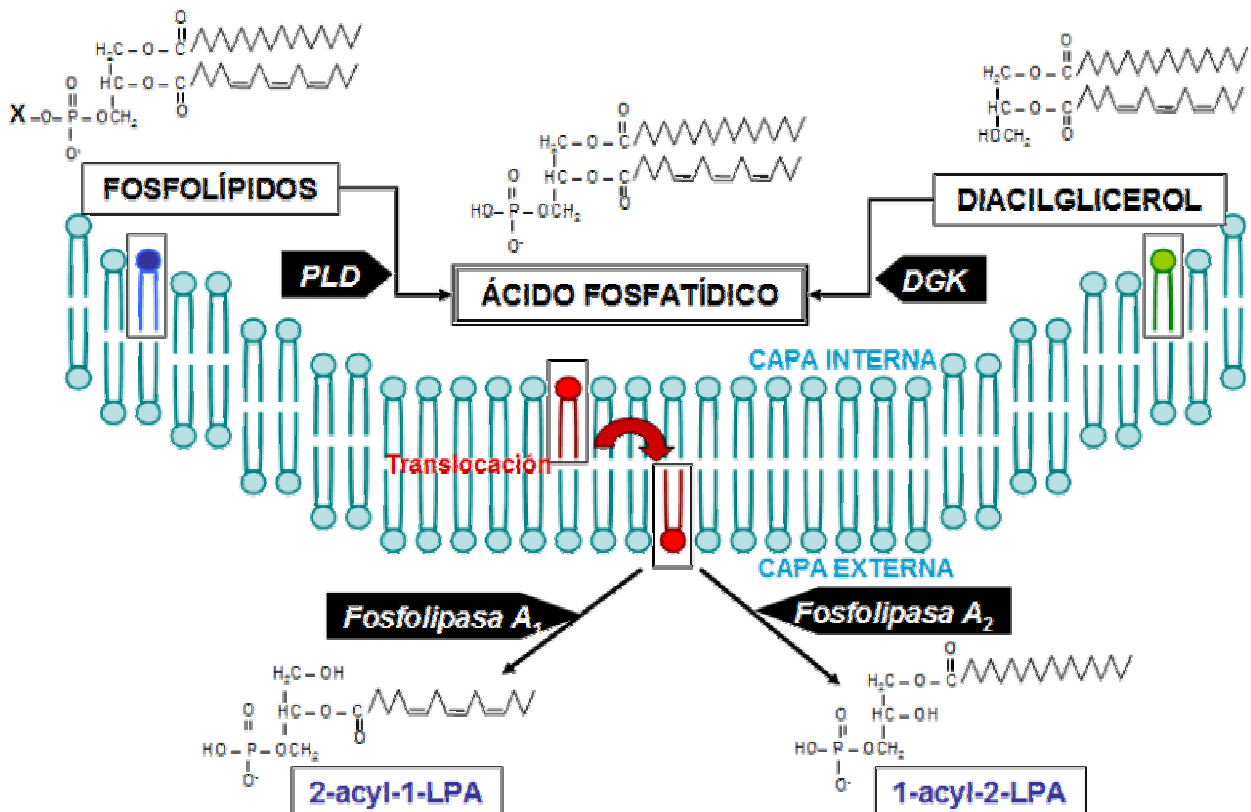


Figura 18. Vía de síntesis del LPA a partir del ácido fosfatídico. En esta vía, el ácido fosfatídico se genera por la acción de la fosfolipasa D (PLD) o de la kinasa diacilglicerol (DGK), se transloca a la capa externa de la membrana plasmática y luego se convierte en LPA por la acción de la enzima fosfolipasas A_1 ó fosfolipasa A_2 (adaptado de Aoki, Inoue y Okudaira, 2008).

Como resultado de los distintos procesos de síntesis, existen distintas especies de LPA en función de la longitud y saturación de su cadena de ácidos grasos y en función de su lugar de unión a la estructura de glicerol. Así, el LPA puede llevar acoplados distintos ácidos grasos saturados (18:0, 16:0) o insaturados (18:1, 18:2, 20:4; con doble enlace entre los átomos de carbono) unidos a la posición *sn*-1 ó *sn*-2 de la formación glicerol. Es importante destacar que estas especies de LPA o análogos del LPA presentan una actividad biológica diferente, en tanto que su afinidad por los distintos receptores de LPA es distinta (Bandoh et al., 2000). En términos generales, el LPA con cadena de ácidos grasos insaturados como el 18:1-LPA, sintetizado por las enzimas fosfolipasas A_1 , tiene

mayor actividad biológica que el LPA con cadena ácidos grasos saturados, sintetizado por la enzima fosfolipasa A₂ (Bandoh et al., 2000; Hayashi et al., 2001; Yoshida et al., 2003). Por otra parte, también se debe mencionar que, en los fluidos biológicos, el LPA se encuentra asociado a proteínas para su transporte. La principal proteína ligadora del LPA en el suero y en el plasma es la albúmina, cuya concentración es abundante en este medio (Hama et al., 2002). La proteína de transporte que se encuentre unida al LPA también es un factor que podría influir en su actividad biológica. De este modo, se ha demostrado que el LPA en plasma (rico en albúmina) activa los receptores LPA₁₋₂, pero no el LPA₃; mientras que el LPA en fluido seminal (sin albúmina) activa el receptor LPA₃ y no los LPA₁₋₂ (Hama et al., 2002).

Existen varias vías responsables de la degradación y metabolización del LPA (Tigyi y Parrill, 2003). La más conocida se atribuye a la acción de las enzimas fosfatasa de lípidos, que se encuentran en la membrana plasmática con el dominio catalítico en el espacio extracelular (Pilquill et al., 2001). Estas enzimas metabolizan el LPA en monoacilglicerol, de escasa actividad biológica, y reducen la concentración extracelular del LPA y sus efectos sobre las células (Brindley, 2004; Meyer zu Heringdorf y Jakobs, 2007; Pilquill et al., 2001; Pyne, Kong y Darroch, 2004) aunque este mecanismo también puede dar lugar a un incremento compensatorio de la liberación de LPA (Pyne, Kong y Darroch, 2004). Adicionalmente, la acción de las enzimas fosfatasa sobre el ácido fosfatídico da lugar a diacilglicerol, cuya acción a nivel intracelular podría modular los efectos del LPA (Brindley, 2004). Por otra parte, es importante destacar que la señalización del LPA también está regulada por la desensibilización e internalización de sus receptores en respuesta al LPA o a otras moléculas (Urs, Kowalczyk y Radhakrishna, 2008).

Receptores de LPA: Implicaciones en el sistema nervioso

Hasta los años 90, se postulaba que la actividad biológica de los lisofosfolípidos tenía lugar como resultado de la disrupción inespecífica de la membrana celular, de forma similar al detergente. Sin embargo, un estudio pionero de van Corven et al. (1989) demostró que los efectos proliferativos del LPA sobre los fibroblastos estaban mediados por proteínas G. El primer gen que codificaba para un receptor de LPA, el receptor LPA₁, se identificó en 1996 durante un estudio de la génesis cortical y se denominó inicialmente *vzg-1* (de *ventricular zone gen-1*) por su elevada expresión en la zona subventricular que correlacionaba con las etapas de proliferación celular (Hecht et al., 1996).

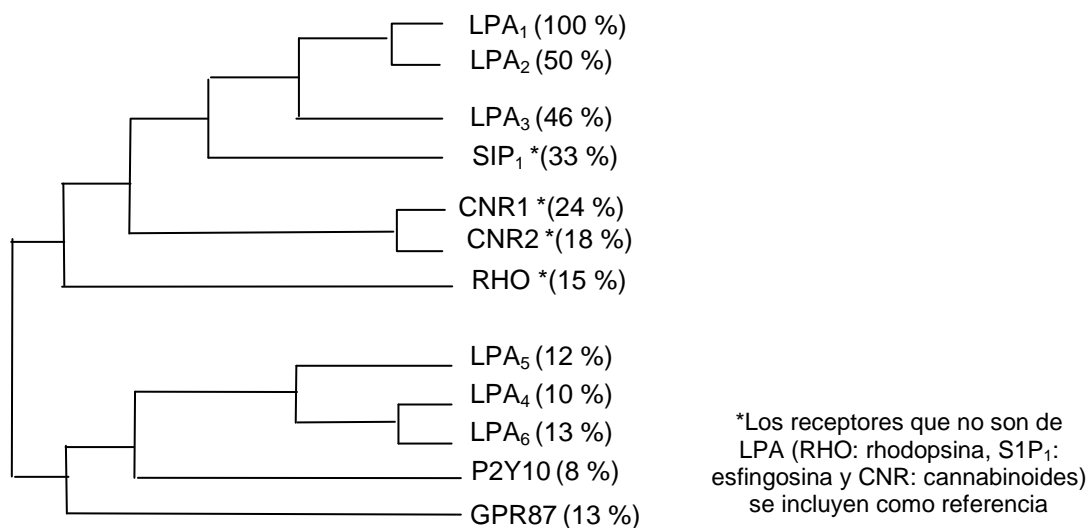


Figura 19. Esquema de la relación filogenética de los receptores de LPA, en función de su grado de homología (Choi et al., 2010). Entre paréntesis se muestra el % de homología de aminoácidos que comparte cada receptor con respecto al LPA₁.

Desde entonces, varios estudios han demostrado que el LPA ejerce sus efectos de señalización extracelular mediante al menos seis receptores de alta afinidad por el LPA acoplados a proteína G, con siete dominios transmembrana (revisados en Choi et al., 2010; Choi et al., 2009; Hecht et al., 1996; Moolenaar, van Meeteren y Giepmans, 2004). Los receptores de LPA pueden clasificarse en dos subgrupos en función de su grado de homología (Choi et al., 2010; Figura 19). El primer subgrupo recibe el nombre de “Edg” (de *endothelial differentiation gene*) y comprende a los receptores LPA₁/EDG2, LPA₂/EDG4 y LPA₃/EDG7. En la familia EDG también se encuentran receptores para otros lípidos, como la esfingosina. Todos estos receptores comparten, aproximadamente, el 50 % de los aminoácidos (Aoki, Inoue y Okudaira, 2008). El segundo subgrupo incluye los receptores Gpr23/p2y9/LPA₄, Gpr92/LPA₅, p2y5/LPA₆, Gpr87 y p2y10. Estos receptores son similares entre sí en un 35 % de los aminoácidos, aproximadamente, pero comparten menos homología con los receptores LPA₁₋₃, lo cual indica una menor relación filogenética con éstos (Aoki, Inoue y Okudaira, 2008). Aunque los receptores Gpr87 y p2y10 son propuestos como receptores de LPA, aún no se ha confirmado suficientemente su afinidad por esta molécula (Choi et al., 2010) y por tanto no se consideran en lo sucesivo.

Receptor:	LPA ₁		LPA ₂		LPA ₃		LPA ₄		LPA ₅	
	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H
Cerebro embrionario	+++	NA	++++	NA	+	NA	++	NA	+	NA
Cerebro adulto	++++	+++	+	-	++	++	-	++	NA	NA
Pulmón	+++	++	+++	-	++++	+++	-	-	+++	-
Corazón	++	+++	+	-	++	++++	+++	++	+++	+++
Intestino delgado	+++	+++	-	-	+++	-	-	++	++++	+++
Estómago	++	NA	++	NA	++	-	-	NA	+++	NA
Riñón	++	+++	++++	-	++++	-	-	-	++	-
Músculo esquelético	++	++	-	-	-	-	NA	-	-	-
Útero	++++	NA	++++	NA	++++	NA	++	NA	NA	NA
Ovario	++	+++	NA	-	+	+++	+++	++++	NA	NA
Testículos	+++	+++	++++	++++	++++	++++	-	++	++	NA
Placenta	++	+++	NA	-	++	+	NA	-	NA	+++
Próstata	+	+++	NA	+++	NA	++++	NA	++	NA	-
Colon	NA	+++	NA	-	NA	+	NA	++	+++	++
Bazo	++	++	++	+++	++	-	-	++	+++	++++
Timo	++	+++	++	+++	++	-	+	+++	+++	-
Páncreas	+	+++	NA	+++	NA	++++	NA	+++	NA	NA
Piel	+	NA	NA	NA	NA	NA	++	NA	+++	NA
Hígado	-	+	-	-	-	-	-	-	+++	++
Leucocitos	+	+	NA	++++	NA	-	NA	-	NA	-

Tabla 2. Expresión de los receptores LPA₁₋₅ en ratón (R) y humano (H). ++++: Alta; +++: Moderada; ++: Baja; +: Baja/Inconsistente; -: Sin expresión; NA: No analizado. (Adaptado de Choi et al., 2010).

Los receptores de LPA se caracterizan por una amplia distribución tisular que varía en función del receptor, siendo el LPA₁ el que más se expresa en el tejido nervioso (Tabla 2,3). Por otra parte, estos receptores también difieren en las vías de señalización intracelular a las que se encuentran asociados. De este modo, pueden acoplarse a varios tipos de proteínas G: G_{α12/13}, G_{αi0}, G_{αqi/11} y G_{α5}, que activan diferentes vías de señalización (Figura 20). La proteína G_{α12/13} activa la proteína rho y está asociada a los receptores de LPA_{1,2,4,5} y LPA₆. Esta vía se ha implicado en muchas de las respuestas neurotróficas inducidas por el LPA, como la proliferación y migración (rho-ROCK, Yan, Lu y Rivkees,

2003), cambios en el citoesqueleto como la esfericidad celular, la formación de fibras de estrés y la retracción de neuritas (Fukushima, Kimura y Chun, 1998; Ishii et al., 2000), la inducción de muerte celular por apoptosis (revisado en Ye et al., 2002), el dolor neuropático (Inoue 2004) y la consolidación de la memoria espacial a largo plazo (rho-ROCK, Dash et al., 2004). Por otra parte, la activación de la vía PI₃K, asociada a la proteína G_{αi/0}, favorece la supervivencia (efectos antiapoptóticos, Ye et al., 2002) y también la migración y proliferación celular (vía akt, Kim, Keys y Eckhart, 2006; Yan, Lu y Rivkees, 2003), mientras que la vía de la fosfolipasa C participa en la acumulación y movilización del calcio intracelular (Choi et al., 2010). Hasta la fecha se han descrito diversos agonistas y antagonistas de los receptores de LPA (Choi et al., 2010), sobre todo dirigidos a los receptores LPA₁₋₃. Sin embargo estos compuestos no son específicos para uno solo de los receptores, y serían necesarios más estudios para precisar su farmacocinética y farmacodinamia.

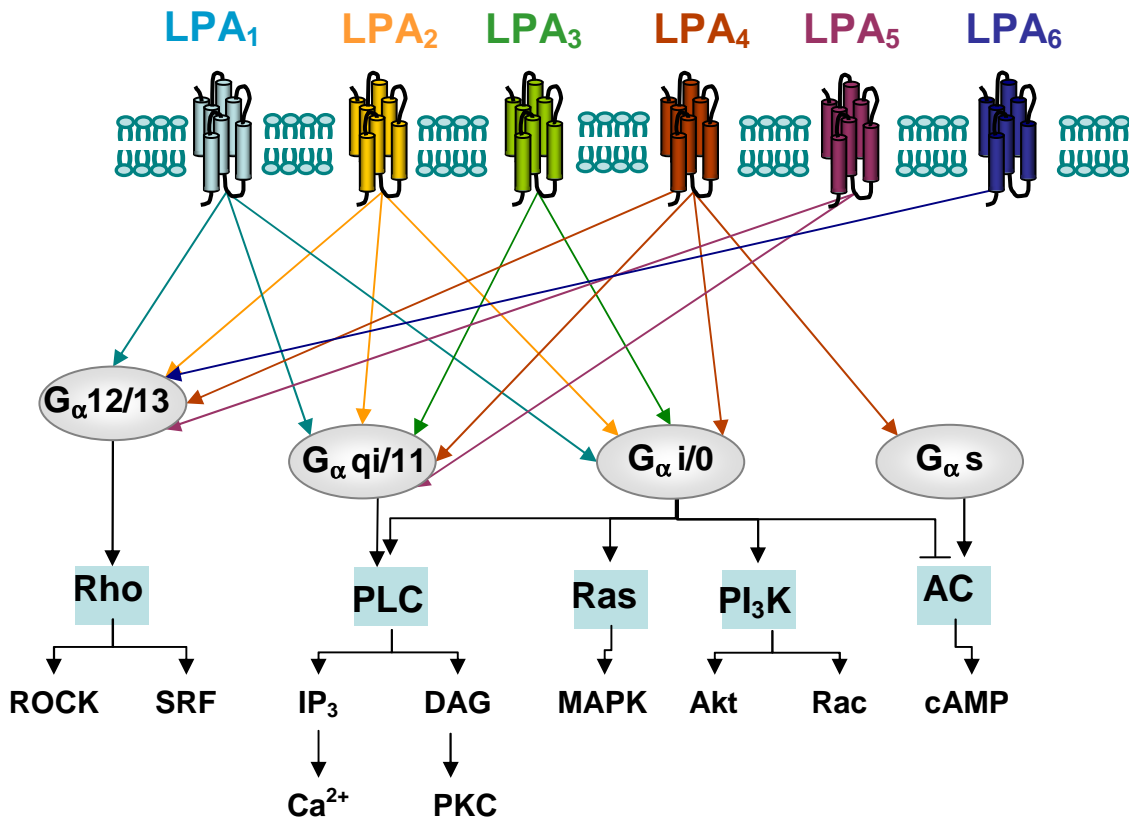


Figura 20. Vías de señalización intracelular asociadas a los receptores de LPA₁₋₆. PLC: fosfolipasa C; IP₃: Inositol trifosfato; DAG: Diacilglicerol; PI₃K: fosfatidilinositol 3-quinasa,; MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno; AC: Adenilciclase, (Choi et al., 2010).

Tipo celular	Receptor	Respuesta al LPA
Precursor Neural	LPA ₁ , LPA ₂	Proliferación, diferenciación (se inhibe con dosis patológicas de LPA), retracción de neuritas, esfericidad celular, cambio de conductancia.
Neurona	LPA ₂ *	Retracción de neuritas, esfericidad celular, colapso de conos de crecimiento, inhibición de migración, supervivencia, apoptosis.
Oligodendrocito	LPA ₁	Esfericidad celular, formación (maduración) y retracción de procesos.



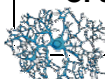
	Astrocito	LPA ₁₋₅	Proliferación, alteración de captación de glutamato, cambios citoesqueléticos, producción de oxígeno reactivo, secreción de factor de diferenciación neuronal.
	Microglía	LPA ₁ , LPA ₃	Aumento de actividad metabólica (proliferación), aumento de quimiotaxis.
	C. de Schwann	LPA ₁ , LPA ₂	Supervivencia, diferenciación, cambios de citoesqueleto, desmielinización.

Tabla 3. (Viene de la página anterior) Expresión de los receptores de LPA en los distintos tipos celulares del tejido nervioso y algunas de sus respuestas al LPA (Noguchi et al. 2009) *Otros autores (p.ej. Pilpel y Seagal, 2006) hallan expresión del receptor LPA₁ en neurona madura.

El receptor LPA₁ (Lpar1, LPAR1, EDG2, vzg-1)

La implicación del receptor LPA₁ en la neurogénesis hipocampal y en la conducta dependiente de hipocampo, en situaciones basales y de estrés crónico, será el objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. El receptor LPA₁ es el primer receptor de LPA identificado y del que más información se dispone. Comprende una proteína de 41-kDa de masa molecular con 364 aminoácidos (Choi et al., 2010). En ratones y humanos, el LPA₁ se halla en una amplia gama tejidos como el útero, testículos, hígado, pulmón, intestino, corazón, estómago, riñones, timo, bazo placenta y músculos; pero el cerebro, tanto embrionario como adulto, es uno de sus principales locus de expresión (Contos, Ishii y Chun, 2000; Choi et al., 2010; Ye, 2008). Durante el desarrollo del sistema nervioso, el receptor LPA₁ se expresa en precursores neuronales localizándose en la principal zona de neurogénesis cortical embrionaria (zona subventricular) y en una capa superficial que incluye las meninges (Estivill-Torrus et al., 2008; Hecht et al., 1996; Figura 21).

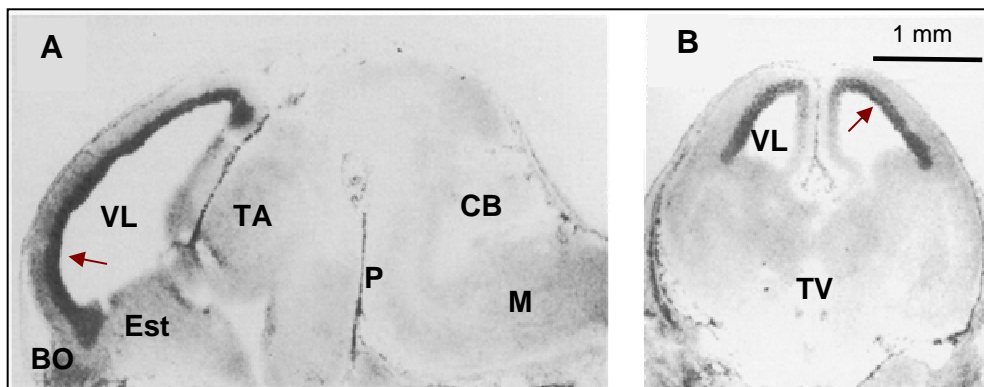


Figura 21. Expresión del receptor LPA₁ (flechas) en la zona subventricular del sistema nervioso central de embrión de ratón (E14). Corte sagital (A) y coronal (B). Ctx: Cortex, VL: Ventrículo lateral, BO: Bulbo olfatorio; Est: Estriado; TA: Tálamo; P: Puente; CB: Cerebelo; M: Médula, TV: Tercer ventrículo. (Hecht et al., 1996).

La zona subventricular embrionaria desaparece al final de la neurogénesis cortical, justo antes del nacimiento. Sin embargo, el receptor LPA₁ continúa expresándose en el cerebro postnatal en oligodendrocitos y células de Schwann, coincidiendo con la mielinización (Hecht et al., 1996; Weiner, Hecht y Chun, 1998). La expresión de LPA₁ es menor en el cerebro adulto, pero se ha identificado en neuronas adultas (Allard et al., 1998; Fujiwara et al., 2003; Fukushima et al., 2002; Pilpel y Segal, 2006), en oligodendrocitos

(Handford et al., 2001; Weiner, Hecht y Chun, 1998), astrocitos (Shano et al., 2008; Tabuchi et al., 2000) y microglía (Moller et al., 2001; Tham et al., 2003; Tabla 3), en estudios realizados en vivo y en vitro. En el hipocampo, el receptor LPA₁ se halla en las neuronas piramidales de las áreas CA1-3 (ratas de 1-2 semanas de edad, Pilpel y Segal, 2006), en células progenitoras derivadas del hipocampo (Rhee et al., 2006) y en glía (Handford et al. 2001). A la luz de su papel como modulador de la neurogénesis hipocampal adulta, es posible que el LPA₁ también se exprese en los precursores y nuevas neuronas de la ZSG (Matas-Rico et al., 2008; datos sin publicar).

El receptor LPA₁ se acopla a tres tipos de proteínas G: G_{α12/13}, G_{αi/0} y G_{αq/11}, activando las vías de señalización de la proteína rho, la fosfolipasa C, ras y fosfatidilinositol 3-quinasa, e inhibiendo la vía de la adenil ciclasa (revisadas en Choi et al., 2010; Figura 20). A través de estas vías, el LPA₁ induce numerosas respuestas celulares como proliferación, diferenciación, supervivencia, migración, cambios en el citoesqueleto y movilización del calcio intracelular (Anliker y Chun, 2004; Choi et al., 2010; Fujiwara et al., 2003; Fukushima, Ye y Chun, 2002; Goetzl et al., 2002; Lynch y Macdonald, 2002; Noguchi et al., 2009; Pilpel y Segal, 2006; Rhee et al., 2006). Este receptor ha demostrado una elevada afinidad para un amplio rango de especies de LPA, tanto ligado a ácidos grasos saturados como insaturados (Bandoh et al., 2000).

Los animales transgénicos que no expresan los receptores de LPA constituyen una importante herramienta para comprender sus funciones. Los ratones carentes del receptor LPA₁ fueron descritos por primera vez por Contos et al. (2000), eliminando el exón de los dominios transmembrana I-VI. Aunque viables, estos animales presentaron un 50 % de muerte neonatal, alteraciones craneoencefálicas (hocico achatado, ojos más separados), menor tamaño corporal, hematomas frontales y menor número de células de schwann con incremento de apoptosis en el nervio ciático (Contos et al., 2000; Figura 22). También mostraron alteraciones olfativas que afectaron a la conducta de mamar y que sugieren un desarrollo anormal del bulbo olfatorio o del lóbulo frontal. Además, sus neuroblastos presentan menor proliferación, migración y esfericidad celular tras administrar LPA (Contos et al., 2000), lo cual indica que el LPA₁ media estas respuestas celulares. Aunque estos mutantes no poseían alteraciones cerebrales aparentes, posteriormente se describió la variante Málaga de los ratones nulos para el LPA₁ (maLPA₁ nulos, Estivill-Torrus et al., 2008) que derivó espontáneamente de la colonia original (Contos et al., 2000). Además de presentar características morfológicas similares a sus predecesores, el análisis de su corteza cerebral reveló un incremento de apoptosis embrionaria y postnatal acompañada de menor proliferación durante el neurodesarrollo. A consecuencia de la alteración en este proceso, los maLPA₁-nulos en edad adulta presentan una reducción de la masa y volumen cerebral con alteración de la densidad y distribución de las neuronas de la corteza motora (Estivill-Torrus et al., 2008; Figura 22), además de una mielinización defectuosa del sistema nervioso central (García-Díaz et al., 2007). En definitiva, el conjunto de datos disponibles en relación a los ratones nulos para el LPA₁ confirman el papel de este receptor en la proliferación, migración y supervivencia celular durante el neurodesarrollo, afectando de forma crítica a la neurogénesis y a la mielinización.

Por otra parte, el estudio de los ratones maLPA₁-nulos también ha revelado la participación de este receptor en la neurogénesis hipocampal adulta (Matas-Rico et al., 2008; Figura 22). La neurogénesis en ausencia de LPA₁ se caracteriza por una menor proliferación y diferenciación de las nuevas neuronas del giro dentado, mostrándose una elección defectuosa del fenotipo neuronal y glial y mayor porcentaje de neuronas jóvenes DCX+ en los primeros estadios de su desarrollo. En respuesta al enriquecimiento ambiental, los mutantes presentan un incremento inferior de la supervivencia y proliferación celular y una regulación alterada de factores tróficos (BDNF, NGF, IGF-1), lo cual podría explicar este efecto. Es importante mencionar que no se hallan alteraciones anatómicas en el giro dentado de los LPA₁-nulos. Por tanto, su déficit neurogénico se explicaría por la ausencia del receptor LPA₁ en la edad adulta y no sería consecuencia de defectos

vasculares o estructurales en el neurodesarrollo del giro dentado (Matas-Rico et al., 2008). De este modo, el receptor LPA_1 promueve la neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales y en respuesta a cambios ambientales como el enriquecimiento. Tendría interés, por tanto, evaluar su posible implicación en situaciones patológicas que dañan la neurogénesis como es el caso del estrés crónico, lo cual se propondrá como uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral.

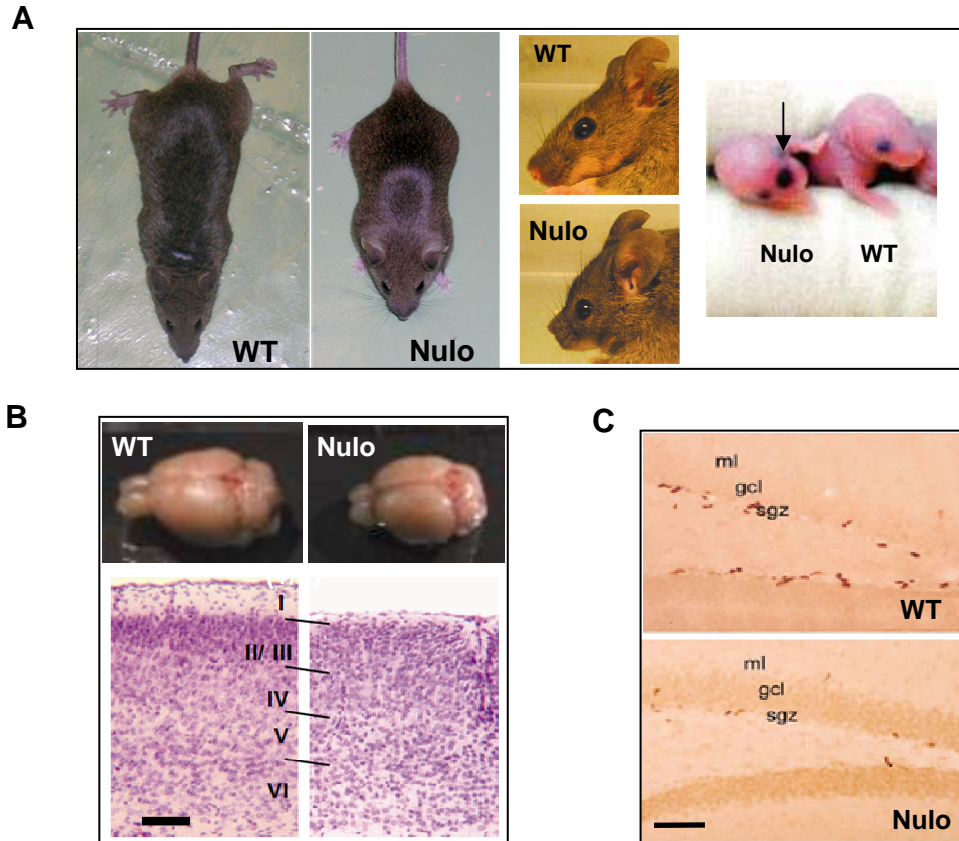


Figura 22. Ratones nulos para el receptor LPA_1 . Los ratones carentes de LPA_1 (Nulo) presentan dismorfismo craneoencefálico, menor tamaño corporal y hematomas frontales (A, Contos et al., 2000; Estivill-Torrus et al., 2008). La variante Málaga de los LPA_1 nulos muestra menor tamaño cerebral, alteraciones en la celularidad de la corteza (B; Estivill-Torrús et al., 2008) y menor neurogénesis adulta (proliferación) en el giro dentado del hipocampo (C; Matas-Rico et al., 2008) en comparación con los animales normales o wild type (WT). ml: capa molecular; gcl: capa granular; sgz: zona subgranular. Escalas: 100 μ m.

Por otra parte, el *screening* neurológico de los mutantes de LPA_1 muestra déficit en el olfato y en la somestesia y en funciones motoras (reflejo de grasping, coordinación de las patas y fuerza neuromuscular), aunque no en funciones retinales o auditivas (Santín et al., 2009, Tabla 4). Este deterioro podría explicarse, al menos en parte, por las ya mencionadas alteraciones en el neurodesarrollo que afectan a la mielinización (Contos et al., 2000; García-Díaz et al., 2007) y a estructuras cerebrales como el bulbo olfatorio (Contos et al., 2000) y la corteza motora (Estivill-Torrus et al., 2008) en ausencia de LPA_1 . Además, la alteración en la neurogénesis adulta debería tener implicaciones funcionales y afectar a los procesos cognitivos que dependen del hipocampo, como la memoria espacial (Leuner y Gould, 2010). Sin embargo, únicamente se ha descrito un déficit moderado de memoria espacial a largo plazo en los ratones nulos de LPA_1 , consistente en menor recuerdo y escaso uso de estrategias espaciales en el laberinto acuático pero con adquisición correcta de la tarea (Santín et al., 2009, Tabla 4). Adicionalmente, mostraron un

incremento de las conductas de ansiedad y déficit de exploración (Santín et al., 2009, Tabla 4). Es probable que un análisis conductual más exhaustivo (empleando otro paradigma comportamental que incrementara la dificultad de la tarea y considerando las alteraciones emocionales y motoras de estos animales) pudiera revelar déficit cognitivos más profundos. Por tanto, otro de los objetivos que se propondrán en esta Tesis Doctoral será el de precisar los correlatos comportamentales de la alteración de la neurogénesis hipocampal en los ratones que no expresan el receptor LPA₁.

Déficit	Descripción
Alteración de reflejos motores y otros déficit neurológicos	Presentan menor fuerza neuromuscular (tiempo que pueden permanecer boca abajo, agarrados a una rejilla) y una alteración moderada del equilibrio (habilidad para caminar por una barra elevada) y del reflejo de <i>grasping</i> (habilidad para agarrar un alambre cuando roza sus patas delanteras, mientras se encuentran suspendidos por la cola). No están alterados otros reflejos como los de enderezamiento (Santín et al., 2009). Déficit en el olfato (Contos et al., 2000; Santín et al., 2009), en la somestesia (tiempo que tardan en mover la cola sumergida en agua fría; Santín et al., 2009) y en la percepción de dolor neuropático (Inoue et al. 2004). Preservan las funciones retinales y auditivas (Santín et al., 2009).
Reducción de la exploración	Presentan menor actividad, tanto en contextos nuevos (distancia recorrida en el primer ensayo del campo abierto y del laberinto acuático) como familiares (no incrementan la velocidad a lo largo de un entrenamiento en el laberinto acuático; Santín et al., 2009).
Déficit de memoria espacial a largo plazo	Adquieren la localización de la plataforma oculta a lo largo de un entrenamiento en el laberinto acuático. Sin embargo, emplean menos estrategias espaciales en el último día. En el ensayo de recuerdo (24 horas después) pasan menos tiempo en el cuadrante que contenía la plataforma (Santín et al., 2009). No se hallan alteraciones al invertir la localización de la plataforma.
Incremento de la ansiedad	Demuestran una mayor respuesta de ansiedad cuando son expuestos por primera vez a contextos ansiogénicos (primer ensayo en el laberinto elevado en cruz y laberinto acuático de Morris). Por otra parte, este incremento también se halla en contextos familiares (segundo ensayo en el laberinto elevado en cruz y en campo abierto), lo cual podría implicar un déficit de habituación de la ansiedad (Santín et al., 2009).
Déficit en la inhibición prepulso	No inhiben el reflejo de sobresalto ante un tono tras haberse presentado un tono previo. Este déficit se ha hallado en machos y hembras con estímulos sonoros de distintas características (Harrison et al., 2003).

Tabla 4. Déficit conductuales en los ratones nulos de LPA₁. Estos déficit se hallaron atenuados o ausentes en los ratones heterocigotos para el receptor (Santín et al., 2009).

También se ha demostrado que los ratones carentes de LPA₁ presentan un deterioro de la inhibición prepulso del reflejo de sobresalto (Harrison et al., 2003). La inhibición prepulso refleja la capacidad de filtrar información auditiva irrelevante, evitando la sobrecarga sensorial, y su alteración se relaciona con algunas psicosis como la esquizofrenia (revisado en van den Buuse, 2010). Este resultado, junto con el patrón neuroquímico que presentan

los LPA₁-nulos (alteración de los sistemas de 5-HT, GABA y glutamato; Cunningham et al., 2006; Harrison et al., 2003; Roberts et al., 2005), ha llevado considerarlos como un modelo animal de esquizofrenia (Choi et al., 2010; Desbonnet, Waddington y Tuathaigh, 2009; Harrison et al., 2003; Roberts et al., 2005; van den Buuse, 2010). Esta propuesta también se apoya en sus ya mencionados déficit en el neurodesarrollo y en la neurogénesis hipocampal y, además, los pacientes esquizofrénicos presentan menor expresión del gen *Lpar1* (Bowden et al., 2006). Por tanto, es esperable que los ratones nulos de LPA₁ ganen interés en los próximos años como modelo para el estudio de esta patología. El receptor LPA₁ también es relevante en muchos otros campos de la biomedicina. En este sentido, la respuesta de dolor neuropático tras la administración de LPA está mediada por LPA₁ (Renback et al., 2000). De hecho, se ha demostrado que la señalización del LPA₁ (vía Rho) es necesaria para que el dolor neuropático tenga lugar, de forma que los ratones nulos no muestran signos de dolor neuropático ni desmielinización tras daño en el nervio periférico (Inoue et al., 2004). Gracias a sus efectos en la proliferación y migración celular, el receptor LPA₁ también tiene un importante papel en la progresión tumoral (Murph et al., 2008) y en la reparación de tejidos, como ocurre en el daño pulmonar (revisado en Choi et al., 2010). Adicionalmente, los ratones carentes de este receptor también se emplean como modelo para estudiar tratamientos de enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple (García-Díaz et al., 2007).

Receptor LPA₂ (*Lpar2*, *LPAR2*, *EDG4*)

El LPA₂ se identificó mediante búsquedas en bases de datos de secuencias genéticas (GenBank), gracias a su elevada homología con el LPA₁. Comprende una proteína de 39-kDa de masa molecular con 348 aminoácidos de los cuales comparte un 60 % con el LPA₁ (Contos y Chun, 2000; Choi et al., 2010). Su expresión es más restringida que la del receptor LPA₁, aunque también se halla en numerosos tejidos como el pulmón, el riñón, el útero y los testículos (revisado en Choi et al., 2010) (Tabla 2). El LPA₂ se expresa en el cerebro embrionario y su expresión disminuye considerablemente en el adulto. Al igual que el LPA₁, el LPA₂ se acopla a las proteínas G $\alpha_{i/o}$, G α_q y G $\alpha_{12/13}$, activando las respuestas asociadas a estas vías (Ishii et al., 2000; Figura 20). La activación del LPA₂ se asocia a procesos de supervivencia, migración celular y cambios morfológicos, y se ha implicado en la metástasis del cáncer (Choi et al., 2010). Su afinidad por las distintas especies de LPA es elevada (Bandoh et al., 2000).

Los ratones nulos para el receptor LPA₂ no demuestran ninguna alteración de su fenotipo anatómico o cerebral (Contos et al., 2002). Esto indica que, a diferencia del LPA₁, el receptor LPA₂ no es esencial para el desarrollo normal del ratón. En este sentido, los dobles mutantes que carecen de ambos receptores LPA₁ y LPA₂ expresan unas alteraciones muy similares a las de los mutantes que carecen únicamente del LPA₁. Por tanto, la ausencia de LPA₂ no tiene a priori ningún efecto patológico (Contos et al., 2002). Sin embargo, los fibroblastos de los LPA₂-nulos reducen las respuestas mediadas por el receptor, como la proliferación, la movilización de calcio y la activación de las vías intracelulares asociadas. Además, en los fibroblastos que carecen de ambos receptores (LPA₁₋₂) estas respuestas se encuentran notablemente más reducidas que en las células que son nulas únicamente para uno de ellos. De este modo, se concluye que los receptores LPA₁ y LPA₂ pueden actuar conjuntamente y mediar respuestas similares (Contos et al., 2002).

Receptor LPA₃ (*Lpar3*, *LPAR3*, *EDG7*)

El LPA₃ se descubrió por clonación basada en PCR y por búsquedas de homología. Es un receptor acoplado a proteína G, de aproximadamente 40-kDa, que comparte un 50 % de aminoácidos con los receptores LPA₁ y LPA₂ (Bandoh et al., 1999; Choi et al., 2010; Im et al., 2000). La expresión del LPA₃ en el cerebro es baja, encontrándose principalmente en el pulmón, los riñones, los testículos y en el sistema reproductor de la hembra (Tabla 2). En el

útero, su expresión se relaciona con la fase de implantación del óvulo y se regula por estrógenos y progesterona (Choi et al. 2010). El LPA₃ se acopla a las proteínas G_{ai/o} y G_{αq} pero no a la G_{α12/13}, y por tanto no interviene en los procesos relacionados con esta vía como la esfericidad celular (Figura 20). Este receptor presenta una mayor afinidad por las especies de LPA con ácidos grasos insaturados (18:1, 18:2, 18:3) (Bandoh et al., 2000).

Los ratones nulos para el LPA₃ son viables y normales en términos generales, pero las hembras presentan graves alteraciones en la reproducción que afectan a la implantación y localización del embrión y al tamaño de la camada (Ye et al., 2005). Posteriormente, se demostró que el LPA₃ intervenía en la implantación del óvulo regulando las prostaglandinas, cruciales en este proceso (Shah y Catt, 2005). Aunque el LPA₃ se expresa en algunas estructuras cerebrales como el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala, los animales nulos para el LPA₃ no muestran ninguna alteración en el sistema nervioso, en función de los datos disponibles hasta la fecha (revisado en Choi, 2010).

Receptor LPA₄ (Gpr23, p2y9)

El receptor LPA₄ está menos relacionado con los receptores clásicos de LPA y esfingosina, compartiendo mayor similitud con los receptores purinérgicos P2Y. Comprende una proteína de 42-kDa de masa molecular con 370 aminoácidos (Janssens et al., 1997). Entre todos los tejidos examinados en ratones y humanos, el LPA₄ se expresa principalmente en el ovario. También se halla, con menor expresión, en el cerebro embrionario, el corazón, el timo y el páncreas, entre otros (Tabla 2). El receptor LPA₄ se acopla a las proteínas G_{α12/13}, G_{ai/o} y G_{αq}, mediando respuestas asociadas a estas vías de señalización como la esfericidad celular, la formación de fibras de estrés y la movilización de calcio intracelular (revisado en Choi et al., 2010). A diferencia de los receptores clásicos de LPA, el LPA₄ activa también la vía G_{α5} relacionada con el AMPc (Figura 20). Los ratones carentes del receptor LPA₄ no presentan alteraciones evidentes (Lee et al., 2007). Sin embargo, se ha descrito que el LPA₄ suprime la migración celular inducida por el LPA y por la activación del receptor LPA₁ (Lee et al., 2008).

Receptor LPA₅ (Gpr92)

El receptor LPA₅ se identificó a partir de un receptor huérfano de 41-kDa y 372 aminoácidos que demostró tener afinidad por el LPA (Joo et al., 2007; Kotarsky et al., 2006). Aunque es estructuralmente diferente a los receptores LPA₁₋₃, comparte un 35 % de homología con el LPA₄. En ratón, el LPA₅ se expresa en numerosos tejidos, aunque su expresión en el cerebro adulto aún no se ha analizado (Tabla 2). El LPA₅ se acopla las proteínas G_{α12/13} y G_{αq}, induciendo retracción de neuritas, formación de fibras de estrés e incremento del calcio intracelular (Figura 20, Tabla 3). El receptor LPA₅ también puede ser activado por otras dos moléculas lipídicas distintas al LPA (farnesil pirofosfato y N-araquidoniglicina), aunque su afinidad por el LPA es mayor. Hasta la fecha, no se han descrito mutantes para el LPA₅.

Receptor LPA₆ (p2y5)

El receptor LPA₆ se ha identificado recientemente (Yanagida et al., 2009) y la información sobre él es aún escasa. Comparte su mayor homología con el LPA₄ y estimula la vía de señalización G₁₃, interviniendo en la morfología celular y en la acumulación de AMPc. Tiene mayor afinidad por las formas saturadas del LPA y parece ser necesario para el crecimiento del pelo (revisado en Yanagida et al., 2009).

Capítulo II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Resumen

El hipocampo está implicado en procesos cognitivos y emocionales. La neurogénesis adulta en el giro dentado participa en la memoria que depende del hipocampo, como la memoria espacial, y en la regulación de conductas de ansiedad y depresión.

El estrés crónico daña gravemente el hipocampo y reduce la neurogénesis hipocampal, produciendo alteraciones emocionales y cognitivas.

El receptor de ácido lisofosfatídico LPA₁ es necesario para la neurogénesis hipocampal adulta. Los ratones carentes del receptor LPA₁ presentan menor proliferación en el giro dentado, tanto en condiciones basales como en respuesta al enriquecimiento ambiental. A nivel conductual muestran alteraciones motoras y emocionales, pero hasta la fecha no se han descrito déficit cognitivos notables en ausencia de LPA₁.

Hipótesis

1.- Si la neurogénesis hipocampal adulta está implicada en la memoria espacial, los ratones carentes del receptor LPA₁ deberán presentar alteraciones de esta función cognitiva a consecuencia de su déficit neurogénico.

2.- En tanto que el estrés crónico y el receptor LPA₁ ejercen efectos opuestos sobre la neurogénesis, la señalización mediada por LPA₁ puede modular los efectos negativos del estrés crónico sobre la neurogénesis hipocampal.

- a) Los efectos del estrés crónico sobre la neurogénesis serán más severos en ausencia del receptor LPA₁.
- b) La mayor afectación de la neurogénesis correlacionará con déficit conductuales más severos.

Objetivos

Cada objetivo se corresponderá con un bloque experimental de la Tesis Doctoral.

1.- Primer bloque experimental: Estudiar la conducta dependiente de hipocampo en los ratones carentes del receptor LPA₁:

- a) Estudiar la memoria espacial en ratones carentes del receptor LPA₁.
- b) Determinar si la tarea refleja el rendimiento cognitivo de los animales o si este déficit está relacionado con alteraciones emocionales o exploratorias concomitantes.

2.- Segundo bloque experimental: Estudiar el efecto del estrés crónico sobre la neurogénesis y función hipocampal en ratones normales y carentes del receptor LPA₁. Se evaluarán las consecuencias de la ausencia del LPA₁ y del estrés crónico sobre:

- a) La población de precursores radiales y la proliferación celular en el giro dentado.
- b) La elección del fenotipo neural y la diferenciación de las nuevas neuronas.
- c) La supervivencia de las nuevas células.
- d) La estructura anatómica del hipocampo.
- e) Los niveles de corticosterona en sangre.
- f) La memoria espacial, la ansiedad y la exploración.

Capítulo III

PAPEL DEL RECEPTOR DE ÁCIDO LISO FOSFATÍDICO LPA₁ EN LA CONDUCTA: EXPLORACIÓN, ANSIEDAD Y MEMORIA ESPACIAL

1.- Introducción

La evidencia disponible indica que el receptor de ácido lisofosfatídico LPA₁ podría participar en la conducta que depende del hipocampo. La administración intrahipocampal de LPA potencia la consolidación de la memoria espacial (Dash et al., 2004) y el receptor LPA₁ modula la neurogénesis hipocampal adulta (Matas-Rico et al., 2008), que está implicada en la función hipocampal (Leuner, Gould y Shors, 2006). Recientemente, nuestro grupo de investigación realizó la fenotipación conductual de la variante *Málaga* de los ratones carentes del receptor LPA₁ (Santín et al., 2009). Los maLPA₁-nulos demostraron déficit neurológicos en el olfato y en la función motora, que podrían reflejar las alteraciones en el neurodesarrollo que se han descrito en ausencia del receptor (Estivill-Torrus et al., 2008). En varias tareas comportamentales, los maLPA₁-nulos presentaron un incremento de la respuesta de ansiedad y menor exploración pero, sorprendentemente, la memoria espacial a largo plazo en el laberinto acuático no se vio apenas afectada (Santín et al., 2009; para más detalle ver la Tabla 4 en el capítulo introductorio) a pesar del llamativo deterioro de la neurogénesis hipocampal que caracteriza a este genotipo (Matas-Rico et al., 2008).

La ausencia de déficit espaciales en los maLPA₁-nulos podría deberse a diversos factores. En primer lugar, es relevante considerar las demandas de la prueba conductual empleada, ya que la neurogénesis hipocampal podría ser necesaria sólo en presencia de demandas espaciales y/o temporales que impliquen cierta complejidad (Moscovitch et al., 2006). Por otra parte, las características específicas de cada paradigma comportamental, como el tipo de refuerzo para realizar la tarea, pueden influir en los resultados (Hodges, 1996; Llano López et al., 2010). De este modo, el estudio de los mutantes de LPA₁ en una prueba distinta al laberinto acuático podría evidenciar alteraciones de la memoria espacial más severas. Por otra parte, los maLPA₁-nulos presentan un fenotipo conductual complejo con alteraciones simultáneas en los dominios exploratorio y emocional, lo cual se observa con frecuencia en ratones transgénicos (e.j. Acevedo et al., 2006; Kalueff et al., 2007). Es necesario considerar que la actividad, la ansiedad y la cognición pueden reflejar procesos diferentes o bien pueden estar relacionadas entre sí (Earnheart et al., 2007; Matzel et al., 2008; Miyagawa et al., 1998; Ohl et al., 2003). En este sentido, la memoria se puede alterar en función de la ansiedad innata del roedor o de su reactividad ante un estresor (Herrero, Sandi y Venero, 2006; Ribeiro et al., 1999; Wright et al., 2006). Incluso, se ha sugerido que el rendimiento de ciertas cepas de ratón en tareas de memoria refleja su nivel de ansiedad en lugar de su capacidad cognitiva (Dockstader y van der Kooy, 2001; Earnheart et al., 2007). Los estresores (como la natación forzada o la exposición a ambientes nuevos) suelen ser un componente inevitable de las tareas que evalúan los procesos mnésicos en roedores y, además, su nivel de aversión varía de una tarea a otra y podría explicar la discrepancia de resultados entre distintas pruebas (Hodges, 1996). La ansiedad también puede inducir un aumento o disminución de la exploración (Kalueff y Tuohimaa, 2004; Kameda et al., 2007; Ramos y Mormede, 1998) y, a su vez, la actividad motora puede afectar a la ansiedad y a la memoria en tanto que éstas se suelen medir a partir de parámetros espaciotemporales (Brody y Holtzman, 2006; Kalueff et al., 2007; Strelakova et al., 2005). Por tanto, si la relación potencial entre la memoria, la ansiedad y la exploración no se evalúa adecuadamente, la interpretación de los resultados conductuales puede ser errónea.

En este bloque experimental se estudiarán la memoria espacial, la exploración y la ansiedad en ratones normales y maLPA₁-nulos evaluados en la tarea del laberinto de hoyos. El laberinto de hoyos es una prueba de memoria espacial frecuentemente empleada que se asemeja al laberinto acuático en tanto que el animal debe guiarse por

pistas extralaberínticas para orientarse en el entorno y resolver la tarea (Oades, 1981). A diferencia del laberinto acuático, este test emplea el refuerzo positivo (encontrar comida) en lugar de negativo (escapar del agua). Además, el laberinto de hoyos requiere aprender varias localizaciones espaciales, lo cual podría implicar más dificultad que una única localización (Olton y Papas, 1979). El protocolo experimental que se pondrá en práctica también procurará distintos intervalos entre ensayos para testar la función del hipocampo con diferentes demandas temporales. Por otra parte, el laberinto de hoyos permite la evaluación simultánea de variables de memoria espacial (a largo plazo y de trabajo), de ansiedad y de exploración (Earnheart et al., 2007; Ohl et al., 2003; Takeda, Tsuji y Matsumiya, 1998). La relación entre las variables registradas se estudiará para determinar si el déficit en la ejecución de tareas de memoria, en caso de hallarse alguno, es un déficit cognitivo o bien podría explicarse por la presencia de alteraciones emocionales o exploratorias en los mutantes. Para este propósito se empleará el Análisis de Componentes Principales (ACP), una aproximación multivariante que permite agrupar las variables en las dimensiones independientes (factores) que subyacen a la conducta. El ACP se ha aplicado con éxito en diversas pruebas conductuales y para comparar la conducta de distinta cepas de roedores (Carola et al., 2002; Fernandes et al., 1999; Gross et al., 2000; Kolata et al., 2007; Ohl et al., 2003), pero su uso en la evaluación de animales transgénicos ha sido menos frecuente.

2.- Material y métodos

Animales

La colonia de mutantes maLPA₁-nulos, la variante *Málaga* de los mutantes de LPA₁, se ha descrito en Estivill-Torrús et al. (2008). Los primeros mutantes de LPA₁ fueron generados por Contos et al. (2000) sobre un fondo genético mixto (129X1/SvJ x C57BL/6J). El gen *Lpar₁* se eliminó sobre células troncales embrionarias de la cepa 129X1/SvJ por delección del exón 3 que codifica los dominios I y VI del receptor (Contos et al., 2000). Los ratones quimera resultantes se cruzaron con la cepa C57BL/6J hasta dar lugar a ratones homocigotos para la mutación. Los LPA₁-nulos originales fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Chun (Scripps Research Institute, California) a nuestro grupo de investigación. Estos animales se cruzaron y se retrocruzaron durante 20 generaciones con ratones originados en el fondo mixto. En la actualidad, la colonia de maLPA₁-nulos lleva ocho años de expansión en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga, donde se llevó a cabo la parte experimental de este estudio. Los maLPA₁-nulos son viables y presentan las alteraciones morfológicas de sus predecesores (Estivill-Torrús et al., 2008, ver Figura 22 en el apartado de introducción). La ausencia del receptor LPA₁ se ha confirmado por genotipación e inmunohistoquímica.

En este experimento se emplearon 37 ratones macho, 23 de genotipo normal (salvajes, *wild type*, fondo 129X1/SvJ x C57BL/6J) y 14 mutantes maLPA₁-nulos homocigotos para la delección (nulos, knockout), con cuatro meses de edad al inicio del experimento. Los animales se estabularon en condiciones estándar con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (encendido de las luces a las 7:00). Durante los cuatro días anteriores al análisis conductual, los ratones se estabularon individualmente y se manipularon durante 5 min al día en la habitación experimental, para adaptarse a las condiciones de la tarea. Al comienzo de la manipulación, fueron sometidos a una dieta restrictiva (de manera que su peso se redujo a un 80-85 % de su peso basal) que se mantuvo durante todo el experimento. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las leyes europeas sobre experimentación animal (*European Communities Council Directive 86/609/EEC*, 98/81/CEE, 2003/65/CE y *Commission Recommendation 2007/526/EC*) y a la normativa nacional para animales de experimentación y transgénicos (Real Decreto 1205/2005, 178/2004 y Ley 32/2007, 9/2003). La evaluación comportamental se realizó entre las 9:00 y las 15:00 en una habitación con 300 lux de intensidad lumínica.

Habitación en el laberinto de hoyos

La *habituación* es una forma de aprendizaje que se puede definir como la disminución de una conducta (generalmente exploratoria o emocional) por la exposición repetida a un estímulo que no tiene consecuencias biológicas relevantes para el organismo (Leussis y Bolívar, 2006), y es una función que depende del hipocampo (Leussis y Bolívar, 2006). Por tanto, el objetivo de la fase de habituación es doble. Por una parte, se pretende que los animales se acostumbren las condiciones experimentales (p.ej., a comer de los hoyos) y así prepararlos para ejecutar la tarea espacial que evaluará su rendimiento cognitivo. Por otra parte, la fase de habituación tiene sentido en sí misma porque evaluará la respuesta emocional y exploratoria en la primera exposición al laberinto (contexto nuevo) y la habituación de la conducta, tanto a lo largo de un ensayo (habituación intra-ensayo) como en una segunda exposición al laberinto (contexto familiar, habituación inter-ensayo).

El laberinto de hoyos consistió en un campo abierto cuadrado de 40 x 40 cm con 16 hoyos equidistantes (2.5 cm de diámetro y 3 cm de profundidad, separados 5.5 cm entre sí) situados en la zona central del laberinto. La zona central estaba separada en 6.5 cm de las paredes de plexiglás (20 cm de altura) que rodeaban el aparato. En las paredes de la habitación se colgaron diversas claves espaciales (cartulinas negras con distintas formas geométricas) para facilitar la orientación espacial de los animales. La etapa de habituación al laberinto consistió en un ensayo diario de 3 min de duración, durante dos días consecutivos (Figura 24). En esta etapa, todos los hoyos se reforzaron con un pequeño trozo de comida (0.03 gr del *pellet* que los ratones consumían habitualmente) con el objetivo de acostumar a los ratones a comer de los hoyos. Después de cada ensayo, el laberinto se limpió con una solución de agua y jabón neutro para eliminar posibles rastros de olor. La ejecución de cada animal durante cada uno de los ensayos se registró y grabó empleando un equipo grabador de vídeo conectado a una cámara situada en el techo, sobre el laberinto (Figura 23).

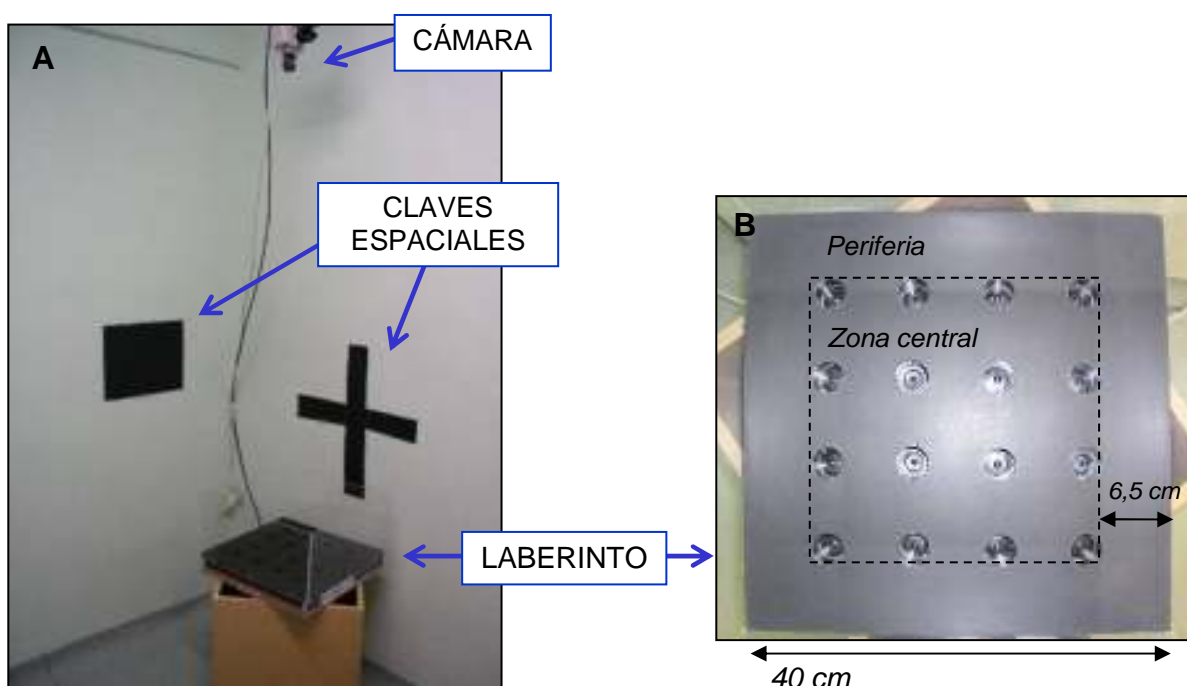


Figura 23. Habitación donde realizó la prueba del laberinto de hoyos (A) y laberinto (B).

Para estudiar la ansiedad y la exploración en el laberinto se evaluaron las siguientes conductas: locomoción (distancia recorrida; mm/s), tigmotaxis (permanencia en la periferia del laberinto, definida como los 6.5 cm interiores a las paredes; % de tiempo), exploración de hoyos o *head dipping* (el ratón introduce el hocico en un hoyo; frecuencia/min), exploración vertical o *rearing* (el ratón se sostiene en sus patas traseras mientras que las delanteras pueden estar apoyadas o no en las paredes; frecuencia/min), valoración de riesgo (el ratón estira su cabeza y patas delanteras hacia delante volviendo a su postura inicial sin locomoción de sus patas traseras; frecuencia/min), aseo o *grooming* (el ratón lame o su piel o su cola; frecuencia/min) y la defecación (número de defecaciones en la arena al terminar el ensayo). El significado de estas conductas se detalla en la Tabla 5. La locomoción y la tigmotaxis se registraron con un sistema informatizado de análisis de imagen (Ethovision XT 5.0., Noldus Information Technology, Waningen, Países Bajos) mientras que el resto de conductas se cuantificaron observacionalmente.

En esta etapa de habituación, con todos los hoyos reforzados, los animales que dedicaran más tiempo a comer dispondrían de menos tiempo para realizar conductas de exploración. Para controlar este hecho, todas las medidas a excepción de la tigmotaxis y la

defecación se expresaron por unidad de tiempo (por minuto o por segundo, como se especifica en el párrafo anterior) y el tiempo que cada animal empleó comiendo se registró observacionalmente y se descontó del tiempo empleado para calcular las medidas conductuales. En relación a esto es relevante comentar que la locomoción, aunque se expresa en mm/s, no es una medida de velocidad. Si la velocidad se evaluara no bastaría con excluir del análisis el tiempo que el animal está comiendo, sino que habría que excluir todo el tiempo que el animal se encuentra inmóvil (Bothe et al., 2004).


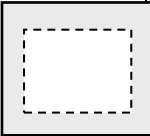





Conducta	Significado
Locomoción 	Es una medida de exploración del entorno. Suele ser elevada en ambientes nuevos y se reduce cuando el ambiente es conocido por el animal (Bothe et al., 2004; Leussis y Bolivar, 2006).
Tigmotaxis 	Es una frecuente medida de ansiedad que refleja la tendencia de los roedores a permanecer en la zona protegida por las paredes (periferia), por miedo a explorar el espacio abierto (Crawley, 1999; Simon, Dupuis y Costentin, 1994).
Rearing 	Se considera una medida de exploración y actividad general en el entorno, ya que el animal tiene una visión más completa del espacio al apoyarse en sus patas traseras. Sucede sobre todo en contextos nuevos y/o durante el aprendizaje espacial (p.ej. es habitual el rearing sobre la plataforma del laberinto acuático, especialmente al principio de la tarea). Suele correlacionar con la locomoción (Fernandes et al., 1999; Gross et al., 2000; Lever, Burton y O'Keefe, 2006).
Head dipping 	Refleja la exploración dirigida a un objeto. Puede correlacionar con las medidas de exploración general del entorno (locomoción y rearing) o puede ser independiente (ver Lister, 1990 para una revisión). El estrés y la ansiedad pueden reducir el head dipping (Bandoh et al., 2000; Takeda, Tsuji y Matsumiya, 1998).
Valoración de riesgo 	Es una conducta de defensa en la cual el animal valora la existencia de una amenaza. Sin embargo, también se ha relacionado con exploración, ansiedad y arousal (Carobrez y Bertoglio, 2005; Carola et al., 2002; Ramos y Mormede, 1998; Lever, Burton y O'Keefe, 2006).
Grooming 	El grooming se considera una medida de ansiedad, en función de su frecuencia y de la secuencia de conductas que lo componen (Kalueff y Tuohimaa, 2005). Sin embargo, también son muchos los trabajos que otorgan al grooming un significado independiente, que relacionan con el aseo o el arousal (Carola et al. 2002, Ohi et al. 2002).
Defecación 	Se considera una medida de ansiedad (Kalueff y Tuohimaa, 2004), pero se cuestiona este significado (Lister, 1990).

Tabla 5. Significado de las conductas registradas en la fase de habituación. La locomoción, tigmotaxis, rearing y head dipping se analizaron también en la fase de aprendizaje espacial.

Aprendizaje espacial en el laberinto de hoyos

La fase de aprendizaje espacial permite estudiar tanto la memoria espacial a largo plazo como la de trabajo. Además, se tendrán en cuenta diferentes intervalos temporales entre ensayos y distintos niveles de dificultad. Esta fase del experimento dio comienzo al día siguiente de la habituación. Únicamente cuatro de los hoyos se reforzaban (0.03 gr de *pellet*) antes de comenzar cada ensayo, y este conjunto de cuatro hoyos reforzados se mantuvo constante durante el resto del experimento. El aprendizaje espacial consistió en cuatro días consecutivos con dos sesiones de entrenamiento cada día, separadas por un intervalo de 2 h entre sesiones. Cada sesión consistió en dos ensayos consecutivos con un intervalo entre ensayos de 45 s (Figura 24). Así, el protocolo experimental permite analizar la memoria tras diferentes intervalos temporales entre ensayos: 24 h (primer ensayo de la primera sesión), 2 h (primer ensayo de la segunda sesión) y 45 s (segundo ensayo de ambas sesiones) (Figura 24). En cada ensayo, los animales comenzaban aleatoriamente en una de las cuatro posiciones de salida posibles, correspondientes a las cuatro esquinas del laberinto. De esta forma se obliga al ratón a orientarse en cada ensayo y se evita que supere la prueba aprendiendo a realizar un único recorrido. Además, el laberinto contenía un falso suelo lleno de comida, de forma que su olor se distribuía por todo el laberinto impidiendo que los animales pudieran localizar los reforzadores guiándose por el olfato. En esta fase los ensayos duraban hasta que el ratón obtenía los cuatro reforzadores escondidos en el laberinto. Al finalizar cada ensayo, el ratón volvía a su jaula y el laberinto se limpiaba con agua y jabón neutro.

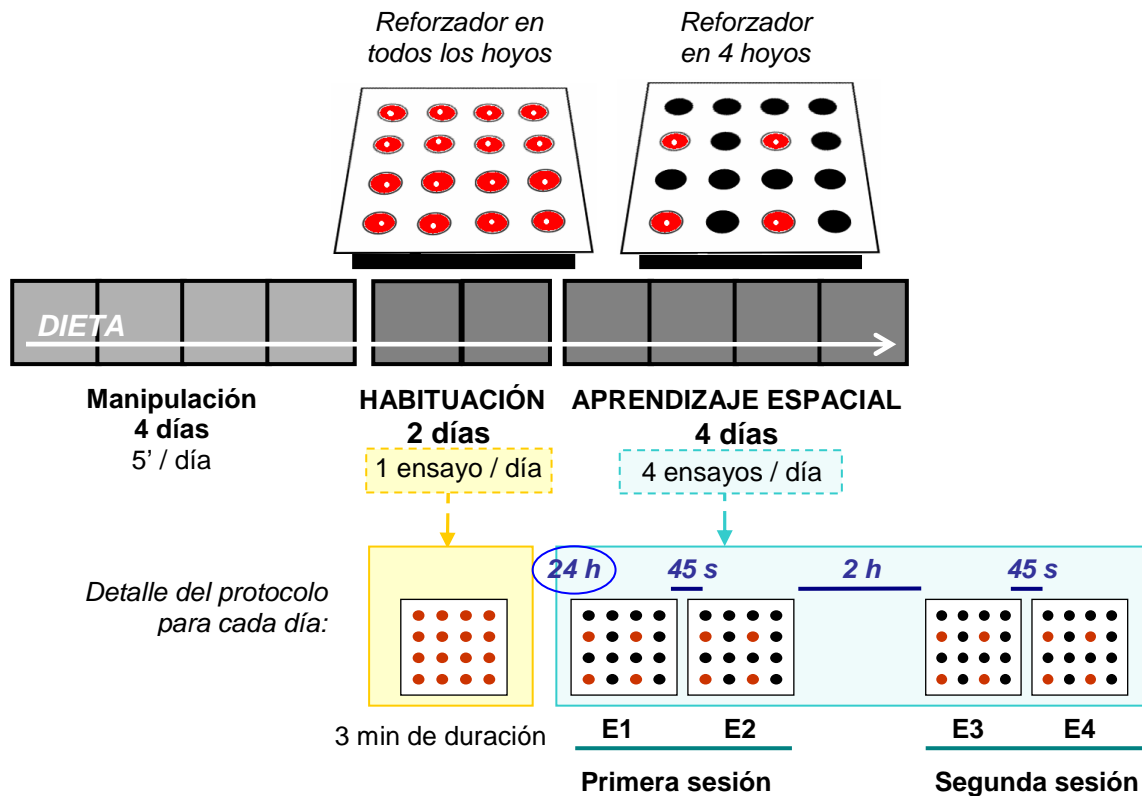


Figura 24. Protocolo experimental en el laberinto de hoyos. Los hoyos reforzados en cada fase se representan en color rojo. El entrenamiento consistió en 2 días de habituación (1 ensayo al día) y 4 días de aprendizaje espacial (4 ensayos al día, separados por diferentes intervalos temporales). Consultar el texto para una explicación más detallada. E: ensayo.

Los ensayos se grabaron en vídeo y se registraron mediante el procedimiento anteriormente comentado. Se evaluó el tiempo que cada animal empleaba en finalizar el

ensayo (s), la tigmotaxis (% de tiempo en periferia) como medida de ansiedad y la locomoción (mm/s), el *rearing* (frecuencia/min) y el *head dipping* (frecuencia/min) como medidas de exploración. Las variables conductuales de nuevo se expresaron por unidad de tiempo para controlar que la duración de cada ensayo era distinta en función del rendimiento del animal. De otro modo, los animales que tardaran más en encontrar los reforzadores podrían tener un mayor número total de conductas de exploración, simplemente por el hecho de que sus ensayos fuesen más largos. El *grooming*, la valoración de riesgo y la defecación se obviaron en esta fase debido a la baja frecuencia y al significado ambiguo que demostraron en el último ensayo de la fase de habituación (ver resultados). En cuanto a las medidas cognitivas, los índices de memoria espacial a largo plazo y de trabajo se calcularon para cada ensayo. El índice de memoria a largo plazo se calculó como el número de visitas y revisitas a los hoyos reforzados dividido por el número total de visitas (visitas y revisitas a los hoyos reforzados y no reforzados). El índice de memoria de trabajo se calculó como el número de visitas a hoyos reforzados dividido por el número de visitas y revisitas a los hoyos reforzados (Douma et al., 1998). Las visitas y revisitas (es decir, desde la segunda visita en adelante) se registraron observacionalmente en cada ocasión en la que el ratón introducía su hocico en un hoyo.

Análisis estadísticos

En la fase de habituación, los datos de ambos ensayos y de los primeros y últimos 30 segundos del primer ensayo se analizaron para evaluar la habituación entre- e intra-ensayo, respectivamente (Leussis y Bolivar, 2006). En la fase de aprendizaje espacial, los datos de cada ensayo se promediaron en una única puntuación diaria para cada animal, para evaluar su rendimiento a través de los días. Para estudiar la influencia del intervalo temporal entre ensayos sobre la memoria, en cada día de aprendizaje se comparó el rendimiento cognitivo en los ensayos con intervalo temporal de 24 h (primer ensayo de la primera sesión), 2 h (primer ensayo de la segunda sesión) y 45 s (promedio del segundo ensayo de la primera y de la segunda sesión del día). Por otra parte, si la tarea implica la búsqueda de varios reforzadores, su dificultad podría incrementarse a medida que se agotan los reforzadores del laberinto (Olton y Papas, 1979). Para atender a este aspecto, se calcularon los índices de memoria a largo plazo y de trabajo para una de las cuatro etapas o “elecciones reforzadas” que compondrían cada ensayo, definidas del siguiente modo: ‘1^a’: desde el comienzo del ensayo hasta el hallazgo del primer reforzador; ‘2^a’: desde el hallazgo del primer reforzador hasta el hallazgo del segundo; ‘3^a’: desde el hallazgo del segundo reforzador hasta el hallazgo del tercero; ‘4^a’: desde el hallazgo del tercer reforzador hasta el hallazgo del último (Figura 25). Los datos de cada una de estas etapas, evaluadas en los cuatro ensayos diarios, se promediaron en una única medida al día para cada animal. A su vez, estos datos se promediaron en una medida para la primera mitad del entrenamiento (días 1 + 2) y otra para la segunda mitad (días 3 + 4).

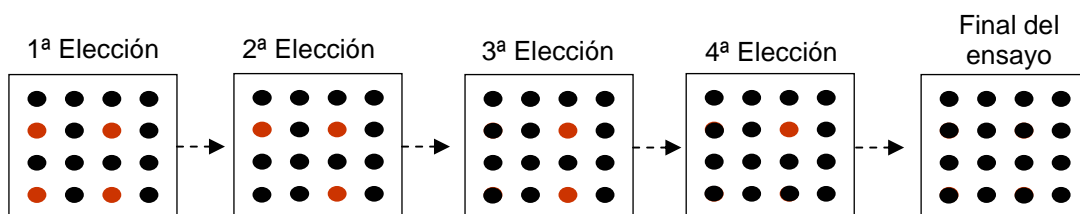


Figura 25. Ejemplo del aspecto del laberinto durante cada una de las elecciones reforzadas (1^a-4^a) en un ensayo. La transición de una a otra ocurre cuando se halla un reforzador (en rojo).

Los datos se analizaron con ANOVAs de dos vías con medidas repetidas, para la fase de habituación ('genotipo x ensayo', para la habituación entre-ensayos, o 'genotipo x

momento del ensayo', para la habituación intra-ensayo) y para la fase de aprendizaje espacial ('genotipo x día', 'genotipo x intervalo' o 'genotipo x etapa', según el caso). Cuando las F del ANOVA resultaron estadísticamente significativas, se procedió a aplicar la prueba de significación a posteriori (*post hoc*) de la diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD, de *Least Significant Difference*) para las comparaciones intra e inter grupos. En todo caso, sólo se consideraron significativas las probabilidades iguales o menores a 0.05. Los análisis se realizaron con el software STATISTICA 7.1. (Stat Soft Inc., Oklahoma, EEUU). El error estándar de la media (SEM; de *Standard Error of the Mean*) de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

La posible relación entre las variables evaluadas se estudió mediante ACP de acuerdo a estudios previos (Ohl et al. 2003). Al ACP es una técnica de análisis multivariante de reducción de datos que clasifica las variables en grupos homogéneos. Estos grupos homogéneos ("factores") se forman con las variables que tienen una correlación elevada entre sí y, por tanto, las variables que componen un mismo factor comparten un mismo significado. Sin embargo, los factores son independientes unos de otros otros, de forma que las variables de distintos factores reflejan conductas diferentes y no relacionadas (Ramos y Mormede, 1998).

La relación entre las variables registradas en la habituación y el aprendizaje (promediados como una única puntuación diaria por animal) se analizó para cada día del experimento y por separado para los grupos de *wild type* y LPA₁-nulos. Se empleó un ACP con rotación varimax, que asegura que los factores obtenidos son independientes unos de otros (Ramos y Mormede, 1998). Los factores se seleccionaron hasta que la solución explicó un 85 % de la varianza total. La contribución de cada variable en cada factor ("saturación" o "carga") sólo se consideró representativa a partir de 0.6. Las cargas inferiores se consideraron como una representación pobre de la variable en el factor y por tanto fueron ignoradas. Los factores se nombraron en función de las variables que eran más representativas del mismo (es decir, aquellas con una carga alta en ese factor y baja en los otros). Para el ACP se empleó el software estadístico SPSS 13.0. (SPSS Inc., Madrid).

3.- Resultados

Conducta en un contexto nuevo y habituación

La fase de habituación en el laberinto de hoyos (1 ensayo de 3 min al día durante dos días) permite estudiar la conducta del animal ante un contexto novedoso y también la habituación de su respuesta, entre- e intra- ensayos. En esta etapa se registraron la locomoción, tigmotaxis, *rearing*, *head dipping*, valoración de riesgo, *grooming* y defecación. Los ANOVAs de medidas repetidas ('genotipo x ensayo') sobre los dos ensayos de habituación revelaron un efecto significativo del 'genotipo' para la locomoción ($F_{(1,35)} = 7.388$, $P < 0.001$), la tigmotaxis ($F_{(1,35)} = 32.689$, $P < 0.001$), el *head dipping* ($F_{(1,35)} = 42.279$, $P < 0.001$) (Figura 26), el *grooming* ($F_{(1,35)} = 6.290$, $P < 0.05$) y la defecación ($F_{(1,35)} = 11.033$, $P < 0.05$) (Figura 28). En el contexto nuevo (primer ensayo de habituación) las comparaciones post hoc mostraron una reducción de la actividad y la exploración en los maLPA₁-nulos. Este patrón de inactividad consistió en hipolocomoción ($P < 0.05$, Figuras 26A y 29A) acompañada de menos *rearing* ($P < 0.001$, Figura 26C), *head dipping* ($P < 0.001$, Figura 26D) y *grooming* ($P < 0.05$) (Figura 28B). Los mutantes también defecaron con más frecuencia ($P < 0.05$) pero no presentaron más tigmotaxis, lo cual no sugiere un incremento de la ansiedad ante la novedad (Figuras 26B, 27 y 28A).

Al día siguiente, los animales se re-expusieron al laberinto de hoyos (segundo ensayo de habituación) para estudiar la habituación entre-ensayos de la conducta, entendida como el cambio conductual entre el primer y el segundo ensayo (contexto nuevo vs familiar). Como era de esperar, la familiaridad del contexto afectó al comportamiento de los animales (efecto significativo del 'ensayo' en la tigmotaxis: $F_{(1,35)} = 49.697$, $P < 0.001$; el *rearing*: $F_{(1,35)} = 17.057$, $P < 0.001$; el *head dipping*: $F_{(1,35)} = 13.658$, $P < 0.001$ y la valoración de riesgo: $F_{(1,35)} = 45.598$, $P < 0.001$ Figuras 26 y 28). Sin embargo, el cambio conductual no fue igual para ambos genotipos, ya que se halló un efecto de la interacción 'genotipo x ensayo' en la mayoría de las variables evaluadas (locomoción: $F_{(1,35)} = 4.523$, $P < 0.05$; tigmotaxis: $F_{(1,35)} = 18.469$, $P < 0.001$; *rearing*: $F_{(1,35)} = 6.607$, $P < 0.05$; *head dipping*: $F_{(1,35)} = 3.957$, $P < 0.05$, *grooming*: $F_{(1,35)} = 4.126$, $P = 0.05$). El post hoc reveló que los *wild type* redujeron la locomoción ($P < 0.05$), tigmotaxis ($P < 0.001$), *rearing* ($P < 0.001$) y valoración de riesgo ($P < 0.001$), incrementaron el *head dipping* ($P < 0.001$) y eliminaron la defecación en el segundo ensayo. Por el contrario, los maLPA₁-nulos presentaron un déficit de habituación, puesto que únicamente redujeron la conducta de valoración de riesgo ($P < 0.001$) en respuesta a la familiaridad, manteniendo por tanto los niveles iniciales de locomoción, tigmotaxis, *rearing* y *head dipping* ($P > 0.05$, Figura 26 y 28) en el segundo ensayo. En el caso del *head dipping*, la ausencia de aumento en los mutantes de LPA₁ no podría explicarse por una menor motivación para encontrar comida, puesto que se observó que comían con normalidad en sus jaulas.

Por otra parte, se evaluó la habituación intra-ensayo, entendida como el cambio conductual a lo largo del primer ensayo de habituación (30 primeros segundos vs 30 últimos segundos). Este tipo de habituación no estuvo alterada en los maLPA₁-nulos (Figura 29), ya que ambos genotipos incrementaron la locomoción y el *head dipping* ($P < 0.001$), redujeron la tigmotaxis ($P < 0.001$) y mantuvieron la frecuencia de *rearing* y *grooming* a lo largo del primer ensayo (efecto del 'genotipo' para la locomoción $F_{(1,35)} = 8.980$, $P < 0.05$; tigmotaxis: $F_{(1,35)} = 4.885$, $P < 0.05$; *rearing*: $F_{(1,35)} = 3.811$, $P = 0.05$; *head dipping*: $F_{(1,35)} = 9.892$, $P < 0.05$; efecto del 'momento del ensayo' para la locomoción: $F_{(1,35)} = 29.682$, $P < 0.001$; tigmotaxis: $F_{(1,35)} = 19.516$, $P < 0.001$; *head dipping*: $F_{(1,35)} = 2.979$, $P < 0.001$; la interacción 'genotipo x momento del ensayo' no fue significativa en ningún caso).

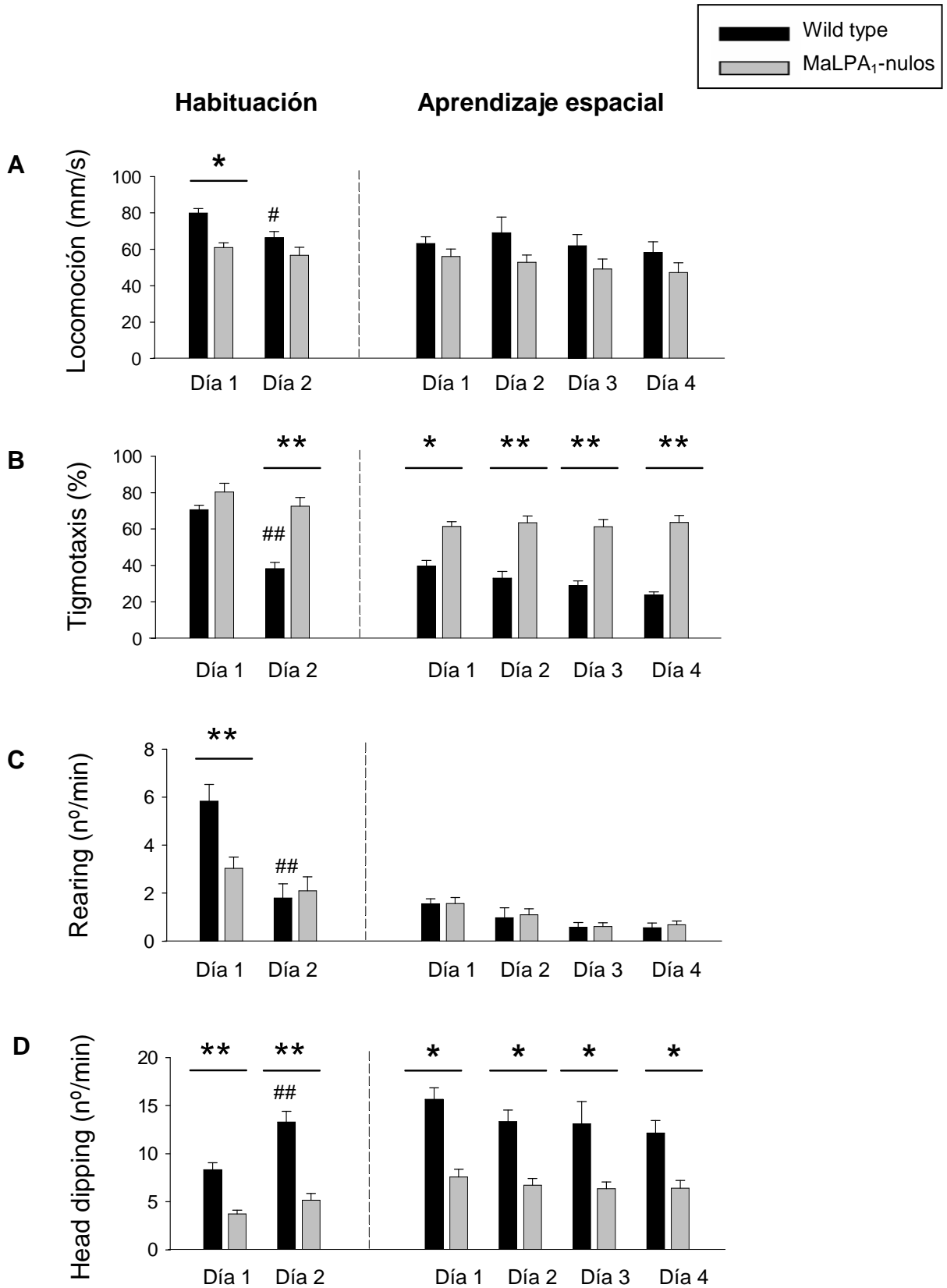


Figura 26. Conductas analizadas durante la habituación y el aprendizaje espacial. Medias \pm SEM. Los $maLPA_1$ -nulos presentaron inactividad (locomoción, rearing, head dipping) y una elevada conducta de ansiedad (tigmtaxis). Se muestran los análisis post hoc LSD: diferencias entre grupos (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$); cambio en un grupo con respecto a su primer día de habituación ([#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.001$).

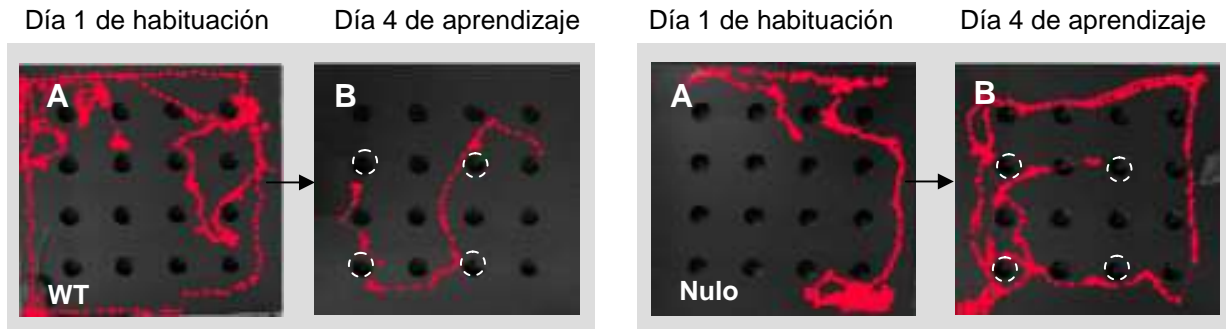


Figura 27. Recorridos representativos de los wild type (WT) y de los *maLPA₁-nulos (nulo)* al principio y al final de su evaluación en el laberinto de hoyos. (A) En el primer día de habituación, se aprecian diferencias en la distancia recorrida pero no en el tiempo en la periferia. (B) Al final del aprendizaje, el WT realiza ensayos más cortos y recorre el centro del laberinto, mientras que el nulo tarda más en completar los ensayos y aún prefiere la periferia. Los hoyos reforzados en el aprendizaje se señalan en blanco.

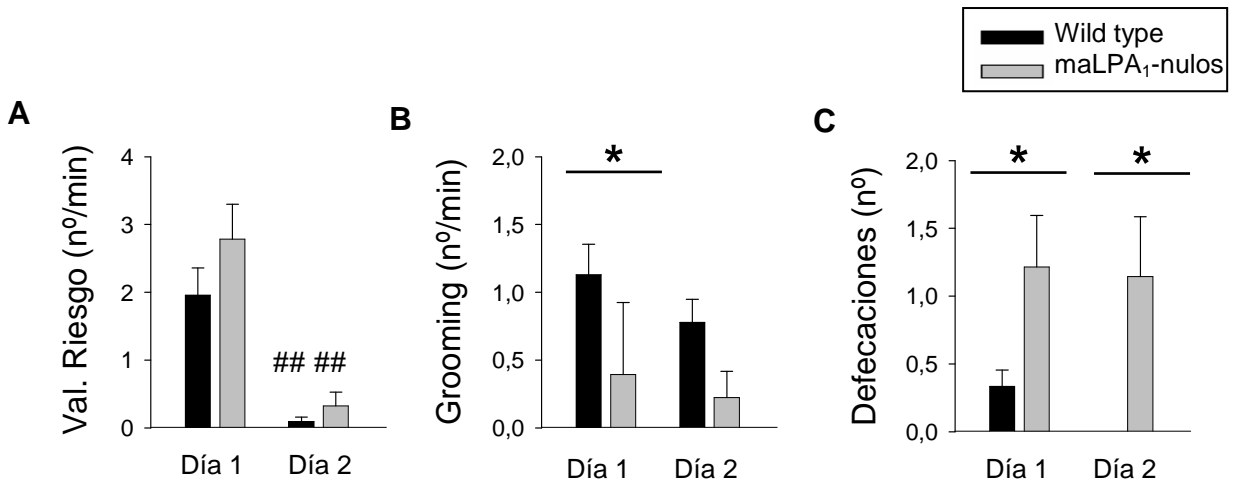


Figura 28. Conductas de valoración de riesgo (A), grooming (B) y defecación (C) analizadas durante la habituación (habituación inter-ensayo). Medias \pm SEM. LSD: diferencias entre grupos (* $P < 0.05$); cambio en un grupo con respecto a su primer día de habituación ($^{###} P < 0.001$).

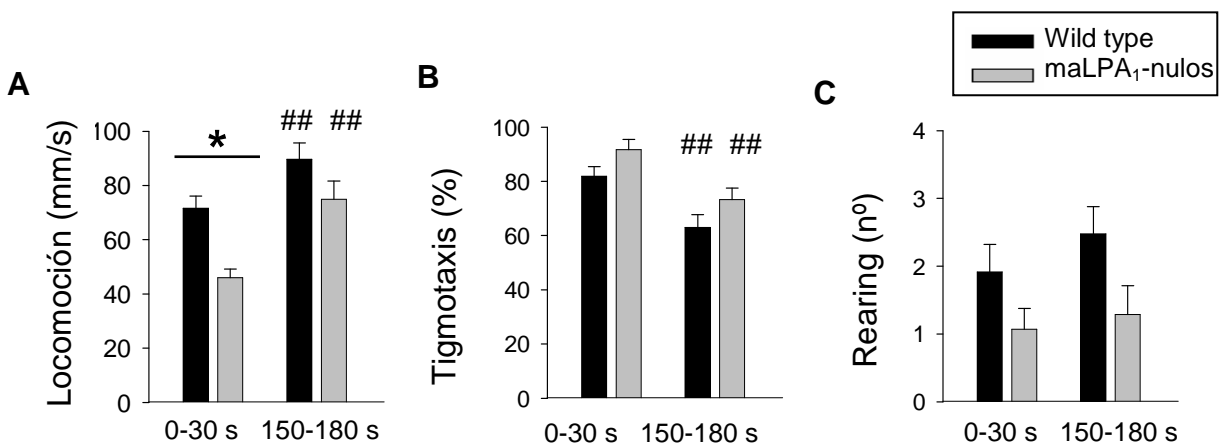


Figura 29. Habitación intra-ensayo de la locomoción (A), tigmotaxis (B) y rearing (C). Medias \pm SEM. Los mutantes de LPA₁ no mostraron alteración en la habituación intra-ensayo de estas conductas. LSD: diferencias entre grupos (* $P < 0.05$); cambio en un grupo con respecto al primer momento del ensayo de habituación ($^{###} P < 0.001$).

Aprendizaje espacial: Memoria espacial, exploración y ansiedad

La fase de aprendizaje espacial tuvo lugar los cuatro días siguientes a la habituación (días 1-4 de ahora en adelante), durante dos sesiones al día, estando cada sesión compuesta por dos ensayos consecutivos (separados en 45 s) y un intervalo entre sesiones de 2 h. En esta fase se evaluaron los índices de memoria espacial a largo plazo y de trabajo, para estudiar el rendimiento cognitivo, junto con la locomoción, tigmotaxis, *rearing*, *head dipping* y la latencia en encontrar los reforzadores. Para estudiar la memoria en mayor profundidad, los índices de memoria a largo plazo y de trabajo se analizaron para los cuatro días de entrenamiento pero también en función de los distintos intervalos temporales entre ensayos (24 h, 2 h, 45 s) presentes en el protocolo. La dificultad de la tarea se incrementa a medida que el ensayo avanza y los reforzadores desaparecen del laberinto. Por tanto, se realizó un análisis adicional en el que cada ensayo se dividió en cuatro etapas o elecciones reforzadas (definidas por el hallazgo de cada reforzador) que implicarían dificultad creciente (véase el ejemplo la figura 25 del apartado anterior).

Memoria espacial a largo plazo

En el caso de la memoria a largo plazo, los ANOVAs de medidas repetidas durante los cuatro días de aprendizaje espacial revelaron un déficit cognitivo en los maLPA₁-nulos (efecto del 'genotipo': $F_{(1,35)} = 4.492$, $P < 0.05$). Ambos grupos fueron capaces de mejorar durante el entrenamiento, tal y como mostraron los análisis post hoc (LSD en el día 2: $P < 0.05$ vs día 1 para ambos grupos, LSD en el día 3: $P < 0.05$ vs día 2 para los *wild type*; efecto del 'día': $F_{(3,105)} = 41.458$, $P < 0.001$). Sin embargo, los ratones carentes del receptor LPA₁ no consiguieron alcanzar el rendimiento de los controles al final de la tarea (LSD en el día 4: $P < 0.05$; 'genotipo x día': $F_{(3,105)} = 2.748$, $P < 0,05$; Figura 30A). El análisis de la memoria a largo plazo en función de intervalos temporales mostró que los *wild type* superaban a los knockout en los ensayos con intervalo de 24 h y 2 h en el día 3 (LSD: $P < 0.05$; efecto del 'genotipo': $F_{(1,35)} = 9.307$, $P < 0.05$; 'genotipo x intervalo': $F_{(2,70)} = 3.115$, $P = 0.05$) (Figura 30B). Es relevante mencionar que en este día los *wild type* empeoraron su rendimiento en los intervalos de 45 s (LSD: $P < 0.05$ en comparación con los intervalos de 24 h y 2 h), mientras que los maLPA₁-nulos se comportaron igual en todos los intervalos temporales. En el día 4, los *wild type* volvieron a demostrar una tendencia a rendir mejor en los intervalos largos, aunque ésta no fue estadísticamente significativa ('genotipo': $F_{(1,35)} = 5.602$, $P < 0.05$; pero el efecto por 'intervalo' y 'genotipo x intervalo' > 0.05).

Cuando se llevaron a cabo los análisis en función de las cuatro elecciones reforzadas que comprendían cada ensayo, el efecto significativo de la 'elección' reveló que los errores de memoria a largo plazo se incrementaban a medida que el ensayo avanzaba y quedaban menos reforzadores en el laberinto (efecto de 'elección' para días 1 + 2: $F_{(3,105)} = 10.217$, $P < 0.001$; días 3 + 4: $F_{(3,105)} = 6.426$, $P < 0.001$). En concreto, el rendimiento de los animales empeoraba en la segunda mitad del ensayo, cuando buscaban el tercer reforzador (LSD en la 3ª elección: $P < 0.05$ vs 1ª elección), salvo en el caso de los *wild type* en los días 3 + 4, que no empeoraron hasta que sólo quedaba un reforzador (LSD en la 4ª elección: $P < 0.05$ vs 1ª elección). Conviene comentar que, tal y como está formulado el índice de memoria a largo plazo (véase el apartado anterior), los aciertos tienen lugar siempre que se visita o revisita cualquiera de las cuatro localizaciones reforzadas. Así, también se considera un acierto de memoria a largo plazo cuando el animal vuelve a visitar uno de los hoyos reforzados en los que ya ha consumido el reforzador. Por este motivo no era esperable encontrar un aumento de la dificultad en esta memoria a medida que los reforzadores desaparecen del laberinto, como sugieren los datos. Sin embargo, este resultado podría interpretarse teniendo en cuenta que las primeras elecciones del ensayo podrían corresponder a los hoyos reforzados cuya localización los animales aprenderían más fácilmente (p.ej. el reforzador situado en la esquina), mientras que los hoyos peor señalizados (p.ej. el reforzador situado en el centro) se buscarían en las últimas elecciones. Esto explicaría que las últimas etapas implicaran una mayor demanda espacial a largo

plazo que las primeras. Estos análisis también revelaron diferencias entre genotipos, ya que los ratones nulos rindieron peor que los *wild type* en la 3ª elección (días 3 + 4), que implica una dificultad elevada (LSD: $P < 0.05$; efecto por 'genotipo': $F_{(1,35)} = 4.838$, $P < 0.05$; 'genotipo x elección': $F_{(3,105)} = 2.580$, $P = 0.05$ (Figura 30C). Posiblemente, la 4ª elección refleja una dificultad demasiado alta y por tanto no discrimina entre los genotipos.

Memoria espacial de trabajo

Los animales carentes del receptor LPA₁ también mostraron un deterioro de la memoria de trabajo espacial (efecto de 'genotipo': $F_{(1,35)} = 5.867$, $P < 0.05$). En concreto, los mutantes rindieron peor que los controles durante el primer día de entrenamiento (LSD: $P < 0.05$; efecto de 'genotipo x intervalo': $F_{(3,105)} = 2.670$, $P = 0.05$) pero mejoraron en el día 3 (LSD: $P < 0.05$ vs día 1; efecto por 'día': $F_{(3,105)} = 3.586$, $P < 0.05$), igualándose a los *wild type* (Figura 31A). Al contrario, los *wild type* no mostraron ningún cambio en su memoria de trabajo a lo largo de la tarea. Los análisis en función de los intervalos temporales entre ensayos revelaron que el déficit de los mutantes en el día 1 era general y no relacionado con ningún intervalo temporal en concreto (efecto del 'genotipo': $F_{(1,35)} = 7.169$, $P < 0.05$; pero no se halló ningún efecto significativo del 'intervalo' ni de 'genotipo x intervalo'). Sin embargo, en el día 2 se halló un déficit en los knockout únicamente en los intervalos de 24 h y 2 h (LSD entre grupos para los intervalos de 24 y 2 h: $P < 0.05$; efecto de 'genotipo': $F_{(1,35)} = 5.997$, $P < 0.05$; 'intervalo': $F_{(2,70)} = 3.987$, $P < 0.05$; 'genotipo x intervalo': $F_{(2,70)} = 3.081$, $P < 0.05$). Este resultado se debió a que los mutantes mejoraron su rendimiento en los intervalos cortos de 45 s (LSD: $P < 0.05$ vs intervalos de 24 h y 2 h, Figura 31A).

Por último, se realizaron los análisis en función de las cuatro elecciones reforzadas que comprendían cada ensayo. El efecto de la 'elección' fue significativo (días 1 + 2: $F_{(1,35)} = 5.363$, $P < 0.05$; días 3 + 4: $F_{(3,105)} = 107.770$, $P < 0.001$) y la dificultad de la tarea se incrementaba en cada elección para ambos genotipos (LSD: $P < 0.05$ comparando cada elección con la siguiente). Este aumento de dificultad era previsible, ya que en la memoria de trabajo la revisita a un hoyo reforzado se considera un error (véase la formulación del índice). Así, el animal debe recordar qué reforzadores ha consumido en ese ensayo y, por tanto, la carga de memoria de trabajo aumentaría cada vez que se halla un reforzador. Por otra parte, la probabilidad de acertar por azar también disminuye si un reforzador desaparece del laberinto. Estos análisis revelaron que el déficit inicial (días 1 + 2) de memoria de trabajo en los mutantes se correspondía con la última elección, que implicaba mayor dificultad (LSD entre grupos en la 4ª elección: $P < 0.05$; efecto del 'genotipo': $F_{(1,35)} = 5.363$, $P < 0.05$; 'genotipo x dificultad': $F_{(3,105)} = 3.097$, $P < 0.05$; Figura 31C).

Exploración y ansiedad en la fase de aprendizaje

Durante los días 1-4 de aprendizaje espacial, también se analizaron las conductas de ansiedad y exploración. Los ANOVAs de medidas repetidas revelaron mayor tigmotaxis en los maLPA₁-nulos durante todo el entrenamiento (LSD en el día 1: $P < 0.05$; LSD en los días 2 - 4: $P < 0.001$; 'genotipo': $F_{(1,35)} = 59.078$, $P < 0.001$; 'día': $F_{(3,105)} = 2.682$, $P = 0.05$, 'genotipo x día': $F_{(3,105)} = 4.221$, $P < 0.05$; Figuras 26B). La diferencia fue más notable al final del aprendizaje debido a que los *wild type* redujeron progresivamente la tigmotaxis a medida que avanzaba la tarea (LSD en el día 2: $P < 0.05$ vs día 1; LSD en el día 4: $P < 0.05$ vs día 2) pero los knockout no modificaron esta conducta (Figuras 26B y 27). Además, durante el aprendizaje espacial, los ratones carentes del receptor LPA₁ mostraron menor *head dipping* ('genotipo': $F_{(1,35)} = 19.415$, $P < 0.001$; LSD: $P < 0.05$ en los días 1-4; Figura 26D) y mayor latencia en terminar los ensayos ('genotipo': $F_{(1,35)} = 36.683$, $P < 0.001$; 'día': $F_{(3,105)} = 5.837$, $P < 0.001$; LSD: $P < 0.001$ en días 1-4; medias diarias entre 57-78 s (*wild type*) y 156-200 s (knockout)). La locomoción y el *rearing* no fueron diferentes entre genotipos durante esta fase. Ambos grupos de animales mantuvieron la locomoción constante pero redujeron el *rearing* a lo largo de los días (efecto del 'día' para el *rearing*: $F_{(3,105)} = 9.187$, $P < 0.001$) (Figura 26A, C).

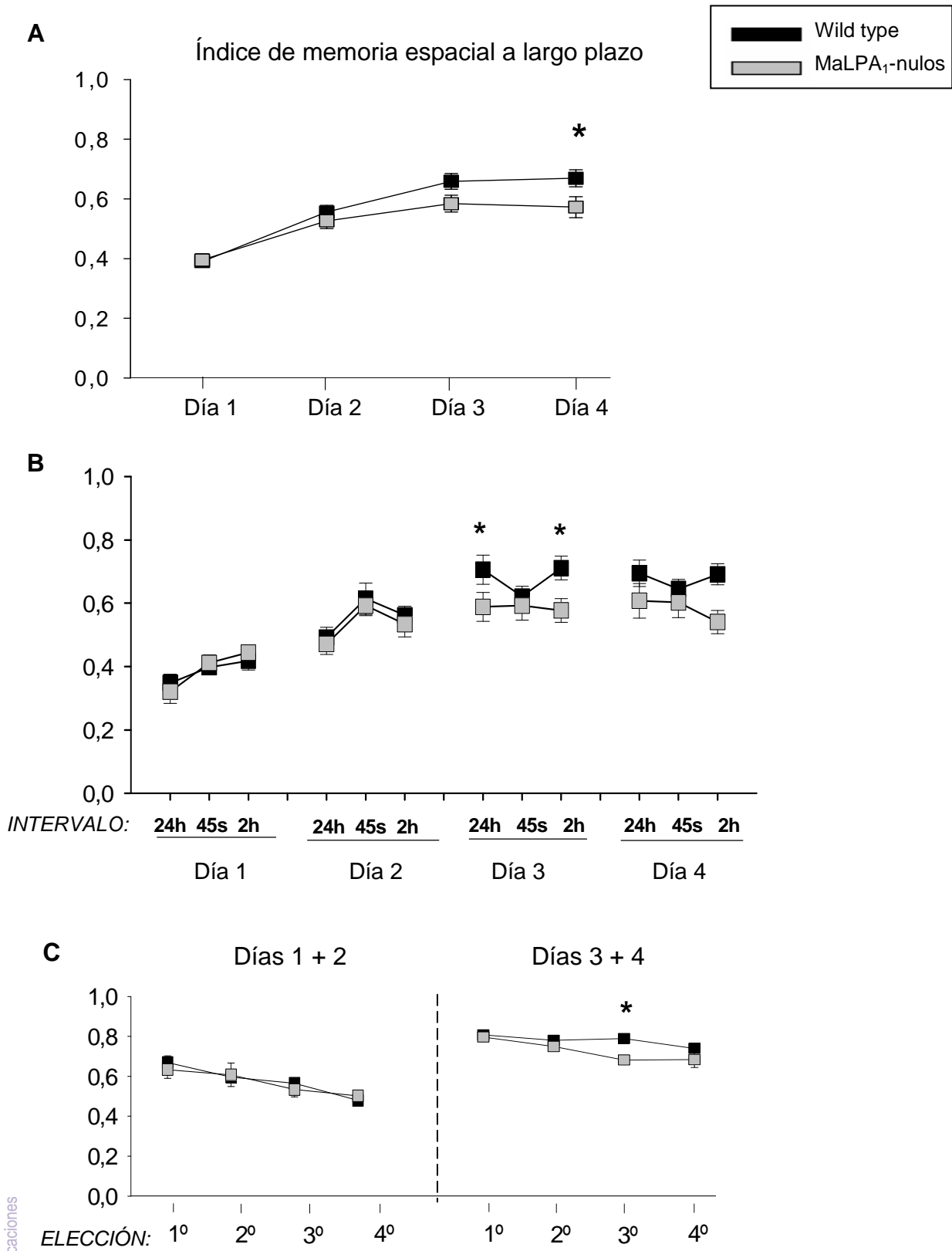


Figura 30. Memoria espacial a largo plazo. Medias \pm SEM. Los *maLPA₁*-nulos mostraron déficit al final del aprendizaje (A), en los ensayos con un intervalo temporal más largo (24 h, 2h; B) y en condiciones de mayor dificultad (tercera elección reforzada de los ensayos; C). LSD: diferencias entre grupos (* $P < 0.05$).

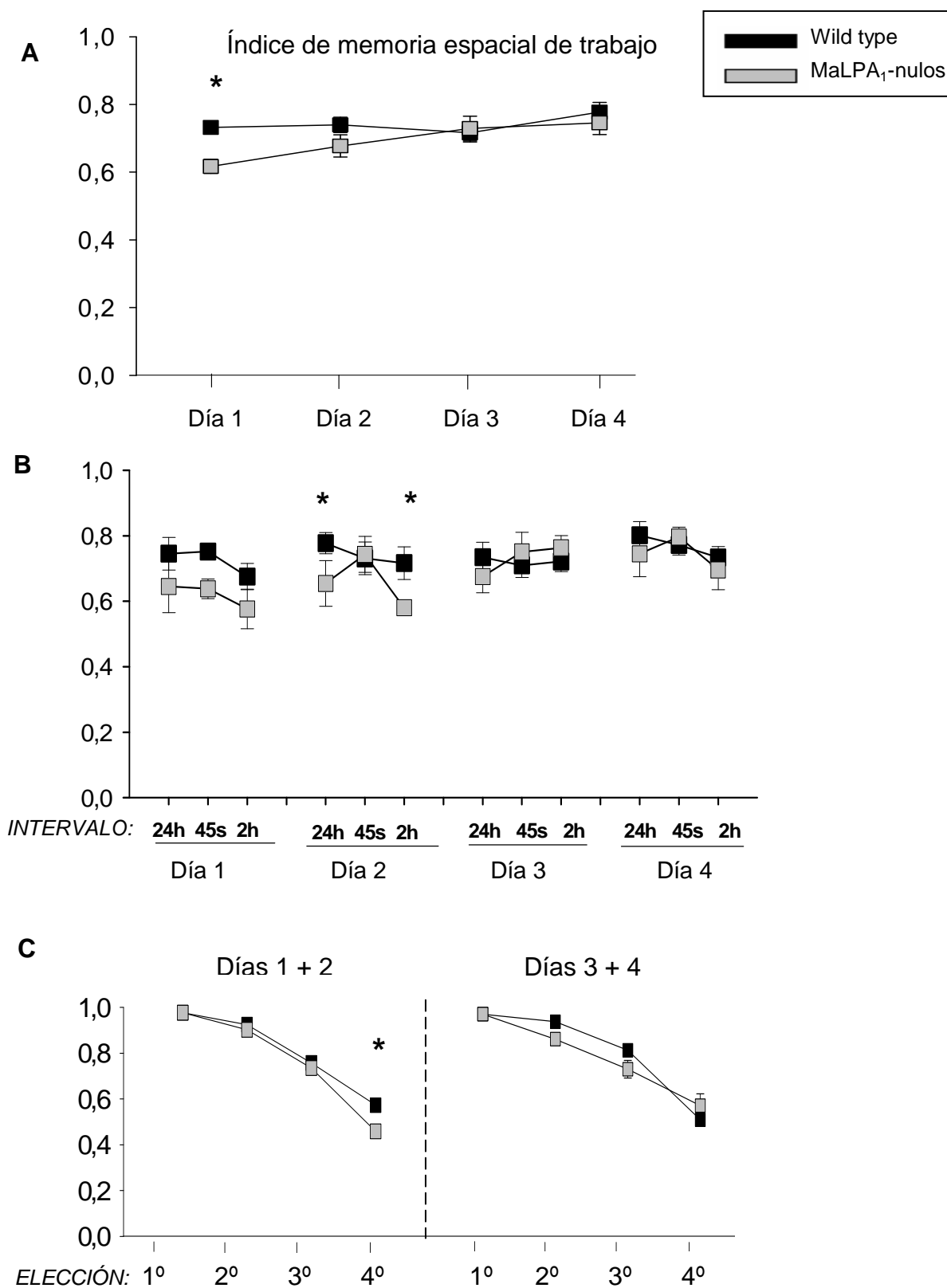


Figura 31. Memoria espacial de trabajo. Medias \pm SEM. Los $maLPA_1$ -nulos mostraron déficit únicamente al principio del aprendizaje (A) y en condiciones de mayor dificultad (última elección de los ensayos; C). En el día 1, esta alteración se produjo por igual entre todos los intervalos temporales, pero se limitó a los más largos en el día 2 (24 h, 2 h; B) LSD: diferencias entre grupos (* $P < 0.05$).

Relación entre las variables evaluadas en el laberinto de hoyos

La relación entre las medidas de exploración, ansiedad y memoria se evaluó mediante el ACP, que agrupa en un mismo factor a las variables que comparten el mismo significado. La Tabla 6 resume los factores más importantes que se hallaron durante la prueba. Los análisis factoriales completos se muestran en el Anexo I.

Fase de habituación

En el contexto nuevo (primer día de habituación), el ACP reveló una solución de cuatro factores para los *wild type* y para los maLPA₁-nulos, que explicaba un 89 % y un 91 % de la varianza total, respectivamente (Tabla 6). En ambos genotipos, se hallaron factores independientes que reflejaban la exploración del entorno (factor representado por la locomoción y el *rearing*) y la ansiedad (representado por la tigmotaxis y la defecación). El *head dipping*, la valoración de riesgo y el *grooming* no correlacionaron con las variables de exploración y ansiedad y saturaron en otros factores. Esto indica que poseen un significado independiente, que quizás representaría la exploración dirigida a un objeto (*head dipping*) o el arousal (valoración de riesgo, *grooming*). En el contexto familiar (segundo día de habituación) el PCA de nuevo extrajo una solución de cuatro factores en cada grupo, explicando un 90 % de la varianza total en los *wild type* y un 89 % en los nulos (Tabla 6). De nuevo, se hallaron factores independientes para la exploración y la ansiedad, representados de manera respectiva por la locomoción y la tigmotaxis, principalmente. En este ensayo, la defecación no resultó una buena medida de ansiedad para los mutantes porque correlacionó con conductas de defensa (valoración de riesgo). Además, los *wild type* no defecaron. El *grooming* y la valoración de riesgo ocurrieron con escasa frecuencia (Figura 28) y sus factores fueron difíciles de interpretar. Por tanto, la defecación, la valoración de riesgo y el *grooming* no se evaluaron en la fase de aprendizaje espacial.

Fase de aprendizaje espacial

Se realizó un ACP para cada uno de los cuatro días de aprendizaje y para cada grupo experimental. En todos los casos, las soluciones factoriales revelaron cuatro factores y explicaron al menos un 85 % de la varianza total, no hallándose grandes diferencias entre la estructura factorial de ambos genotipos. En términos generales, los cuatro factores representaron dimensiones independientes de exploración, tigmotaxis, memoria a largo plazo y memoria de trabajo (Tabla 6). Por tanto, ni el déficit de exploración de los mutantes ni su elevada conducta de ansiedad contaminaba su rendimiento cognitivo, ya que saturaron en factores separados.

Las variables que representaron el factor de exploración fueron la locomoción y el *head dipping*, pero ya no se halló correlación de estas medidas con el *rearing*. Posiblemente, en la fase de aprendizaje espacial la locomoción está motivada por visitar los hoyos y no por observar el contexto, que era ya conocido. Además, la frecuencia del *rearing* se redujo drásticamente a lo largo del aprendizaje sugiriendo que esta conducta, muy frecuente en el contexto nuevo, pierde progresivamente su utilidad a medida que el contexto es familiar. Su asociación con la tigmotaxis podría explicarse simplemente por el hecho de que los pocos *rearing* registrados en esta etapa ocurrieron con apoyo en las paredes. Los análisis también indican que el tiempo empleado en terminar los ensayos no parece depender de la precisión en realizar la tarea sino de la frecuencia de exploración. En cuanto a la tigmotaxis, es necesario matizar su interpretación. Hay que tener en cuenta que, durante esta etapa, el % de tiempo en la periferia fue muy diferente entre los dos genotipos (Figura 26B). En tanto que la periferia consistía, aproximadamente, en el 45 % del área total del laberinto, la escasa tigmotaxis de los *wild type* (medias diarias entre el 40 y el 24 %) no podría interpretarse como “ansiedad” sino como una exploración normal del laberinto. Sin embargo, la tigmotaxis de los knockout (medias diarias entre el 61 y el 59 %) sugiere una preferencia por la periferia y sí podría interpretarse como ansiedad.

Factor: EXPLORACIÓN / ACTIVIDAD												
<i>Día</i>	Hab. 1		Hab. 2		Aprend. 1		Aprend. 2		Aprend. 3		Aprend. 4	
<i>Genotipo</i>	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO
Locomoción	.927	.950	.961	.882	.931	.861		.926	.654	.831	.668	.922
<i>Head Dipping</i>					.931	.825	.871	.919	.633	.947	.926	.856
<i>Rearing</i>	.897	.835		.845								
Duración ensayo	-	-	-	-		-.894	-.946	-.828	-.939	-.647	-.899	-.829
<i>%Varianza total</i>	43.4	34.9	26.8	39.1	39.8	39.8	45.3	34.4	36.4	39.9	38.0	37.7
Factor: TIGMOTAXIS												
<i>Día</i>	Hab. 1		Hab. 2		Aprend. 1		Aprend. 2		Aprend. 3		Aprend. 4	
<i>Genotipo</i>	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO
Tigmotaxis	.909	.918	.754	.936	.768	.971	.962	.929	.882	.910	.870	.867
Defecación	.768	.671			-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rearing</i>			.892				.697		.823	.777	.885	-.667
<i>Head dipping</i>				-.622								
Duración ensayo	-	-	-	-	.920							
<i>%Varianza total</i>	12.0	17.0	30.9	15.9	10.3	9.5	20.6	11.4	23.8	11.5	27.2	15.3
Factor: MEMORIA A LARGO PLAZO												
<i>Día</i>	Hab. 1		Hab. 2		Aprend. 1		Aprend. 2		Aprend. 3		Aprend. 4	
<i>Genotipo</i>	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO
M. Largo plazo	-	-	-	-	.853	.929	-.969	.945	.859	.953	.985	.969
M. de trabajo	-	-	-	-	-.771							
Duración ensayo	-	-	-	-						-.649		
<i>%Varianza total</i>	-	-	-	-	17.6	17.3	13.0	18.6	7.8	31.2	10.0	11.9
Factor: MEMORIA DE TRABAJO												
<i>Día</i>	Hab. 1		Hab. 2		Aprend. 1		Aprend. 2		Aprend. 3		Aprend. 4	
<i>Genotipo</i>	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO	WT	NULO
M. de trabajo	-	-	-	-	-.771	.740	-.971	.878	.921	.945	.969	.966
M. Largo plazo	-	-	-	-	.853							
<i>Rearing</i>						.922		.791				
<i>%Varianza total</i>	-	-	-	-	17.7	26.7	12.1	24.9	20.9	9.3	15.2	23.1

Tabla 6. Factores independientes de exploración, tigmotaxis y memoria a largo plazo y de trabajo hallados durante la habituación (Hab.) y el aprendizaje espacial (Aprend.) en el laberinto de hoyos. Se muestran las variables con carga igual o superior a 0.6. Las medidas no evaluadas en un día se representan con: -. % Varianza total: porcentaje de la varianza de la muestra que explica cada factor. WT: wild types, NULO: maLPA₁-nulo.

4.- Discusión

Los resultados de este experimento indican que el receptor LPA₁ participa en la memoria espacial, y los déficit espaciales en ausencia del receptor no se explican por las alteraciones emocionales y motoras halladas en los maLPA₁-nulos.

En un contexto nuevo (primer día de habituación), la conducta de los maLPA₁-nulos se caracterizó por un déficit de exploración (*rearing*, locomoción y *head dipping*) que concuerda con nuestro estudio previo (Santín et al., 2009). La reducción de la exploración de los roedores podría deberse a una elevada ansiedad durante la prueba (Kameda et al., 2007; Ramos y Mormede, 1998). Sin embargo, los datos no muestran diferencias de ansiedad entre ambos genotipos al exponerse al ambiente nuevo, en tanto que su tigmotaxis fue similar en ese ensayo. Además, el PCA reveló que la exploración y la ansiedad estaban representadas en factores independientes. La independencia de la exploración y la ansiedad se halla con frecuencia en la conducta animal (e.j., Fernandes et al., 1999; Gross et al., 2000; Ohl et al., 2003) e indica que (en la muestra estudiada) la exploración no depende de los niveles de ansiedad y, al contrario, que la tigmotaxis no es resultado de la motivación para explorar ni de la función motora y por tanto refleja el estado emocional de los animales (Crawley, 1999; Ohl et al., 2003; Simon, Dupuis y Costentin, 1994). Los maLPA₁-nulos no sólo presentaron inactividad en el contexto nuevo sino también durante el resto del entrenamiento (*head dipping*). Sin embargo, según el ACP, las medidas de ansiedad y exploración continuaron siendo independientes.

Por tanto, si el déficit de exploración de los maLPA₁-nulos no se explica por su nivel de ansiedad, podría ser consecuencia de sus déficit motores (Santín et al., 2009, para más detalle consultar la Tabla 4 en el capítulo introductorio). Las alteraciones motoras, a su vez, podrían reflejar el deterioro hallado en la corteza motora primaria (Estivill-Torrus et al., 2008) y/o en la mielinización central y periférica de estos mutantes (García-Díaz et al. 2007; Contos et al., 2000). Por otra parte, también se debe tener en cuenta que las conductas de exploración se han relacionado con la función hipocampal. Éste es el caso del *rearing* en un contexto nuevo (Deacon, Croucher y Rawlins, 2002; Lever, Burton y O'Keefe, 2006) y del *head dipping* en el laberinto de hoyos (Deacon, Croucher y Rawlins, 2002), que se reducen al lesionar el hipocampo. Por este motivo no se puede descartar que la alteración hipocampal de los maLPA₁-nulos (Matas-Rico et al., 2008) también esté implicada, al menos parcialmente, en la reducción de las conductas exploratorias. Sin embargo, el daño hipocampal también se suele acompañar de hiperlocomoción (Deacon, Croucher y Rawlins, 2002), que no está presente en estos animales.

Cuando el roedor se expone a un contexto conocido o familiar, resulta esperable un cambio en su conducta a consecuencia de la habituación al entorno (Holmes y Rodgers, 1998; Leussis y Bolivar, 2006). De acuerdo a esto, se halló una notable reducción de las conductas de ansiedad y exploración en los *wild type* en el segundo día de habituación, lo cual indica una correcta habituación entre ensayos (Bothe et al., 2004; Leussis y Bolivar, 2006; Thiel et al., 1999). Excepcionalmente, no redujeron la conducta de *head dipping*, probablemente por el hecho de que los hoyos estaban reforzados y por ese motivo la motivación para explorarlos continuaba siendo elevada. Sin embargo, los mutantes de LPA₁ no habituaron la gran mayoría de las conductas estudiadas. Quizás el resultado más llamativo en este sentido es su incapacidad para reducir la tigmotaxis, tanto durante la habituación como durante la fase de aprendizaje espacial. En un estudio anterior, se sugería una alteración de la habituación de la ansiedad en ausencia de LPA₁, pero no reveló la severidad de este déficit (Santín et al., 2009). Es interesante destacar que la habituación intra-ensayo de la tigmotaxis fue normal en los knockout. Por tanto, su déficit

depende del intervalo temporal entre las exposiciones al laberinto y no son incapaces de adaptarse a un estímulo permanentemente presente, lo cual reflejaría un deterioro aún más grave. La habituación a un contexto, tanto intra como entre-ensayos, depende del hipocampo (Leussis y Bolivar, 2006), aunque otras estructuras límbicas como la amígdala también pueden estar implicadas (Daenen et al., 2001). Por otra parte, los maLPA₁-nulos tampoco redujeron las conductas de locomoción y *rearing* en respuesta a la familiaridad. Sin embargo, en este caso es más difícil atribuir un déficit real de habituación, ya que la ausencia de cambio podría explicarse porque los niveles de estas conductas eran inicialmente bajos. Así, en los animales que exploran poco los contextos nuevos no se suele apreciar una reducción de la exploración cuando el contexto es familiar (Thiel et al., 1999).

La elevada ansiedad y la escasa exploración podrían influir sobre el rendimiento cognitivo de los maLPA₁-nulos. Sin embargo, el ACP reveló que las medidas de emoción y actividad no estaban relacionadas con los índices de memoria espacial a largo plazo y de trabajo. Por tanto, los resultados de este estudio realmente reflejan el papel del LPA₁ en la memoria espacial. Tanto la memoria espacial a largo plazo como la de trabajo son procesos cognitivos que dependen del hipocampo (p.ej., Florian y Roullet, 2004; Morris et al., 1982; Ramos, 2009; Yoon et al., 2008). En cuanto a la memoria a largo plazo, los maLPA₁-nulos adquirieron con normalidad una parte considerable de la tarea (véanse los primeros días). Sin embargo, al final del entrenamiento no fueron capaces de alcanzar el nivel de rendimiento de los animales controles. En este sentido, es interesante el hecho de que su déficit se limitara a los ensayos con una mayor demanda temporal (24 h y 2 h). Esto vincula la función del receptor LPA₁ con la consolidación a largo plazo de la memoria y no con la adquisición a corto plazo. Sin embargo, creemos que esta dependencia temporal del déficit debe interpretarse con precaución en tanto que se origina porque los *wild type* empeoraron en los intervalos cortos. Por tanto, otra posible explicación sería la presencia de interferencia proactiva que podría empeorar el rendimiento de los *wild type* en los ensayos consecutivos y no haber afectado a los knockout, por varios motivos (p.ej. por alteración en la función hipocampal; Han, Gallagher y Holland, 1998). Por otra parte, en este estudio hemos observado que los ratones maLPA₁-nulos muestran peor memoria espacial únicamente cuando la dificultad de la tarea es elevada (concretamente, cuando buscan el tercer reforzador). Esto sugiere que las tareas espaciales cuya dificultad no fuera suficientemente elevada podrían no arrojar diferencias entre los genotipos. Quizás por este motivo sólo se evidenciaron escasos déficit espaciales en los maLPA₁-nulos evaluados la prueba del laberinto acuático (Santín et al., 2009), ya que esta tarea únicamente demanda una única localización espacial.

Este experimento es el primero que evalúa la memoria espacial de trabajo en los maLPA₁-nulos. Los *wild type* mostraron el mismo nivel de memoria de trabajo durante toda la tarea mientras que los maLPA₁-nulos mostraron un déficit inicial y una mejora progresiva hasta alcanzar el rendimiento de los controles. A diferencia de la memoria a largo plazo, la memoria de trabajo representa un almacén de procesamiento de información a corto plazo que posee una capacidad limitada (Cowan et al., 2008) y, por tanto, no es susceptible de mejorar con el entrenamiento, tal y como se observa en los ratones normales. Por este motivo, se puede suponer que el rendimiento de los maLPA₁-nulos en los primeros días no refleja su verdadera capacidad de procesamiento de información a corto plazo, y podría deberse a un retraso en la adquisición de las reglas que subyacen a la tarea (p.ej. un retraso en aprender que los hoyos sólo están reforzados una vez por ensayo). Estas reglas constituyen un componente de memoria a largo plazo (Joel et al., 1997; Yoon et al., 2008), lo cuál explicaría que el déficit de los mutantes se agrave con un mayor intervalo temporal entre ensayos (memoria de trabajo en el día 2). Los animales control podrían haber adquirido estas reglas rápidamente durante el primer día de entrenamiento o, incluso, durante la fase de habituación, ya que también requería no visitar los hoyos con el fin de adquirir el mayor número de reforzadores.

Los resultados de este experimento apoyan la implicación del receptor LPA₁ en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo, como la memoria espacial. El receptor LPA₁ se expresa en las neuronas hipocampales (Allard et al., 1998; Pilpel y Segal, 2006; Rhee et al., 2006) donde promueve la formación de espinas dendríticas (Pilpel y Segal, 2004; Pilpel y Segal, 2006). Además, los maLPA₁-nulos presentan menor número de nuevas neuronas en el hipocampo, y su incremento de la neurogénesis y de las neurotrofinas hipocampales en respuesta a la experiencia (enriquecimiento ambiental con ejercicio) es deficitario (Matas-Rico et al., 2008). La alteración de la neurogénesis hipocampal en los maLPA₁-nulos podría explicar su déficit de memoria espacial a largo plazo, aunque la regulación de neurotrofinas también podría estar implicada (Leuner, Gould y Shors, 2006; Mizuno et al., 2003; Saxe et al., 2007; Tyler et al., 2002). En cuanto la exploración en un contexto nuevo, la habituación y la memoria espacial de trabajo, su vinculación con la neurogénesis aún resulta ambigua, pero sí se dispone de abundante evidencia que relaciona estos procesos con el hipocampo (Lee y Kesner, 2003; Leussis y Bolivar, 2006; Saxe et al., 2006; Yoon et al., 2008). En el caso de la memoria espacial de trabajo, hay que matizar que ésta también depende de la corteza prefrontal (Joel et al., 1997). Sin embargo, la alteración de los maLPA₁-nulos parece reflejar específicamente la función hipocampal, ya que los componentes a largo plazo de las tareas de memoria de trabajo dependen concretamente del hipocampo (Yoon et al., 2008). Además, un déficit inicial de memoria de trabajo seguido de una mejora sólo en intervalos cortos, como en nuestros datos, se ha descrito con daño en el hipocampo pero no en la corteza (Lee y Kesner, 2003), aunque esta mejora en intervalos cortos sí podría reflejar un mecanismo compensatorio sustentado por la corteza prefrontal (Lee y Kesner, 2003). Por otra parte, el conjunto de resultados indica que el hipocampo de los mutantes de LPA₁ no sería completamente disfuncional. Así, tienen una correcta habituación intra-ensayo, aprenden parte de la tarea de memoria espacial a largo plazo y, tras varios ensayos, consiguen superar el déficit de memoria de trabajo.

En conclusión, en este apartado de la Tesis Doctoral se demuestra que el receptor LPA₁ está implicado en la memoria espacial, la ansiedad y la exploración. Los déficit conductuales que presentan los maLPA₁-nulos sugieren una disfunción hipocampal, probablemente relacionada con el deterioro de la neurogénesis adulta en ausencia de LPA₁. De acuerdo a este resultado, la señalización mediada por LPA₁ tendría interés en el estudio de la patología emocional y cognitiva que depende del hipocampo y de la neurogénesis. Por tanto, en el siguiente bloque experimental se estudiará la implicación del LPA₁ en las alteraciones inducidas por estrés crónico, una situación que daña gravemente el hipocampo y sus funciones. Además de la conducta, se estudiará la neurogénesis hipocampal en ratones controles y carentes de LPA₁, para determinar si el deterioro conductual a consecuencia del estrés crónico se podría relacionar con la alteración neurogénica en el hipocampo.

Capítulo IV

PAPEL DEL RECEPTOR DE ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO LPA₁ EN LAS ALTERACIONES HIPOCAMPALES INDUCIDAS POR ESTRÉS CRÓNICO: NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL, CORTICOSTERONA Y MEMORIA ESPACIAL

1.- Introducción

En el capítulo anterior hemos demostrado que los maLPA₁-nulos presentan diversas alteraciones comportamentales que podrían relacionarse con su afectación de la neurogénesis hipocampal adulta. Como hemos indicado anteriormente durante la introducción, los ratones carentes de LPA₁ muestran déficit de proliferación celular, deterioro en la elección del fenotipo neuronal y glial (aumento de células indiferenciadas) y desarrollo deficitario de las nuevas neuronas (Matas-Rico et al., 2008). Además, el incremento de la proliferación y supervivencia de las nuevas células en condiciones de enriquecimiento ambiental es menor en los maLPA₁-nulos que en ratones normales, posiblemente a consecuencia de una regulación alterada de los factores neurotróficos (Matas-Rico et al., 2008).

Por tanto, el receptor LPA₁ promovería la neurogénesis hipocampal, tanto en condiciones basales como en respuesta a un factor externo que estimula a la neurogénesis, como el enriquecimiento ambiental. En este segundo bloque experimental nos hemos preguntado si el LPA₁ también podría modular la neurogénesis hipocampal ante una condición que la regula negativamente, como el estrés crónico (revisado en Joels et al., 2007). En tanto que el LPA₁ y el estrés crónico tienen efectos opuestos sobre la plasticidad hipocampal, sería de esperar que la neurogénesis se deteriorara en mayor medida en los animales sometidos a estrés que carecen del receptor. Con esta finalidad, se estudiará la neurogénesis hipocampal en animales *wild type* y maLPA₁-nulos en condiciones basales y sometidos a estrés crónico por inmovilización. El estrés crónico puede afectar a múltiples etapas de la neurogénesis (Heine et al., 2005; Joels et al., 2007; Lucassen et al., 2001; Oomen et al., 2009; Torner et al., 2009). Por tanto, se evaluarán la proliferación, elección del fenotipo, desarrollo, supervivencia y muerte de las nuevas células, mediante inmunohistoquímica y detección de apoptosis. Además, la muerte celular y el volumen de las capas celulares del hipocampo se analizarán en el giro dentado y también en las áreas CA1 y CA3, para determinar el impacto del estrés sobre las zonas no neurogénicas del hipocampo (Joels et al., 2007). Complementariamente, otro grupo de animales se empleará para la evaluación de la corticosterona en situaciones basales y de estrés, para detectar posibles alteraciones del eje HHA en ausencia de LPA₁.

El estudio de los mecanismos que regulan el efecto del estrés crónico sobre la neurogénesis hipocampal es relevante porque el deterioro de la neurogénesis, a consecuencia del estrés, puede causar síntomas emocionales y cognitivos (Conrad, 2010; Murray, Smith y Hutson, 2008) y exacerbar patologías como la depresión mayor o la esquizofrenia (Kempermann, Krebs y Fabel, 2008; Pittenger y Duman, 2008). Por este motivo, también se investigará si la afectación de la neurogénesis conlleva alteraciones conductuales. Los animales se estudiarán en la tarea del laberinto de hoyos para evaluar cómo el estrés afecta a la memoria espacial a largo plazo, una función estrechamente ligada a la neurogénesis (Leuner, Gould y Shors, 2006). Además, se analizarán la memoria espacial de trabajo, la ansiedad y la exploración. Estas conductas dependen del hipocampo y pueden alterarse a consecuencia del estrés (Conrad, 2010; García-Márquez y Armario, 1987; Murray, Smith y Hutson, 2008; Yoon et al., 2008).

2.- Material y Métodos

Animales

Todos los estudios se realizaron con ratones de genotipo normal o salvaje (*wild type*, WT; fondo 129X1/SvJ x C57BL/6J) y ratones carentes del receptor LPA₁ homocigotos para la delección (maLPA₁-nulos, knockout) de aproximadamente tres meses de edad al inicio del experimento. Los maLPA₁-nulos se han descrito en Estivill-Torrús et al. (2008) y su características se han comentado en los Capítulos I y III de esta Tesis Doctoral. Los animales se estabularon individualmente en condiciones estándar con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (encendido de las luces a las 7:00). Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las leyes europeas sobre experimentación animal (*European Communities Council Directive 86/609/EEC*, 98/81/CEE, 2003/65/CE y *Commission Recommendation 2007/526/EC*) y a la normativa nacional para animales de experimentación y transgénicos (Real Decreto 1205/2005, 178/2004 y Ley 32/2007, 9/2003). Se emplearon entre seis y ocho animales de cada genotipo y condición experimental para la evaluación del efecto del estrés crónico sobre el hipocampo y la neurogénesis hipocampal (cuatro condiciones; control: supervivencia o proliferación; estrés crónico: supervivencia o proliferación); entre cinco y ocho por genotipo y condición para la evaluación de la respuesta de la corticosterona al estrés (cuatro condiciones: control, estrés agudo, estrés crónico, estrés crónico+agudo) y entre 10 y 12 animales por genotipo y condición para la evaluación conductual en el laberinto de hoyos (dos condiciones: control o estrés crónico).

Estrés crónico

En todos los experimentos, los animales asignados a la condición de estrés crónico fueron sometidos a 3 h al día de inmovilización (10:00-13:00) durante 21 días consecutivos, mientras que los animales controles permanecieron en sus jaulas en condiciones estándar. El estrés de inmovilización se realizó en tubos de plexiglás de 50 ml modificados con agujeros para la cola del animal y para la ventilación (Figura 32). La inmovilización (*restraint*) se considera un estresor predominantemente psicológico (García et al., 2000) y se emplea con frecuencia en el estudio del estrés crónico. Así, la restricción del movimiento del animal produce la activación del eje HHA (García et al., 2000; Magariños y McEwen, 1995) y altera la neurogénesis hipocampal y la conducta (Yun et al., 2010).



Figura 32. Ratón en uno de los tubos utilizados en el estrés de inmovilización. Las flechas señalan algunos de los agujeros de ventilación.

2.a- Material y métodos: neurogénesis hipocampal

Administración de BrdU

La bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma, St.Louis, USA) se administró intraperitonealmente durante cuatro días consecutivos, inyectándose una dosis diaria de 75 mg/kg de BrdU disuelta en salino durante los tres primeros días, y tres dosis adicionales durante el cuarto día (Figura 33A, B; Matas-Rico et al., 2008). La BrdU es un análogo del nucleótido timidina que se incorpora en el ADN nuclear durante la fase S del ciclo y se mantiene en el ADN de las células hijas, permitiendo su estudio (Taupin, 2007; Figuras 5 y 6 en el Capítulo I). Se utilizaron distintos grupos de animales para estudiar la proliferación celular y la supervivencia, variando el tiempo entre la administración de BrdU y la extracción del cerebro. Para estudiar el impacto del estrés crónico sobre la proliferación celular, la administración de BrdU coincidió con los cuatro últimos días de estrés crónico en el caso de los grupos estresados, y tanto éstos como los controles se perfundieron al día siguiente de la última administración (Figura 33A). En el estudio de la supervivencia celular, los animales se perfundieron 22 días después de la última dosis de BrdU, y la administración de BrdU tuvo lugar los cuatro días anteriores al comienzo del protocolo de estrés en el caso de los estresados (Figura 33B). Con este protocolo, el estrés no afecta a la proliferación de las células cuya supervivencia será evaluada, lo cual permite estudiar el efecto del estrés sobre la proliferación y supervivencia de manera independiente. Esto resulta útil en tanto que el estrés puede afectar de forma diferente a estos procesos (Torner et al., 2009).

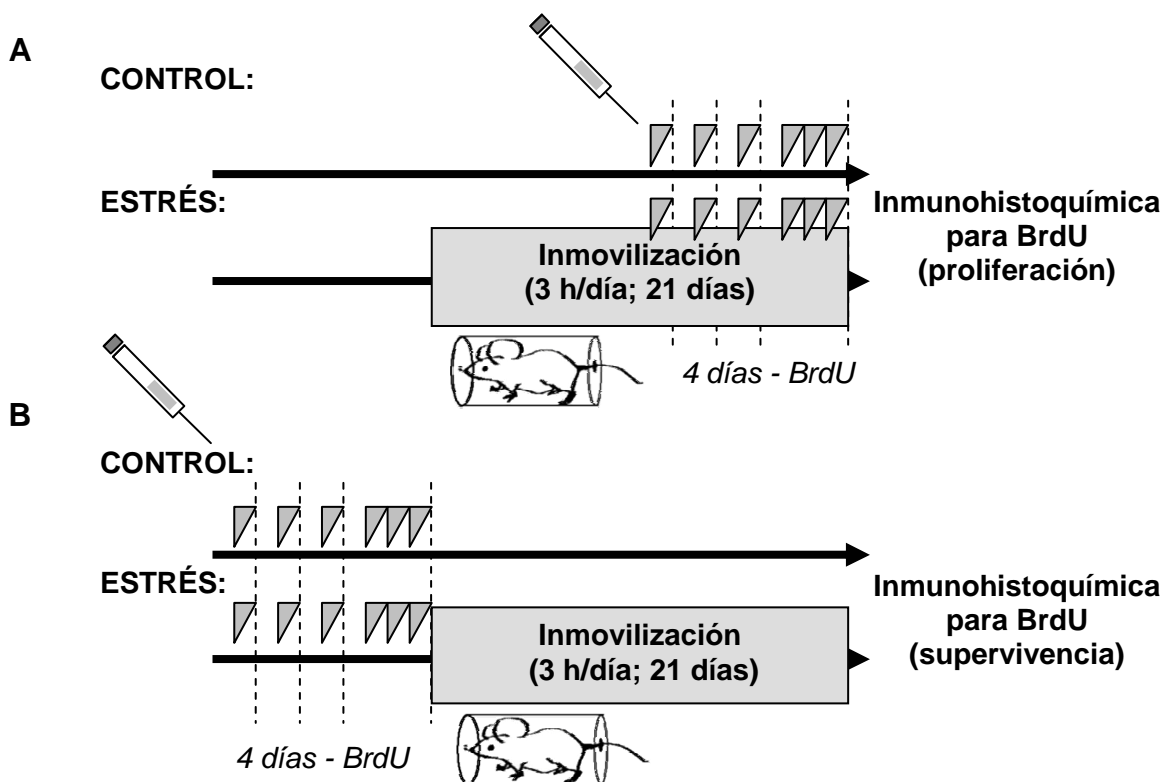


Figura 33. Protocolo de administración de BrdU. (A) Para evaluar la proliferación celular, la BrdU se administró 4 días antes de la perfusión (1 dosis al día los días 1-3 y 3 dosis en el día 4). (B) Para la evaluación de la supervivencia de las nuevas células, transcurrieron 21 días desde la última administración de BrdU hasta la perfusión. Nótese que el estrés no puede afectar a la proliferación de las células en las que se evalúa la supervivencia, de modo que ambos procesos se estudian de manera independiente.

Fijación, corte y seriación del tejido

Como paso previo al marcaje inmunohistoquímico, los cerebros se fijaron por perfusión intravascular seguida de 48 h de postfijación. Tras recibir una dosis de anestésico (ketamina, 100 mg/kg, y xilacina, 4 mg/kg; Sigma) vía intraperitoneal, suficiente para que el ratón no demostrara reflejos ante la estimulación dolorosa, el animal se sitúa en posición de cúbito supino y se practica una incisión en el torso, cortando el diafragma y exponiendo el corazón. Se inserta una cánula en el ventrículo izquierdo conectada a una bomba de perfusión (modelo D-25V, DINTER SA-DINKO Instruments, Barcelona) y se secciona la aurícula derecha para permitir el vaciado sanguíneo del animal. En primer lugar se administró una solución de lavado, tampón fosfato salino a 0.1 M y pH 7.4 (PBS, Anexo II) durante aproximadamente 15 minutos, seguida de solución fijadora de peryodato-lysina-paraformaldehído (PLP; McLean y Nakane, 1974; Anexo II) durante, aproximadamente, otros 15 minutos. Las soluciones alcanzan el cerebro a través del sistema circulatorio (Figura 34).

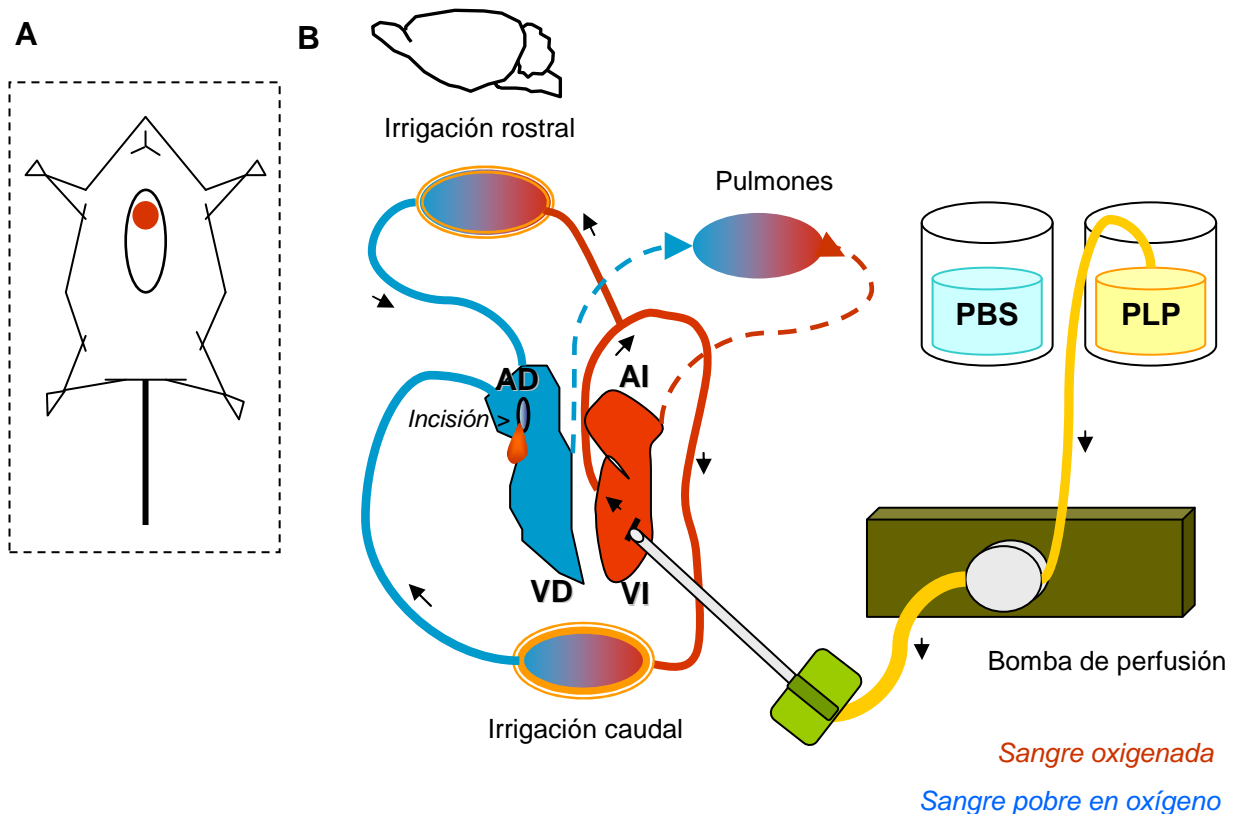


Figura 34. Perfusión vascular. (A) Representación del animal en posición de cúbito supino, exponiendo el corazón. (B) Representación del sistema circulatorio en la perfusión, inserción de la cánula, flujo del fijador, llegada a los órganos y vaciado a través de la incisión en la aurícula derecha. AD: aurícula derecha; VD: ventrículo derecho; AI: aurícula izquierda; VI: ventrículo izquierdo.

Tras la perfusión, el animal se decapita y se procede a la extracción del cerebro. Los cerebros se sometieron a 48 h de postfijación en PLP a 4 °C y en agitación. Tras la postfijación, los cerebros se situaron brevemente sobre papel secante, para eliminar los restos de fijador, y se incluyeron en agar (Sigma). Para la inclusión, el agar se disuelve al 4 % en agua destilada, se calienta en microondas hasta la ebullición y se deja enfriar unos minutos. El cerebro se incluye en un molde de acero con agar, que se solidifica en un bloque (Figura 35A). Los bloques se tallaron con una cuchilla y se cortaron en vibratomo (modelo MA752, Campden Instruments, Loughborough, UK) para obtener secciones

coronales de hipocampo de 50 µm de grosor, que se distribuyeron en cuatro series equivalentes (1/4) utilizando placas de 16 pocillos (Figura 35B, C).

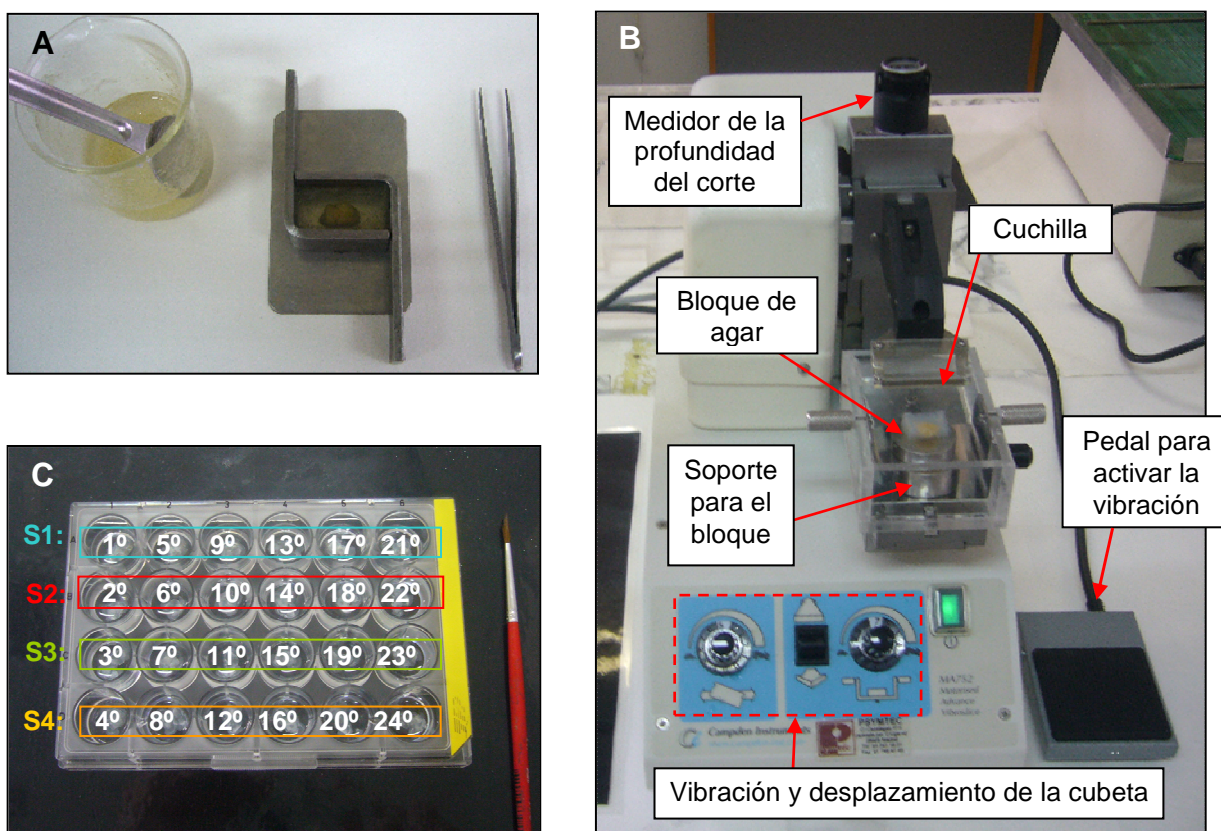


Figura 35. Corte y seriación del tejido. (A) Inclusión del cerebro en un bloque de agar. (B) Vibratomo utilizado para cortar el tejido. El bloque de agar se adhiere (utilizando pegamento instantáneo) a un soporte situado en una cubeta que se llena de PBS. Las secciones se recogen con un pincel y se dejan en la placa. (C) Seriación del tejido en una placa de 16 pocillos. Cada fila incluye 1 de las 4 series de tejido equivalentes (S1-4). Los números en blanco indican el orden en el que se colocan las secciones de tejido en la placa (tras llegar al pocillo 24º, se continúa por el 1º).

Inmunohistoquímica

El tejido se procesó por inmunohistoquímica. Esta técnica de marcaje se basa en la afinidad de los anticuerpos por moléculas con capacidad antigénica (Peinado, Pedrosa y Rodrigo, 1996, Figura 36). Para la evaluación de las diferentes etapas de la neurogénesis, se realizó la determinación inmunohistoquímica de los siguientes marcadores:

BrdU (5'-bromo-2'-deoxiuridina): La BrdU es un análogo sintético del nucleótido timidina. Tras su administración por vía intraperitoneal se incorpora (aproximadamente a lo largo de las 2 h siguientes), en el ADN nuclear de las células que se encuentran en proliferación, concretamente en la fase S. Permanece en el ADN de las células hijas, permitiendo estudiar su destino (Taupin, 2007). Como se ha comentado en el apartado anterior, un grupo de animales se sacrificó tras las inyecciones de BrdU para evaluar la proliferación celular y la elección del fenotipo neuronal o glial (mediante el comarcaje de BrdU con DCX o GFAP), mientras que otros se sacrificaron tras 21 días para evaluar la supervivencia a largo plazo de las nuevas células.

PCNA (Antígeno de Proliferación Celular Nuclear, de Proliferating Cell Nuclear Antigen): Es una proteína de expresión nuclear necesaria para la acción de las enzimas polimerasas que sintetizan el ADN (Jonsson y Hubscher, 1997). La PCNA (Figura 37A) es un marcador endógeno de proliferación porque se expresa en las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, M; Figura 6, Capítulo I; revisado en Mandyam, Norris y Eisch, 2004). Tras la salida del ciclo, permanece temporalmente en las células en G0 durante un período aproximado de 72 h, por lo que puede sobreestimar ligeramente el número de células proliferativas (Mandyam, Harburg y Eisch, 2007). Puesto que la célula proliferativa en fases del ciclo distintas a la S no incorpora BrdU pero expresa PCNA, es frecuente encontrar más células PCNA+ que BrdU+ en números totales. Sin embargo, el resultado de ambos marcadores debe correlacionar (Mandyam, Norris y Eisch, 2004) a no ser que ocurra alguna alteración en el ciclo de la célula. En este experimento, la PCNA se empleará para corroborar el dato de proliferación obtenido mediante el marcaje de BrdU.

GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida, de Glial Fibrillar Acidic Protein): Es una proteína de los filamentos intermedios (constituyentes del citoesqueleto) que es característica de los astrocitos maduros (Eliasson et al., 1999) y por tanto se expresa en las nuevas células de la ZSG que se diferencian en astrocitos (Steiner et al., 2004) (Figura 37C). La GFAP también se expresa en las células radiales progenitoras de la ZSG, que proliferan para dar origen a las nuevas neuronas o células gliales. Curiosamente, estas células progenitoras no sólo expresan GFAP en reposo sino también cuando entran en ciclo, como en la fase de mitosis (Figura 8, Capítulo I; Seri et al., 2004). Es posible distinguir la célula precursora del astrocito porque, aunque ambas expresan GFAP, el precursor presenta una morfología radial mientras que el astrocito posee morfología estrellada (Seri et al., 2004; Steiner et al., 2004). La expresión de GFAP desaparece si la célula postmitótica elige el destino neuronal (Steiner et al., 2004). En este estudio, la GFAP se empleará para evaluar la población de células progenitoras en la ZSG (GFAP+ con morfología radial) y el porcentaje de nuevas células que se diferencian en astrocitos (comarcaje de BrdU con célula GFAP+ de morfología estrellada). En las nuevas células de la ZSG, el destino glial es mucho menos frecuente que el neuronal, pero la mayoría de las células que se diferencian en glía lo hacen en astrocitos (Steiner et al., 2004).

DCX (Doblecortina, de X-linked gene doublecortin): Es una proteína de unión a microtúbulos que interviene en la reorganización axonal, la sinaptogénesis y la migración celular durante el neurodesarrollo (Nacher, Crespo y McEwen, 2001). En el hipocampo adulto, se expresa en las neuronas jóvenes de la ZSG, desde que la célula postmitótica elige el fenotipo neuronal (a las pocas horas después de la división) hasta que madura en neurona adulta a las 3-4 semanas, hallándose su máxima expresión entre los siete y 14 días (Brown et al., 2003). Inicialmente, las células DCX+ tienen una morfología unipolar o bipolar con procesos muy cortos o inexistentes, orientados en horizontal a la ZSG. En estas primeras etapas, las DCX+ tienen capacidad de proliferación y dan lugar a otras nuevas neuronas. A partir de una semana, extienden sus axones en vertical hacia el área CA3 y su árbol dendrítico aumenta progresivamente en complejidad. A partir de una-dos semanas, estas células DCX+ parecen intervenir en procesos de memoria y aprendizaje hipocampal (Brown et al., 2003; Christie y Cameron, 2006; Leuner y Gould, 2010). En este trabajo, la DCX (Figura 37B) servirá para evaluar el número de neuronas jóvenes en la ZSG y su grado de maduración (horizontalidad y desarrollo del árbol dendrítico). Además, se evaluará el porcentaje de células con destino neuronal (comarcaje de BrdU con célula DCX+).

NeuN (Proteína nuclear específica neuronal, de Neuronal Nuclei): Es un marcador nuclear de neurona adulta que se halla en la mayoría de las células neuronales del sistema nervioso (Mullen, Buck y Smith, 1992). Se expresa en las nuevas neuronas a partir de las 3-4 semanas de vida, al tiempo que desaparece la expresión de doblecortina (Brown et al., 2003; Christie y Cameron, 2006). Sin embargo, en este trabajo la NeuN (Figura 37D) no se empleará para evaluar la maduración de las nuevas neuronas sino para estudiar el efecto

del estrés sobre la estructura del hipocampo, ya que la NeuN se expresa en las neuronas granulares y piramidales de las capas celulares.

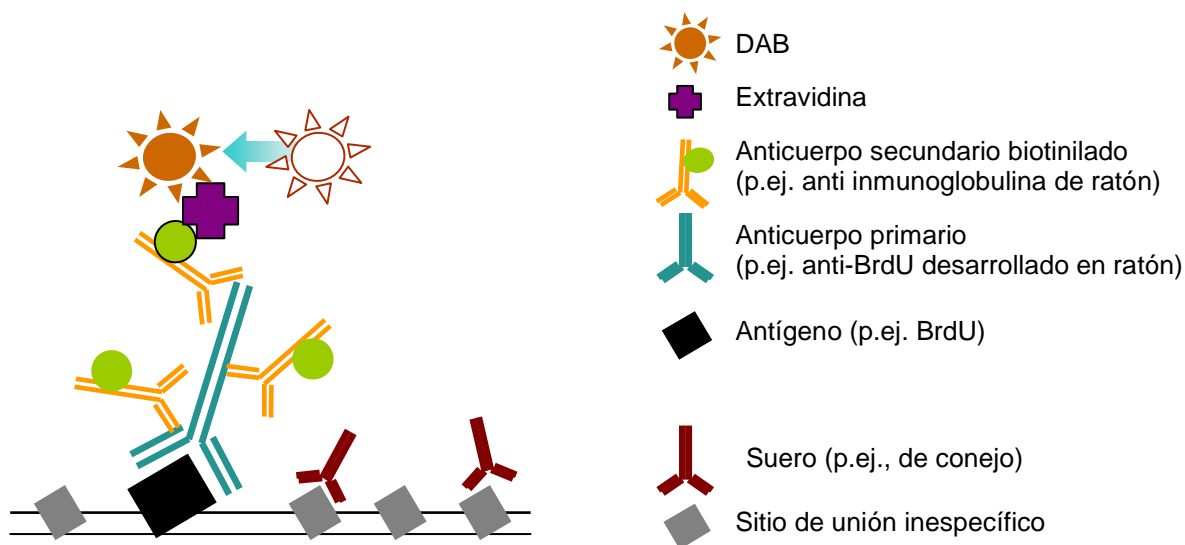


Figura 36. Esquema del sistema de revelado por inmunohistoquímica. El anticuerpo primario reconoce y se acopla a la estructura de interés (antígeno). Con el anticuerpo primario se pueden conjugar varios anticuerpos secundarios biotinilados, incrementando la señal. La biotina se conjuga con la enzima extravidina, que oxida la DAB convirtiéndola en un precipitado color marrón que marca el antígeno, permitiendo su visualización. La función del suero consiste en bloquear lugares de unión inespecíficos, lo cual favorece la unión del anticuerpo primario al antígeno.

La inmunohistoquímica se realizó sobre secciones a temperatura ambiente y en flotación en placas de varios pocillos, en los cuales se añadían y extraían los reactivos o soluciones. A continuación se detallan los protocolos correspondientes a los distintos marcadores. En todos los casos se empleó un revelado de tetrahidrocloruro de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) y peroxidasa (extravidina) unida a biotina (Figura 36).

Inmunohistoquímica para PCNA, GFAP, DCX y NeuN:

Primer día:

- Desactivación la peroxidasa endógena durante 30 minutos con una solución de PBS (80 %), metanol (Panreac Química S.A.U., Barcelona; 10 %) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂, Panreac; 10 %), en oscuridad y agitación.
- 3 lavados con PBS (10 min por lavado, en agitación).
- Incubación toda la noche en anticuerpo primario, en agitación. Los anticuerpos se disolvieron en una solución de PBS con 0.5% de Triton X-100® (Panreac) y 2.5 % de suero del animal en el que estaba desarrollado el anticuerpo secundario. Los anticuerpos primarios y sus diluciones fueron:

AntiPCNA policlonal, desarrollado en ratón (Sigma; dilución 1:1000)

AntiGFAP policlonal, desarrollado en conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca; dilución 1:1000)

AntiDCX policlonal, desarrollado en cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz EEUU; dilución 1:200)

AntiNeuN monoclonal, desarrollado en ratón (Chemicon, Temecula, EEUU; dilución 1:500)

Segundo día:

- 3 lavados con PBS (10 min por lavado, en agitación). Incubación en anticuerpo secundario biotinilado durante 2 h en agitación. Estos anticuerpos se disolvieron a 1:800 en PBS con 0.5% de Triton X-100® y 2.5 % de suero de oveja. Los anticuerpos secundarios fueron:

PCNA y NeuN: Anti Inmunoglobulina G de ratón policlonal, desarrollado en conejo (Dako)

GFAP: Anti IgG de conejo policlonal, desarrollado en cerdo (Dako)

DCX: Anti IgG de cabra desarrollado en conejo (Dako)

- 3 lavados con PBS (10 min por lavado, en agitación).
- Incubación en extravidina conjugada a peroxidasa (Extravidin®, Sigma) diluida a 1:1000 en PBS, durante 1 h en oscuridad y agitación.
- 3 lavados con PBS (10 min por lavado, en agitación).
- Revelado en DAB (Sigma) durante el tiempo necesario para visualizar el marcador (segundos-minutos). La solución de revelado se compuso de 500 µl de DAB disuelta al 5 % en agua destilada, 50 µl de peróxido de hidrógeno y 50 ml de PBS.

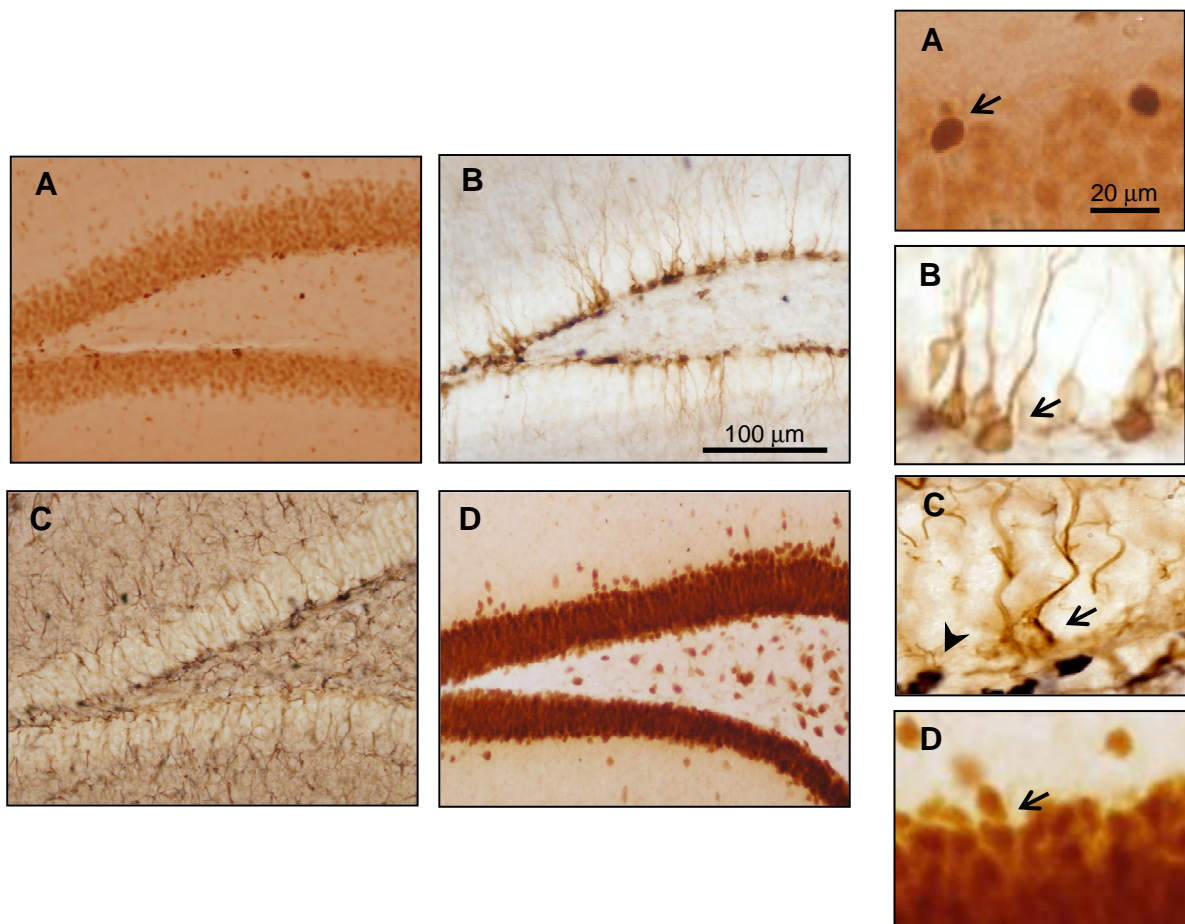


Figura 37. Resultado del marcaje inmunohistoquímico del giro dentado con PCNA (A), DCX (B), GFAP (precursores con morfología radial, C) y NeuN (D). Las flechas negras señalan las células positivas. La punta de flecha en (C) muestra un núcleo de BrdU cuya señal se ha intensificado con níquel (ver los siguientes protocolos).

Inmunohistoquímica para BrdU

La inmunohistoquímica para BrdU (Figura 38), al encontrarse incorporada en el ADN nuclear de la célula, requirió de pasos adicionales:

Primer día:

- Desactivación la peroxidasa endógena durante 30 minutos con una solución de Tris-PBS (TPBS, Anexo II) (80 %), metanol (10 %) y peróxido de hidrógeno (10 %) en oscuridad y agitación.
- 3 lavados con TPBS (10 min por lavado, en agitación).
- Digestión de proteínas con proteinasa K (Sigma) disuelta a 5 µg / ml de TPBS durante 30 min en estufa a 37 °C.
- 3 lavados con TPBS (10 min por lavado, en agitación).
- Desnaturalización del ADN en ácido clorhídrico (2N HCl, Pancreac), durante 30 min en estufa a 37 °C.
- 1 lavado de 10 min con tampón borato 0.1 M (pH 8.5) en agitación (Anexo II).
- 3 lavados con TPBS (10 min por lavado, en agitación).
- Incubación toda la noche en antiBrdU monoclonal, desarrollado en ratón (Sigma, dilución 1:1000). El anticuerpo se disolvió en una solución de PBS con 0.5 % de Triton X-100 y 2.5 % de suero de conejo.

Segundo día:

- 3 lavados con TPBS (10 min por lavado, en agitación).
- Incubación en el anticuerpo biotinilado Anti inmunoglobulina G de ratón policlonal, desarrollado en conejo (Dako, dilución 1:800) durante 2 h. El anticuerpo se disolvió en una solución de PBS con 0.5 % de Triton X-100 y 2,5 % de suero de oveja.
- 3 lavados con TPBS (10 min por lavado, en agitación).
- Incubación en extravidina conjugada a peroxidasa (Extravidin®, Sigma) diluida a 1:1000 en PBS, durante 1 h en oscuridad y agitación
- 3 lavados con TPBS (10 min por lavado, en agitación).
- Revelado en DAB (Sigma). La solución de revelado se compuso de 500 µl de DAB disuelta al 5 % en agua destilada, 50 µl de peróxido de hidrógeno y 50 ml de PBS.

Inmunohistoquímicas dobles de BrdU/DCX y BrdU/GFAP

La inmunohistoquímica simple de BrdU se realizó en los animales con BrdU inyectada para la evaluación de la supervivencia celular. En los animales con BrdU inyectada para la evaluación de la proliferación celular, la BrdU se comarcó con la DCX o la GFAP con una doble inmunohistoquímica, con el fin de evaluar la diferenciación de las nuevas células en neuronas o astrocitos. En primer lugar se realizó la inmunohistoquímica de DCX o GFAP según el protocolo detallado anteriormente para estas proteínas. Tras el revelado del primer marcador con DAB y el lavado de las secciones, se llevó a cabo la inmunohistoquímica para BrdU. Se siguió el protocolo habitual de BrdU con las siguientes modificaciones:

- Se omite el paso de desactivación de peroxidasa (se ha desactivado en la inmunohistoquímica para el marcador anterior).

- 15 min en proteinasa K y en 2N HCl.
- A la solución de revelado compuesta de 500 µl de DAB al 5 %, 50 µl de peróxido de hidrógeno y 50 ml de PBS se añaden 0.02 gr de cloruro de níquel (NiCl₂, Sigma) para intensificar la señal de la DAB.

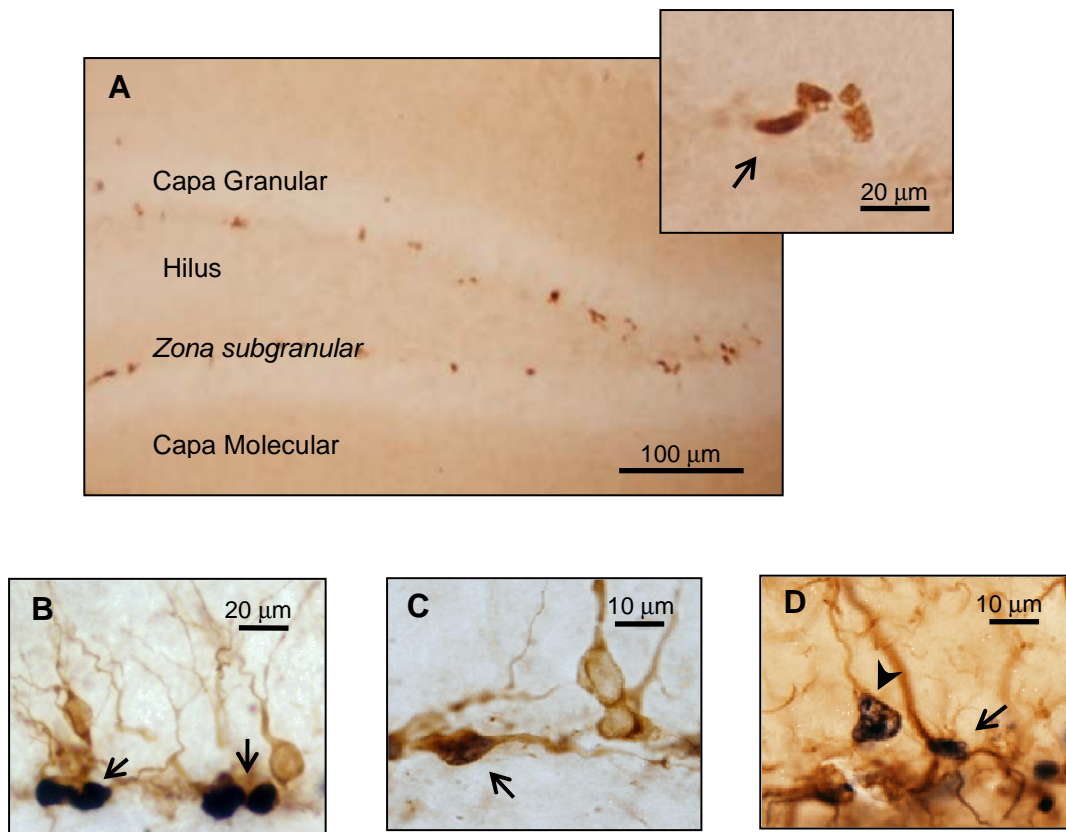


Figura 38. Marcaje de BrdU en el giro dentado del hipocampo (A) y doble inmunohistoquímica de BrdU+níquel con doblecortina (B, C) y GFAP (D). Los núcleos de BrdU se pueden encontrar indiferenciados (B, flechas) o bien diferenciados en neurona (C, la flecha marca una célula positiva (+) para BrdU/DCX) o en astrocito (D, la flecha negra marca una célula BrdU/GFAP+ con morfología estrellada). La punta de flecha en (D) señala un núcleo de BrdU en una célula precursora, que expresa GFAP pero tiene morfología radial. Nótese la diferencia entre el color negro del revelado con DAB+níquel (núcleos BrdU+ en imágenes B-D) y el color marrón del revelado con DAB (células DCX+ en B y C, células GFAP+ en D y núcleos BrdU+ en A).

Tras la inmunohistoquímica, las secciones se lavaron en PBS y se montaron sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma). Tras secar, se deshidrataron en alcoholes de gradaci (70°, 90°, 100° I, 100° II, xileno I, xileno II) durante 5 min en cada alcohol y se montaron con DPX (Sigma).

Detección de apoptosis

La apoptosis (revisada en Majno y Joris, 1995) es un tipo de muerte celular que se encuentra bajo control genético. Puede iniciarse por el reloj interno de la célula o bien por agentes extracelulares, como por ejemplo las hormonas glucocorticoides. La apoptosis implica una muerte controlada en tanto que conlleva una secuencia de cambios programada por la célula. Estos cambios son bioquímicos (p.ej. activación de enzimas caspasas) y morfológicos. En primer lugar, el contenido de la célula se condensa y también

la cromatina del núcleo (picnosis), que se fragmenta de forma que el ADN se rompe en segmentos. La membrana emite procesos que se separan de la célula, desintegrándola y formando cuerpos apoptóticos que pueden ser fagocitados (Figura 39A). La célula también puede dar lugar a un único cuerpo apoptótico denso, de forma redondeada. El proceso de apoptosis es rápido y puede completarse, aproximadamente, en 30 minutos. La apoptosis es clave en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta (Dupret et al., 2007) y por ese motivo se ha evaluado en este trabajo.

La apoptosis se determinó con un kit de detección de apoptosis in situ (NeuroTACS II, Trevigen, Gaithersburg, EEUU; Figura 39B) que marca el ADN fragmentado. Se siguió el protocolo indicado por la casa comercial, que se detalla a continuación.

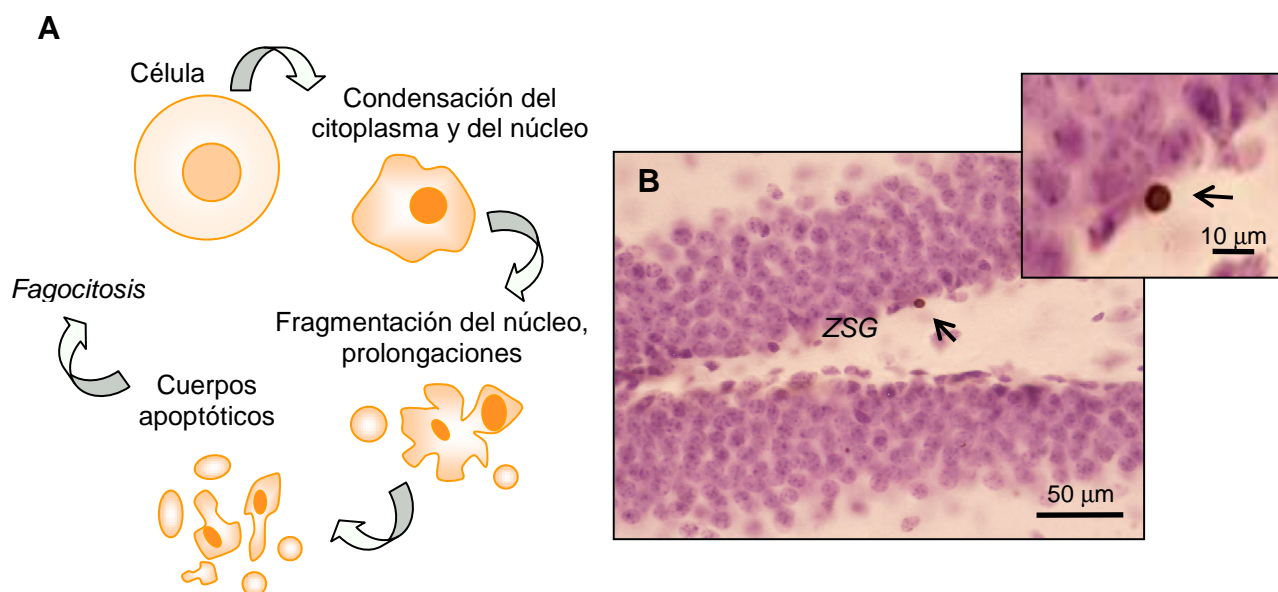


Figura 39. Apoptosis. (A) Esquema de las etapas de la apoptosis (Majno y Joris, 1995). (B) Núcleo apoptótico (flecha) en la capa granular del giro dentado del hipocampo, contrateñido. Al igual que se observa en la imagen, la mayoría de los núcleos apoptóticos cuantificados en el hipocampo se localizaron dentro o cerca de la ZSG. Esto sugiere su relación con la neurogénesis.

DetECCIÓN DE APOPTOSIS CON EL KIT NEUROTACS II

El kit se utilizó sobre secciones montadas en portaobjetos que secaron durante un día. El protocolo se realiza en coplins, salvo los pasos en gota que se realizan en una cámara húmeda, delimitando las secciones con un lápiz grueso para controlar la propagación del líquido. Los reactivos mencionados en el protocolo están incluidos en el kit y se ha conservado el nombre con el que figuran en el protocolo original.

- Lavado en PBS 1 M, pH 7.4 (10 min, en agitación).
- Incubación en proteinasa K, 25 min en estufa (37 °C)
- 2 lavados en PBS (5 min por lavado, en agitación).
- Lavado en "Quenching solution" (45 ml de metanol con 5 ml de H₂O₂ al 30 %) durante 5 min.
- Lavado en PBS (1 min, en agitación).
- Lavado en solución de marcaje de la deoxinucleotidil Transferasa Terminal (*TdT Labelling Buffer*) a 1 M (5 ml de *TdT Labelling buffer* 10 M con 45 ml de agua destilada) durante 5 min.

- Incubación en cámara húmeda y en estufa a 37°C con el kit conteniendo los reactivos de marcaje:

Para 500 µl:

TdT Labeling Buffer a 1x – 500 µl
TdT dNTP Mix -----10 µl
TdT Enzyme -----10 µl
50x Mn²⁺ Cation ----- 10 µl

- Lavado en solución de paro de la enzima a 1 M (5 ml de *TdT Stop buffer* 10 M con 45 ml de agua destilada) durante 5 min.
- 2 lavados en PBS (5 min por lavado, en agitación).
- Incubación en cámara húmeda con solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa, a temperatura ambiente y en oscuridad:

Para 500 µl:

PBS 1 M ----- 500 µl
Strep-HRP-----10 µl

- 2 lavados en PBS (5 min por lavado, en agitación).
- Revelado en solución de diaminobenzidina con potenciador y peróxido de hidrógeno durante 2-7 min en oscuridad

Solución de revelado (50 ml):

PBS 1 M ----- 50 ml
DAB -----250 µl
DAB enhancer ----- 50 µl
H₂O₂ al 30 % ----- 50 µl

- Lavado en PBS (5 min) y contratinción en azul: entre 1 y 3 min en la solución “*Blue counterstaining*”, en función de la intensidad deseada, y lavados en agua destilada. Tras el secado de los portaobjetos, se procede a la deshidratación (en cadena de alcoholes) y montaje con DPX de las secciones.

Cuantificación

Proliferación, supervivencia, fenotipo celular, neuronas jóvenes y apoptosis

Para la evaluación de la neurogénesis (proliferación, supervivencia, fenotipo celular, neuronas jóvenes y apoptosis), la cuantificación se realizó en una de cada cuatro (para la BrdU) o en una de cada ocho (para el resto de marcadores) secciones del hipocampo (Tabla 7). Aunque inicialmente el tejido estaba distribuido en cuatro series (1/4, Figura 35C), era posible escoger las secciones no consecutivas de una serie y obtener así una fracción de 1/8 del tejido. En cualquier caso, las secciones empleadas en cada conteo estuvieron ordenadas en el eje rostrocaudal e igualmente espaciadas entre sí. Cada serie comenzaba a -1,22 mm del bregma y finalizaba aproximadamente a -2,46 mm (Paxinos y Franklin, 2001), abarcando principalmente la región dorsal del hipocampo. La cuantificación se realizó en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado aleatoriamente en el hemisferio izquierdo o en el derecho. Excepcionalmente, la apoptosis no se evaluó sólo en la ZSG sino en todo el hipocampo (áreas CA1, CA3 y giro dentado), distinguiendo cada una de sus capas celulares en función de un criterio neuroanatómico (Paxinos y Franklin, 2001; véase

la Figura 41A). Las células positivas en cada sección se cuantificaron con un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara digital en color (CCD-Iris, Sony España), utilizando el objetivo de 1000 aumentos. Posteriormente, el total de células por hipocampo se estimó multiplicando el número de células contadas x 4 (BrdU) o x 8 (resto de marcadores), según el procedimiento de Kempermann et al. (2003). Este método es una simplificación de la estereología y ha demostrado ser válido para evaluar la neurogénesis hipocampal (Egeland et al., 2010; Kempermann et al., 2003; Steiner et al., 2004).

Marcaje de la sección	Seriación	Tipo celular cuantificado	Significado
BrdU (supervivencia)	1/4	Núcleos BrdU+	Supervivencia de las nuevas células de la ZSG tras 21 días
BrdU (proliferación)* con DCX	1/8	Núcleos BrdU+	Proliferación celular en la ZSG
		Células DCX+ (anotando si su disposición era horizontal o vertical)	Neuronas jóvenes en la ZSG y su grado de desarrollo (horizontalidad)
		Células BrdU/DCX+	Elección del fenotipo neuronal
BrdU (proliferación)* con GFAP	1/8	Núcleos BrdU+	Proliferación celular en la ZSG
		Células GFAP+ con morfología radial	Células precursoras de la ZSG
		Células BrdU/GFAP+ con morfología estelar	Elección del fenotipo glial (astrocitario)
PCNA	1/8	Núcleos PCNA+	Proliferación celular en la ZSG
Apoptosis (evaluada en CA1, CA3 y giro dentado)	1/8	Núcleos apoptóticos	Muerte celular por apoptosis

Tabla 7. Secciones empleadas en la cuantificación. La tabla resume el marcaje de las secciones cuantificadas, la fracción de seriación del tejido que corresponde a cada marcador, los tipos celulares que se cuantificaron en cada sección y el aspecto de la neurogénesis hipocampal que se pretende evaluar con cada uno de los marcadores. (*) Los núcleos en proliferación marcados con BrdU se evalúan en 1/4 del tejido, pero 1 de cada 2 secciones de esa serie se comarcó con DCX (1/8 del tejido) y el resto se comarcó con GFAP (1/8 del tejido).

El grado de maduración de las neuronas jóvenes en la ZSG se evaluó cuantificando el % de células DCX+ que presentaban una disposición horizontal (Tabla 7). La horizontalidad indica los primeros estadios de maduración de la nueva neurona y se caracteriza por el núcleo orientado en paralelo a la ZSG con procesos inexistentes o cortos con orientación horizontal (Figura 40A). Por otra parte, en las neuronas con disposición vertical (es decir, con el núcleo y los procesos orientados en perpendicular a la ZSG) se evaluó la longitud y complejidad de las dendritas basales, que proyectan al área CA3 y participan en la memoria espacial (Farioli-Vecchioli et al., 2008). Para ello, se tomó una foto representativa (un área cuadrada de 340 x 340 µm) de la hoja superior del giro dentado en cada una de las secciones de DCX. Las fotografías se tomaron a 400 aumentos con un microscopio Olympus BX51 conectado a una cámara Olympus DP70 y a un ordenador con un software de imagen (DP Controller 1.2.1.108, Olympus). Con el programa Power Point (Microsoft), y tomando como referencia la escala de las fotografías, se dibujó una matriz de líneas

horizontales paralelas y equidistantes separadas 40 µm entre sí. Esta matriz se superpuso a cada una de las fotografías y se cuantificó el número de dendritas que cruzaban cada una de las líneas, situadas entre 0 y 280 µm de distancia del soma (Figura 40B). El total de dendritas cuantificadas en cada altura se dividió entre el número de núcleos DCX+ con orientación vertical presentes en la imagen.

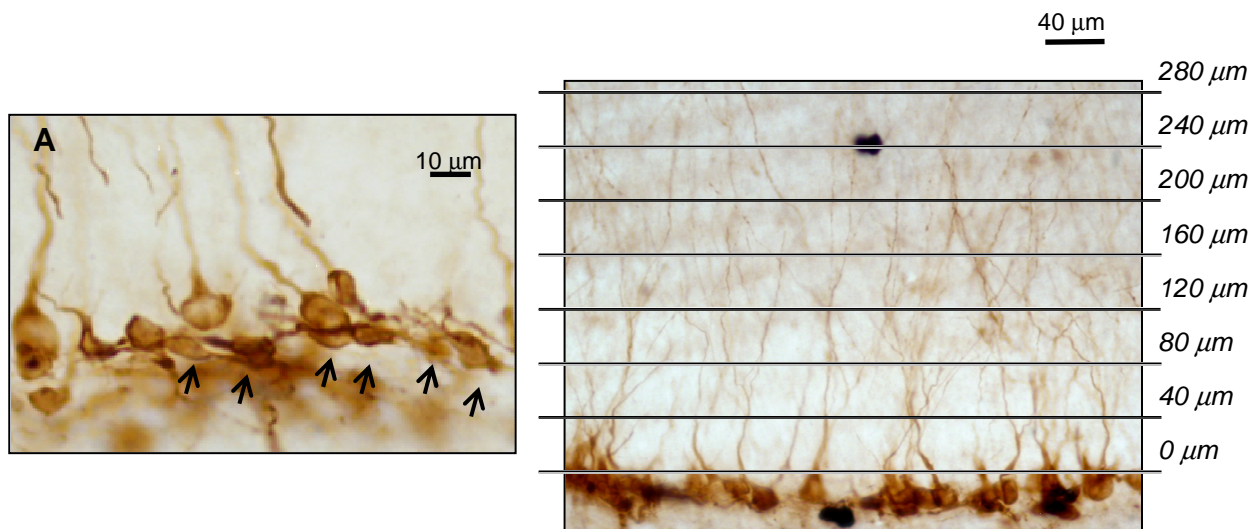


Figura 40. Evaluación del desarrollo de las neuronas jóvenes DCX+. (A) Las flechas señalan células DCX+ dispuestas en horizontal, paralelas a la ZSG. (B) Ejemplo del sistema empleado para la cuantificación del árbol dendrítico de la DCX con disposición vertical. Sobre las fotografías de DCX se superpuso una matriz similar a la de la imagen. La medida “cero” coincidía con la unión de la dendrita y el núcleo.

Estructura del hipocampo

El estudio del efecto del estrés sobre la estructura anatómica del hipocampo se realizó en cada animal sobre una serie completa (1/4; comprendida entre -1,22 mm y -2,46 mm del bregma, aproximadamente) del hipocampo inmunoteñida con el marcador de neurona adulta NeuN. En esta ocasión se emplearon técnicas estereológicas. La estereología es un conjunto de métodos que permite obtener información cuantitativa de un objeto de interés a partir de secciones del mismo (Cruz-Orive, 1987) simplificando, por tanto, la cuantificación. Se empleó un microscopio BX51 (Olympus) conectado a una cámara digital en color (CCD-Iris, Sony España) y a un ordenador con el software estereológico CAST-Grid 3.1 (Olympus).

Para estimar el volumen del hipocampo, las áreas CA1, CA3 y giro dentado se señalaron sobre cada sección y posteriormente se subdividieron en cada uno de sus estratos celulares, usando las herramientas incluidas en el programa CAST-Grid y en función del atlas de Paxinos y Franklin (2001, Figura 41A). El software CAST-Grid superpone una matriz de puntos sobre la imagen, situados aleatoriamente pero equidistantes entre sí. Con el objetivo de 40 aumentos, se contó el número de puntos que estaban dentro o tocando los límites de cada una de las áreas evaluadas (Figura 41B). El volumen ($Est_{(Vref)}$) se estimó para cada área mediante el principio de Cavalieri (Korbo et al., 1990), con la siguiente fórmula:

$$Est_{(Vref)} = T \times (a/p) \times \Sigma P$$

T: Distancia media entre las secciones contadas

a/p: Área asociada a los puntos de la plantilla (12763 µm²)

ΣP: Número de puntos dentro del área

Como medida de la precisión de las estimaciones se calculó el coeficiente de error intrasujetos (CE) según la fórmula de Gundersen y Jensen (1987), que proponen que el cálculo de la variación debida al conteo de las partículas (en este caso puntos) dentro de una misma sección podría ser la que tiene mayor influencia dentro del CE total:

$$CE = \sqrt{[(3A + C - 4B)/12] / \Sigma P}$$

A: ΣP_i^2

B: $\Sigma P_i \times P_{(i+1)}$

C: $\Sigma P_i \times P_{(i+2)}$

Donde P_i es el número de puntos contado en cada sección

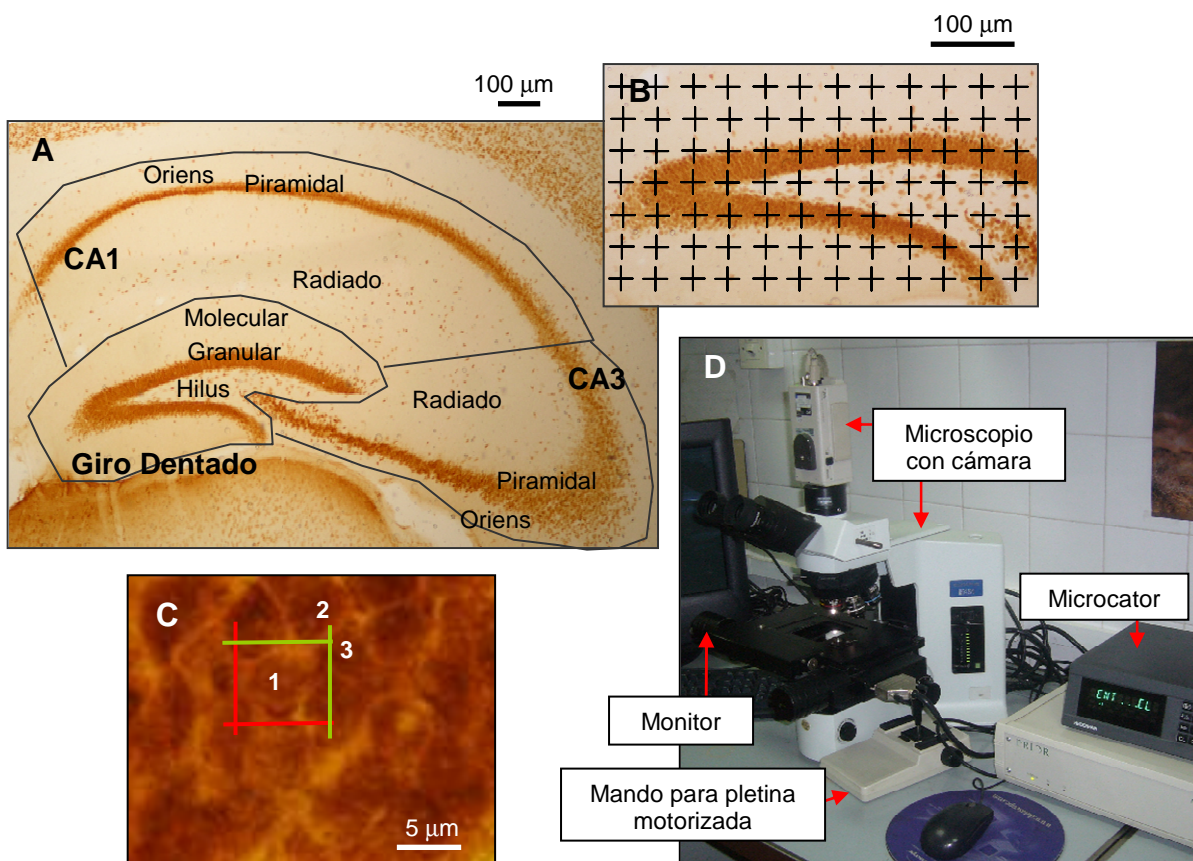


Figura 41. Estudio de la estructura del hipocampo. (A) Sección del hipocampo inmunoteñida con NeuN, se señalan las áreas cuantificadas en la estimación del volumen. La capa granular incluye a la ZSG. Esta división también es válida para la cuantificación de la apoptosis. (B) Ejemplo de una matriz de puntos (cruces) utilizada para la estimación del volumen. (C) Ejemplo de un disector empleado para la cuantificación de la densidad celular en la capa granular del giro dentado. Solo se consideran las neuronas que, estando bien enfocadas, se encuentran tocando las líneas verdes o dentro del disector (numeradas del 1 al 3), pero sin tocar las líneas rojas. (D) Equipo empleado para el conteo estereológico.

En la capa granular del giro dentado también se estimaron la densidad y el número total de células NeuN+, dada la estrecha relación de esta zona con la neurogénesis. Para estimar la densidad celular, sobre cada sección se seleccionó únicamente la capa granular (incluyendo la ZSG) con el software CAST-Grid. El programa realizó un muestreo sistemático de la zona generando disectores (cuadrados de 10.82 x 10.82 μm) en cuyo interior se contaron las células NeuN+ con el objetivo de 1000 aumentos (Figura 41C). Se evaluaron al menos 100 disectores por animal considerando un grosor de 10 μm (desechando 3 μm de la superficie de la sección), gracias a un medidor de profundidad

acoplado al equipo. La densidad neuronal (Nv) se calculó mediante la siguiente fórmula (West, 1993):

$$Nv = \Sigma(Q-) / \Sigma(h \times a_{fra})$$

Q-: Núcleos NeuN+ cuantificados en los disectores

a_{fra}: Área del disector (117.07 μm²)

h: Grosor de la sección evaluado (10 μm)

El total de células en la capa granular se calculó para cada animal multiplicando el volumen previamente estimado para esa zona por la densidad de células NeuN+.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con ANOVAs de dos vías ('genotipo x estrés') seguidos de análisis post hoc de la diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD). En el caso del árbol dendrítico de las DCX+, el análisis fue un ANOVA de tres vías con medidas repetidas ('genotipo x estrés x distancia desde el soma') seguido de análisis LSD. Se consideró significativa la probabilidad igual o menor de 0.05. Los análisis se realizaron con el software STATISTICA 7.1 (Stat Soft). El error estándar de la media (SEM) de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

2.b- Material y métodos: Determinación de corticosterona en suero

La activación del eje HHA constituye un factor clave de la respuesta de estrés, de manera que el incremento de los niveles de glucocorticoides podría explicar el deterioro de la neurogénesis en situaciones de estrés crónico (p.ej., Montaron et al., 2006; Murray, Smith y Hutson, 2008). Los niveles séricos de corticosterona (el glucocorticoide principal en roedores) se evaluaron en cuatro condiciones diferentes: control (estabulación estándar), estrés crónico (21 días de inmovilización, 3 h/día), estrés agudo (30 min de inmovilización) y estrés crónico+agudo (21 días de inmovilización, 3 h/día + 30 min de inmovilización el día 22) (Figura 42). La inmovilización se llevó a cabo como muestra la Figura 32 (pág 80).

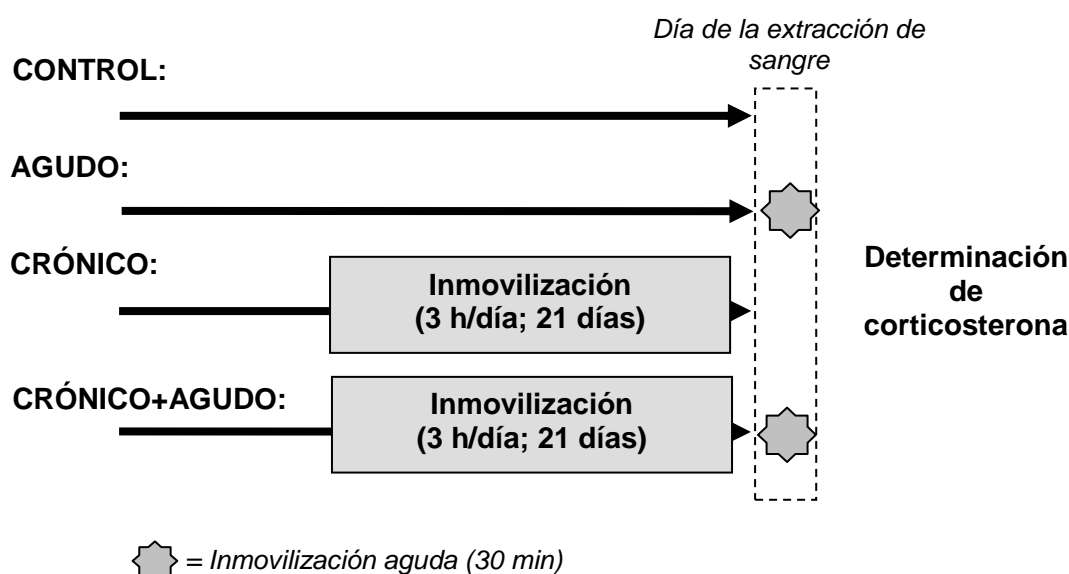


Figura 42. Tratamientos experimentales para la determinación de la corticosterona. La extracción de sangre troncal en los animales sometidos a estrés crónico se realizó al día siguiente de la última inmovilización; en los sometidos a inmovilización aguda se realizó inmediatamente después.

Para los ensayos de cuantificación de corticosterona, los animales fueron decapitados (aproximadamente a las 12:00) y la sangre troncal se recogió en tubos para suero con EDTA-K2 (Becton Dickinson, Madrid) que se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El suero obtenido (aproximadamente 400 µl por animal) se congeló a -80°C hasta los ensayos. El análisis de los niveles séricos de corticosterona se realizó mediante un radioinmunoensayo competitivo utilizando un kit comercial (*DPC-Coat-A-Count kit*, Diagnostic Products Corporation, California, EEUU) con rango de detección de 0.1 a 400 ng de corticosterona por 100 ml de suero y con una elevada especificidad (4 % de reactividad cruzada con deoxicorticosterona y 0.6 % con otros esteroides). La cuantificación de los niveles de corticosterona se llevó a cabo en un contador gamma (*liquid scintillation counter*, Beckman Instruments, Maryland, EEUU) y los niveles se interpolaron en una curva estandar del tipo Log-logit, siendo los coeficientes de variación siempre menores del 10 %. Los análisis estadísticos fueron ANOVAs de dos factores ('genotipo x tratamiento'), seguidos de comparaciones post hoc LSD. El error estándar de la media (SEM) de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

2.c- Material y métodos: Laberinto de hoyos

Habitación y aprendizaje espacial en el laberinto de hoyos

La prueba del laberinto de hoyos se empleó para testar el efecto del estrés crónico sobre la memoria espacial y las conductas de ansiedad y exploración. Como se ha demostrado en el bloque experimental anterior, el laberinto de hoyos es una tarea útil para evaluar los déficit comportamentales de los mutantes de LPA₁. Los animales sometidos a estrés crónico comenzaron la prueba al día siguiente tras finalizar el protocolo de inmovilización, mientras que los animales controles se manipularon durante los cuatro días anteriores al comienzo de la tarea, para acostumarlos al contacto con el experimentador. Los animales de ambas condiciones se sometieron a restricción calórica cuatro días antes de comenzar la prueba (hasta alcanzar aproximadamente el 85 % de su peso basal) y se mantuvieron a dieta a lo largo del experimento.

Las condiciones de la habitación, el aparato y el protocolo de análisis conductual fueron similares al procedimiento que ya se ha comentado en el capítulo anterior. Por tanto, en esta ocasión el protocolo se expondrá de manera resumida. La tarea comenzó con la fase de habitación al laberinto, consistente en dos días con un ensayo al día (3 min de duración) con todos los hoyos reforzados. La etapa de aprendizaje espacial consistió en cuatro días consecutivos en los que se reforzaba un patrón fijo de cuatro hoyos. Cada día se realizaron cuatro ensayos distribuidos en dos sesiones de dos ensayos consecutivos (intervalo entre ensayos de 45 s) con un intervalo de 2 h entre sesiones. En esta fase, los ensayos duraban el tiempo necesario para que el animal encontrara todos los reforzadores.

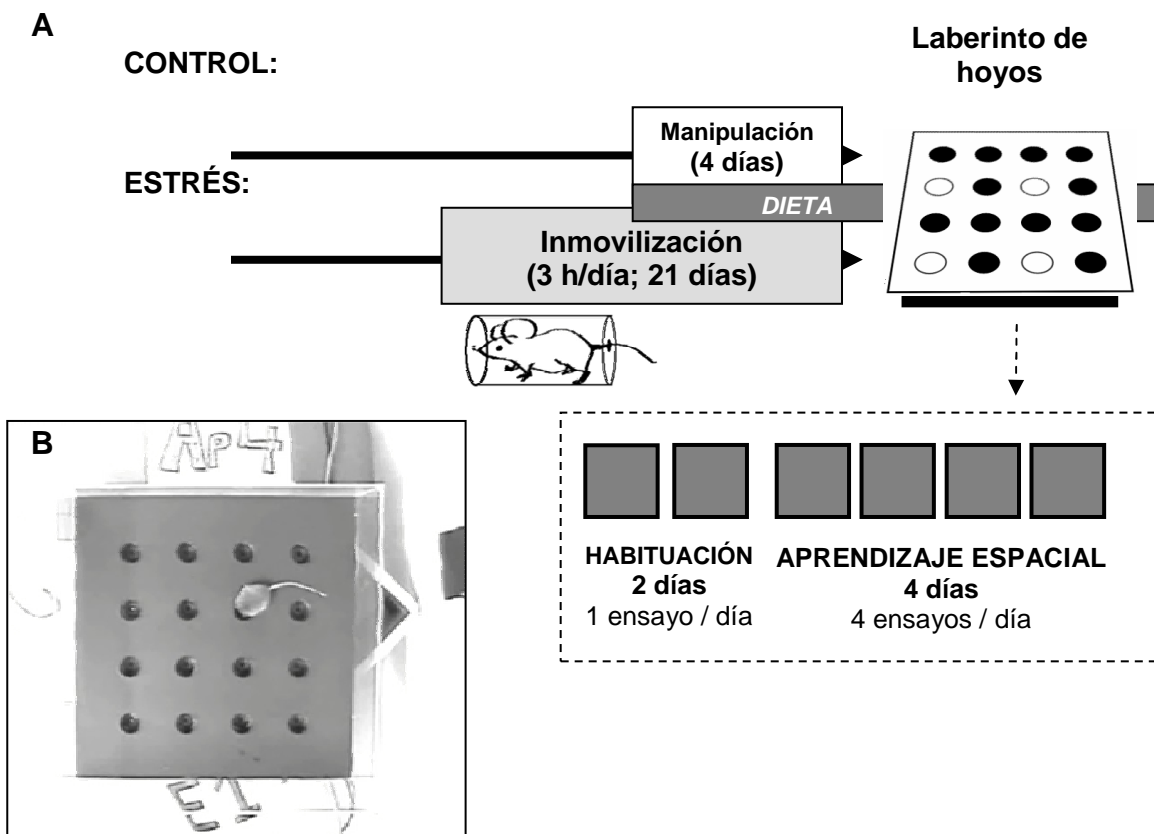


Figura 43. Laberinto de hoyos. (A) Protocolo experimental y (B) captura de un vídeo del experimento donde se observa a un ratón explorando uno de los hoyos reforzados.

Los ensayos se grabaron en vídeo. La locomoción (distancia recorrida; mm/s), tigmotaxis (permanencia en la periferia del laberinto definida como los 6.5 cm interiores a las paredes; % de tiempo) y el *head dipping* (cada vez que el ratón introducía el hocico en un hoyo; frecuencia/min) se registraron en ambas fases del experimento. Se seleccionaron estas variables debido a que, en el estudio anterior, estas conductas demostraron ser las más representativas de la exploración (locomoción, *head dipping*) y del estado emocional (tigmotaxis) de los animales durante la etapa de aprendizaje espacial. Como en el experimento anterior, la locomoción y la tigmotaxis se registraron con un sistema informatizado de análisis de imagen (Ethovision XT 5.0., Noldus), mientras que el *head dipping* se cuantificó observacionalmente. En esta ocasión, las conductas volvieron a expresarse por unidad de tiempo, y se excluyó del análisis el tiempo en el que los animales comían durante la etapa de habituación (para una explicación más detallada consultar el apartado de material y métodos del Capítulo III). En la fase de aprendizaje espacial, también se registraron la latencia en encontrar los reforzadores y los índices de memoria espacial a largo plazo (número de visitas y visitas a los hoyos reforzados dividido por el número total de visitas a los hoyos reforzados y no reforzados) y de trabajo (número de visitas a hoyos reforzados dividido por el número de visitas y visitas a los hoyos reforzados) (Douma et al., 1998).

Análisis estadísticos

Los análisis se realizaron con ANOVAs de tres vías de medidas repetidas seguidos de análisis post hoc LSD. En todos los casos, sólo se consideraron significativas las probabilidades iguales o menores de 0.05. Los análisis se realizaron con el software STATISTICA 7.1. (Stat Soft). El error estándar de la media (SEM) de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

Al contar en esta ocasión con más grupos experimentales, se optó por simplificar algunos análisis con respecto al experimento anterior en el laberinto de hoyos. En la habituación, la habituación intra-ensayo se evaluó comparando los 30 primeros y 30 últimos segundos del primer ensayo ('genotipo x estrés x momento del ensayo'). Sin embargo, las variables de exploración y ansiedad se analizaron conjuntamente en la habituación y el aprendizaje para valorar su cambio entre ensayos ('genotipo x estrés x día').

En la fase de aprendizaje espacial, el efecto del estrés sobre la memoria espacial se analizó a lo largo de los cuatro días de entrenamiento ('genotipo x estrés x día'). Para evaluar la influencia del intervalo temporal, el análisis se repitió incluyendo únicamente los primeros o los últimos ensayos de cada día (intervalos temporales de 24 h y 45 s, respectivamente). En la memoria a largo plazo, el primer ensayo del día refleja la consolidación, mientras que el último ensayo refleja su adquisición a corto plazo durante un día de entrenamiento. En la memoria de trabajo, el intervalo temporal podría influir en los componentes de memoria a largo plazo que intervienen en la tarea de memoria de trabajo (el aprendizaje de las reglas de la tarea). El análisis de la memoria en función de las cuatro etapas que comprenden cada ensayo ('genotipo x estrés x etapa') y que representan una dificultad creciente (véase el experimento anterior) se llevó a cabo únicamente en los días en los que se detectó la mayor diferencia entre los grupos, que correspondieron al cuarto día de entrenamiento en el caso de la memoria a largo plazo y al primer día de entrenamiento en el caso de la memoria de trabajo.

El estudio de la relación potencial entre las variables evaluadas se llevó a cabo únicamente en la etapa de aprendizaje espacial, con el objetivo principal de descartar la influencia de la ansiedad y la exploración sobre la memoria. Las medias de los cuatro días de entrenamiento se promediaron en una única puntuación por animal para toda esta etapa, para cada variable. Estas puntuaciones se correlacionaron entre sí con correlaciones de Pearson, por separado en cada grupo.

3.- Resultados

3.a- Resultados: Neurogénesis hipocampal

Proliferación, precursores neurales y elección del fenotipo neuronal o astrocitario

La proliferación celular se estudió por medio de la administración de BrdU (en los cuatro días anteriores a la perfusión) y por la detección del marcador endógeno de proliferación PCNA. En cuanto al estudio de la BrdU, los análisis mostraron menos proliferación en los maLPA₁-nulos ('genotipo': $F_{(1,20)} = 27.060$, $P < 0.001$; LSD: WT control vs nulo control, $P < 0.05$). Este resultado concuerda con los estudios previos (Matas-Rico et al., 2008) y confirma el papel del receptor LPA₁ en la proliferación celular en el giro dentado. Por otra parte, el estrés crónico por inmovilización deterioró notablemente la proliferación celular en los maLPA₁-nulos, mientras que en los *wild type* sólo produjo una ligera reducción de la proliferación que no resultó significativa ('genotipo x estrés': $F_{(1,20)} = 4.830$, $P < 0.05$; 'estrés': $F_{(1,20)} = 17.644$, $P < 0.001$; LSD: nulo estresado vs nulo control, $P < 0.001$; WT estresado vs WT control, $P > 0.05$) (Figura 44A,C). Esto sugiere que el receptor LPA₁ también participaría en las consecuencias del estrés sobre la neurogénesis. En tanto que el protocolo de administración de BrdU se extendió durante cuatro días, es posible que la supervivencia a corto plazo de las nuevas células, y no únicamente su proliferación, afectara a este resultado. Por tanto, la proliferación celular también se evaluó mediante la expresión de PCNA, que marca todas las células en las fases activas del ciclo. La PCNA también reveló una menor proliferación en los animales nulos y, de nuevo, el estrés sólo redujo la proliferación en el genotipo mutante ('genotipo x estrés': $F_{(1,20)} = 4.745$, $P < 0.05$; 'genotipo': $F_{(1,20)} = 79.186$, $P < 0.001$; 'estrés': $F_{(1,20)} = 20.216$, $P < 0.001$; LSD: nulo estresado vs nulo control, $P < 0.001$; WT control WT vs nulo control, $P < 0.001$) (Figura 44A,D). Aunque en números totales se encontraron más células PCNA+ que BrdU+, ambos marcadores coincidieron estrechamente en cuanto a las diferencias entre grupos. También se cuantificó el número de precursores disponibles en la ZSG (células GFAP+ con morfología radial). La población de precursores primarios puede dañarse a consecuencia del estrés (Yu et al., 2010), lo cual podría afectar a la proliferación celular. Sin embargo, no se hallaron diferencias entre genotipos, y el estrés redujo los precursores radiales por igual en ambos grupos ('estrés': $F_{(1,20)} = 53.250$, $P < 0.001$; LSD: $P < 0.001$; Figura 44A,B). Por tanto, la alteración de los precursores no explica el resultado hallado en la proliferación.

La diferenciación de las nuevas células en neuronas o astrocitos se evaluó mediante el % de BrdU que colocalizaba con DCX o GFAP (en este caso con morfología estrellada). Como era de esperar, se observó preferencia del fenotipo neuronal sobre el glial, pero no se halló ninguna alteración de la diferenciación celular en función del genotipo y el estrés crónico tampoco afectó a la elección del destino neuronal (Figura 45A). Sin embargo, el estrés redujo la diferenciación de las nuevas células en astrocitos, por igual en los ratones WT y en los nulos ('estrés': $F_{(1,20)} = 15.061$, $P < 0.001$, Figura 45B). Posiblemente, la diferenciación glial y neuronal se regulan por mecanismos distintos (Steiner et al., 2004; Wong y Herbert, 2006). A pesar de no hallarse ninguna alteración del fenotipo neuronal, el número de neuronas jóvenes DCX+ se halló reducido en los animales nulos y muy reducido en los nulos sometidos a inmovilización, pero no en los WT estresados ('genotipo x estrés': $F_{(1,20)} = 5.150$, $P < 0.05$; 'genotipo': $F_{(1,20)} = 46.759$, $P < 0.001$; 'estrés': $F_{(1,20)} = 16.307$, $P < 0.001$; LSD: nulo estresado vs nulo control, $P < 0.001$; WT control vs nulo control, $P < 0.05$) (Figura 44A,E). No resulta extraño que los datos de DCX concuerden con los de BrdU y PCNA, ya que el número total de neuronas jóvenes en la ZSG depende en gran medida de la proliferación (Joosen et al., 2009; Rao y Shetty, 2004).

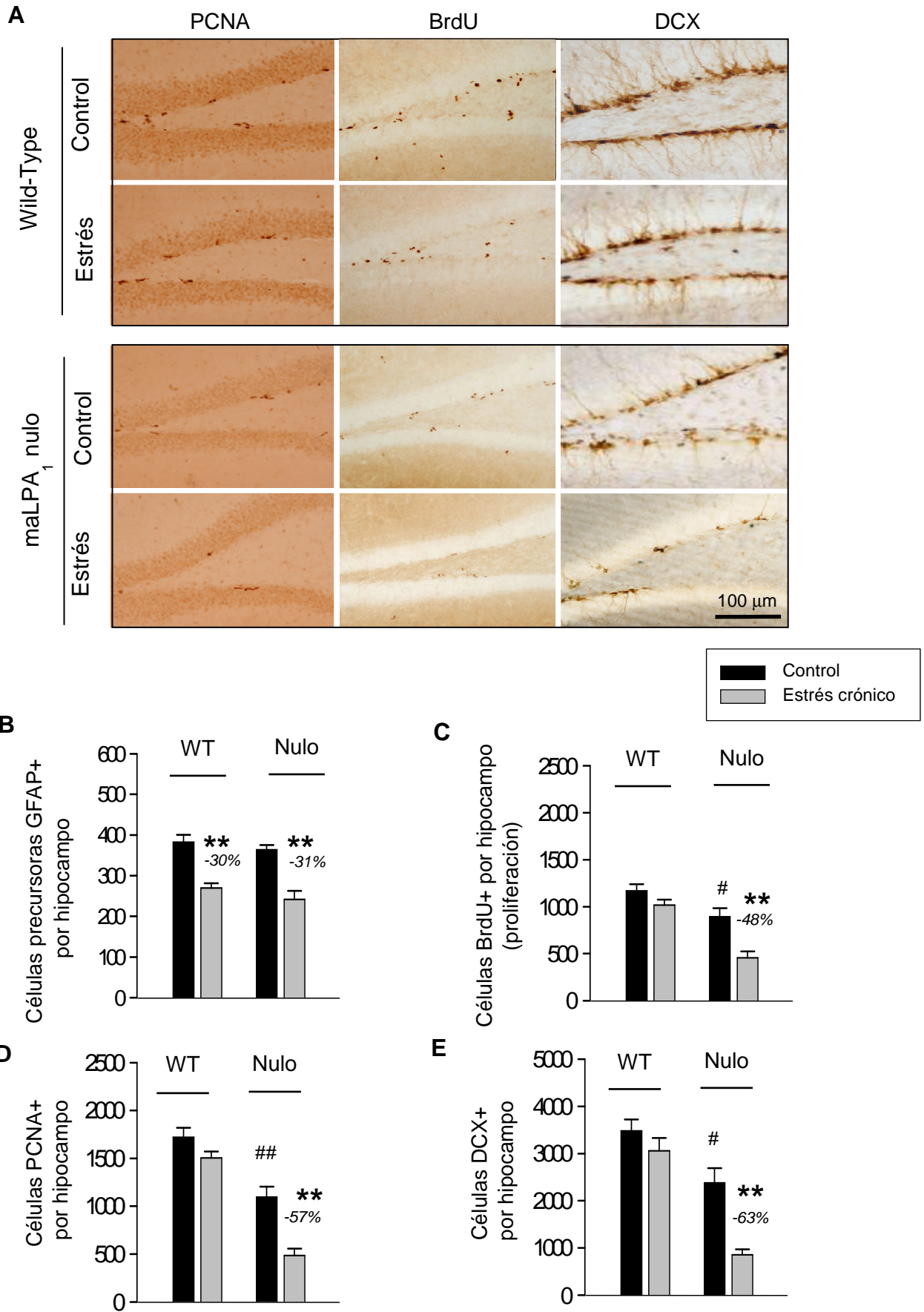


Figura 44. Precursores (B), proliferación celular (C, D) y neuronas jóvenes (E) en la ZSG. Medias \pm SEM. LSD: diferencia entre el grupo estresado y su control (** $P < 0.001$); diferencia entre los WT control y los nulos control (# $P < 0.05$; ## $P < 0.001$).

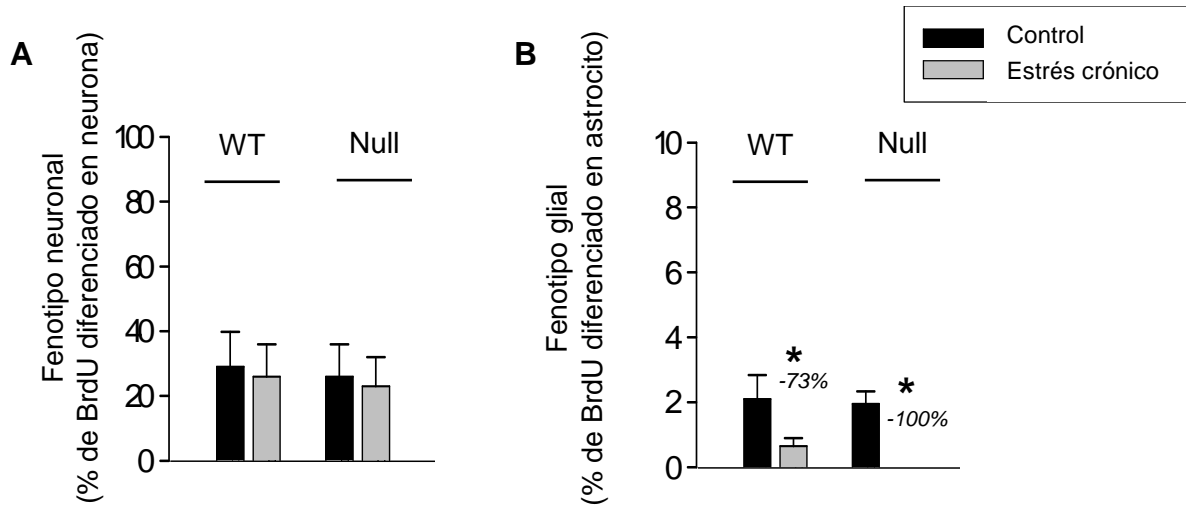


Figura 45. Elección del fenotipo neuronal (A) y glial (B). Medias \pm SEM. LSD: diferencia entre el grupo estresado y su control (* $P < 0.05$). El % de BrdU diferenciado en neurona (~30%, A) podría parecer escaso. Pero la BrdU se administró principalmente en el día antes de la perfusión, y en ese margen temporal es común hallar numerosas células aún indiferenciadas (Steiner et al., 2004).

Desarrollo de las nuevas neuronas: horizontalidad y árbol dendrítico

Es importante destacar que el LPA₁ no sólo intervino en el número total de nuevas neuronas DCX+ sino también en su grado de maduración, y moduló los efectos del estrés sobre este proceso. Así, los maLPA₁-nulos mostraron un mayor % de células DCX+ con orientación horizontal, y el déficit se agravó en este genotipo tras el estrés ('genotipo x estrés': $F_{(1,20)} = 4.431$, $P < 0.05$; 'genotipo': $F_{(1,20)} = 22.767$, $P < 0.001$; 'estrés': $F_{(1,20)} = 16.338$, $P < 0.001$; LSD: nulo estresado vs nulo control, $P < 0.001$; WT control vs nulo control, $P < 0.05$, Figura 46). Además, las células DCX+ con orientación vertical presentaron un árbol dendrítico menos arborizado en los maLPA₁-nulos sometidos a estrés crónico ('estrés x genotipo': $F_{(1,20)} = 18.804$, $P < 0.001$; 'genotipo': $F_{(1,20)} = 7.625$, $P < 0.05$; 'estrés': $F_{(1,20)} = 20.195$, $P < 0.001$; 'distancia desde el soma': $F_{(7,140)} = 56.734$, $P < 0.001$; 'distancia x genotipo': $F_{(7,140)} = 6.340$, $P < 0.001$; 'distancia x estrés': $F_{(7,140)} = 2.657$, $P < 0.05$; 'genotipo x distancia x estrés': $F_{(7,140)} = 3.717$, $P < 0.001$; LSD: nulo estresado vs los otros grupos, $P < 0.05 - 0.001$, Figura 47).

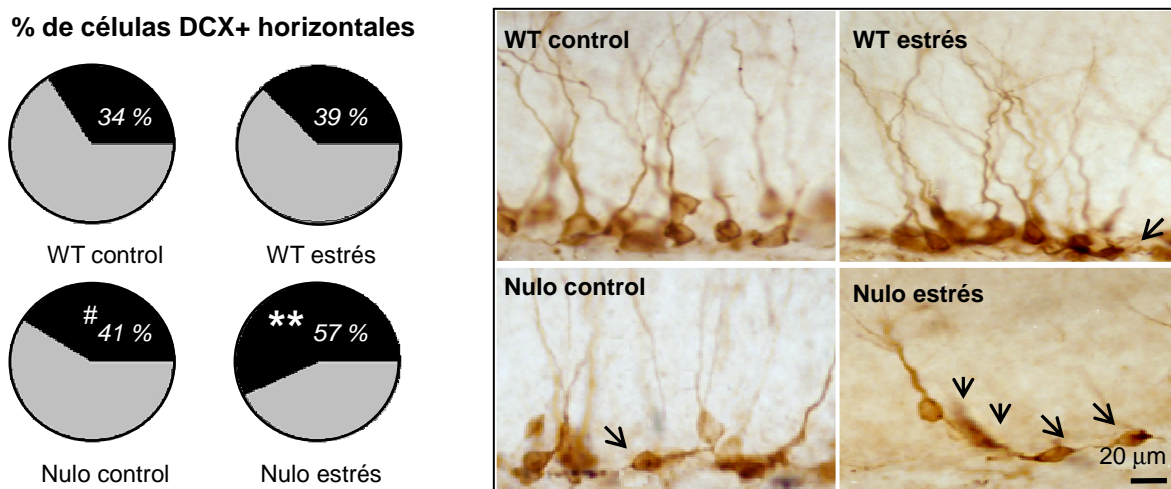


Figura 46. Porcentaje de horizontalidad en las neuronas jóvenes DCX+ (% en negro). LSD: diferencia entre el grupo estresado y su control (** $P < 0.001$); diferencia entre los WT control y los nulos control (# $P < 0.05$). Las flechas señalan células con morfología horizontal.

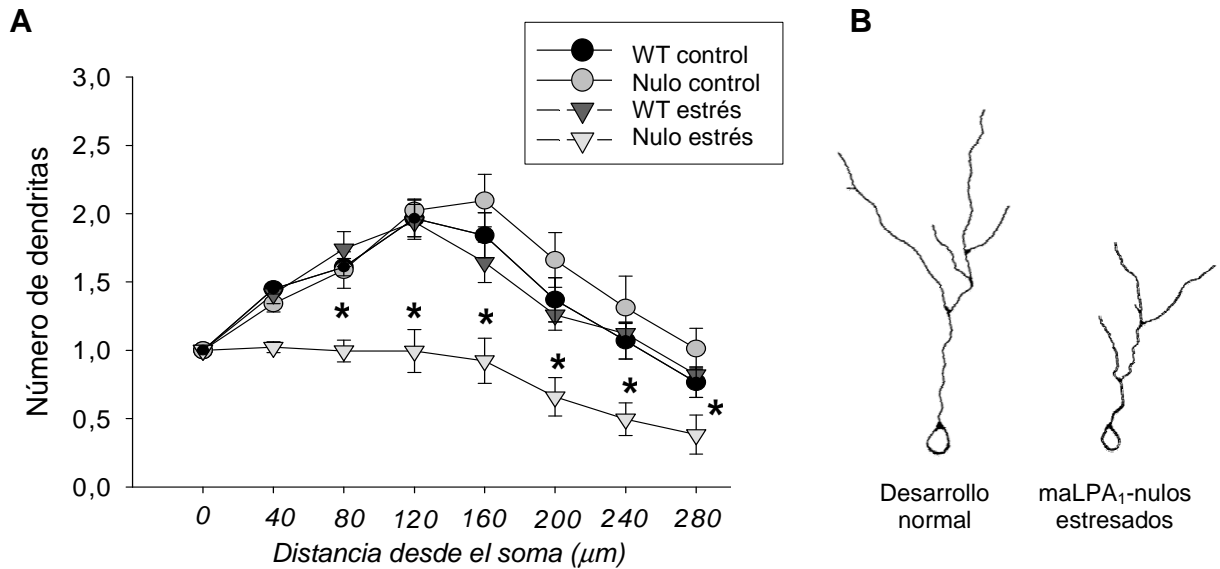


Figura 47. Desarrollo del árbol dendrítico de las neuronas jóvenes DCX+ con orientación vertical. Medias \pm SEM. (A) Se muestra el análisis de las dendritas y (B) una representación de una neurona con desarrollo normal (grupos de WT y de nulos control) y de una neurona en los malLPA₁ estresados. LSD: diferencia entre el grupo estresado y su control (* $P < 0.05$).

Supervivencia

La supervivencia a largo plazo de las nuevas células se evaluó 21 días después de administrar BrdU. Estas células se marcaron con BrdU antes del protocolo de estrés crónico (Figura 48A) y, por tanto, no reflejan el destino de las células estudiadas en la proliferación (marcadas con BrdU al final del estrés). Los animales *wild type* presentaron un mayor número de células BrdU+ ('genotipo': $F_{(1,23)} = 15.603$, $P < 0.001$). Sin embargo, cuando los datos se corrigieron empleando el % de células que sobreviven teniendo en cuenta la proliferación basal de cada grupo (Figura 48B), la diferencia en función del genotipo no fue significativa. El estrés crónico redujo la supervivencia en ambos genotipos ('estrés': $F_{(1,23)} = 14.339$, $P < 0.001$; LSD: grupos estresados vs su control, $P < 0.05$; Figura 48A, B).

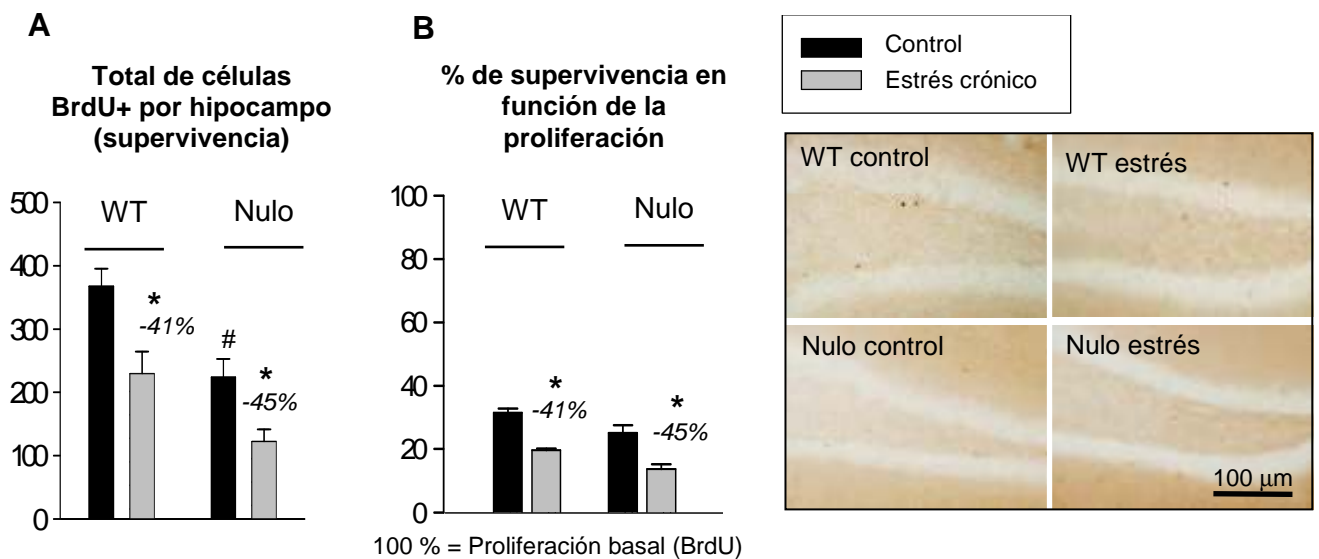


Figura 48. Supervivencia de las nuevas células tras 21 días. Medias \pm SEM. (A) Número total y (B) corrección en función de la proliferación. LSD: diferencia entre el grupo estresado y su control (* $P < 0.05$); diferencia entre los WT control y los nulos control (# $P < 0.05$).

Apoptosis

El estudio de la muerte celular se realizó por separado en cada uno de los estratos del hipocampo. El análisis de la capa granular (incluyendo la ZSG) del giro dentado mostró menos núcleos apoptóticos en los animales controles carentes del receptor LPA₁. Sin embargo, los mutantes estresados mostraron un gran incremento de apoptosis en esta zona, mientras que los *wild type* no la variaron de manera significativa tras el estrés ('estrés x genotipo': $F_{(1,15)} = 7.765$, $P < 0.05$; 'genotipo': $F_{(1,20)} = 9.241$, $P < 0.05$; LSD: *wild type* control vs nulos control, $P < 0.05$; nulos estresados vs nulos control, $P < 0.05$; Figura 49). Se observó que la mayoría de los núcleos apoptóticos cuantificados en la capa granular se situaron cerca de la ZSG (Figura 39B). Por otra parte, la apoptosis en las áreas no proliferativas del giro dentado (capa molecular e hilus) fue mucho más escasa y no reveló ningún efecto significativo en función del genotipo ni del estrés (Figura 49). La apoptosis en las distintas capas de las áreas CA1 y CA3 también fue muy escasa (media < 5 núcleos) y tampoco reveló ningún efecto, por lo que no se ha representado en las gráficas. La mayor localización de la apoptosis hipocampal en la zona neurogénica del hipocampo (capa granular/subgranular) sugiere que la apoptosis se relaciona con la muerte de las nuevas neuronas. La muerte celular es crucial en la regulación de la neurogénesis, ya que la mayoría de las nuevas células mueren durante las primeras tres-cuatro semanas de vida (Kempermann et al., 2003; Steiner et al., 2004). Por otra parte, a pesar de la elevada tasa de muerte que se supone, el número total de núcleos apoptóticos hallados en la ZSG fue escaso en comparación con los marcadores de neurogénesis. Esto podría explicarse porque la apoptosis es un proceso rápido que puede tener lugar en menos de 1 h (Majno y Joris, 1995) y por tanto su detección es menos frecuente.

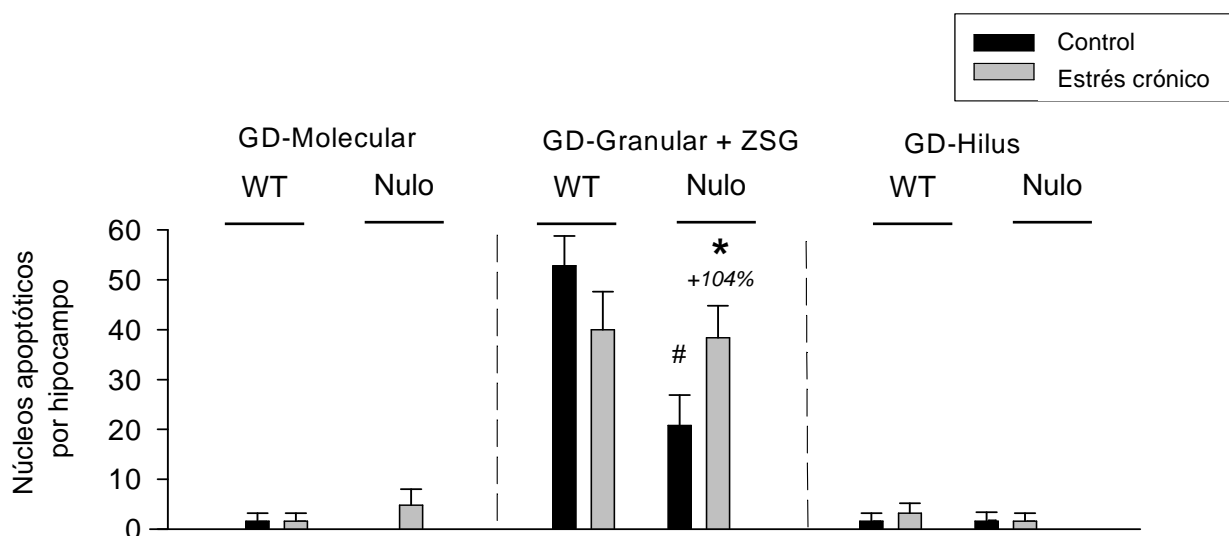


Figura 49. Apoptosis en la capa molecular, granular y polimórfica (hilus) del giro dentado (GD). Medias \pm SEM. Nótese la mayor apoptosis en la capa proliferativa (capa granular, que incluyó a la ZSG) en comparación con las otras capas del giro dentado. LSD: diferencia entre el grupo estresado y su control (* $P < 0.05$); diferencia entre los WT control y los nulos control (# $P < 0.05$).

Estructura anatómica del hipocampo: volumen y densidad celular

Por último, se estudió el efecto del estrés sobre la estructura del hipocampo, con secciones inmunoteñidas con el marcador de neurona madura NeuN. El análisis del volumen estimado por Cavalieri reveló que los maLPA₁-nulos presentan una reducción de las áreas CA1 y CA3, en todos sus estratos celulares (volumen total del hipocampo: 'genotipo': $F_{(1,27)} = 19.690$, $P < 0.001$; CA1 oriens: 'genotipo': $F_{(1,27)} = 15.223$, $P < 0.001$; CA1 piramidal: $F_{(1,27)} = 12.186$, $P < 0.05$; CA1 radiado: 'genotipo': $F_{(1,27)} = 21.853$, $P < 0.001$; CA3

oriens: 'genotipo': $F_{(1,27)} = 14.721$, $P < 0.001$; CA3: $F_{(1,27)} = 5.723$, $P < 0.05$; CA3 radiado: 'genotipo': $F_{(1,27)} = 43.908$, $P < 0.001$; el análisis post hoc se representa en la Tabla 8). Sin embargo, no presentaron alteraciones en el volumen del giro dentado, en ninguna de sus capas. El estrés crónico redujo el volumen de la capa piramidal de CA1 y CA3 en ambos genotipos, pero sólo afectó a la capa granular del giro dentado en el caso de los *maLPA₁-Nulos* (volumen total del hipocampo: 'estrés': $F_{(1,27)} = 4.027$, $P = 0.05$; CA1 piramidal: 'estrés': $F_{(1,27)} = 10.145$, $P < 0.05$; CA3 piramidal: 'estrés': $F_{(1,27)} = 6.617$, $P < 0.05$; giro dentado granular: 'estrés x genotipo': $F_{(1,27)} = 3.471$, $P < 0.05$; 'estrés': $F_{(1,27)} = 20.455$, $P < 0.001$; el análisis post hoc se representa en la Tabla 8). Los coeficientes de error de Cavalieri oscilaron entre 0.05 y 0.1 (media: 0.08), indicando una precisión aceptable de las estimaciones (Begega et al., 1998). Para completar el resultado obtenido, se estimó la densidad celular y el número total de células NeuN+ en la capa granular del giro dentado. Los mutantes estresados presentaron menos densidad y menos número total de neuronas adultas NeuN+ (Densidad: 'genotipo': $F_{(1,27)} = 4.495$, $P < 0.05$; 'estrés x genotipo': $F_{(1,27)} = 4.129$, $P < 0.05$; Número total: 'estrés': $F_{(1,27)} = 10.613$, $P < 0.05$; 'estrés x genotipo': $F_{(1,27)} = 4.615$, $P < 0.05$; el análisis post hoc se representa en la Tabla 8).

	<i>Wild Type</i>		<i>maLPA₁-Nulo</i>	
	Control	Estrés	Control	Estrés
Volumen de los estratos de las diferentes areas del hipocampo (mm ³)				
CA1				
<i>Oriens</i>	.138 ±5.046e-3	.132 ±4.161e-3	.116 ±5.091e-3 #	.115 ±5.251e-3
<i>Piramidal</i>	.065 ±4.560e-3	.057 ±4.010e-3 *	.056 ±4.847e-3 #	.037 ±2.310e-3 *
<i>Radiado</i>	.293 ±0.011	.279 ±0.010	.245 ±0.011 #	.230 ±7.553e-3
CA3				
<i>Oriens</i>	.098 ±6.631e-3	.099 ±4.228e-3	.084 ±2.926e-3 #	.077 ±4.083e-3
<i>Piramidal</i>	.068 ±5.654e-3	.057 ±3.516e-3 *	.058 ±3.484e-3 #	.046 ±3.585e-3 *
<i>Radiado</i>	.097 ±4.033e-3	.096 ±2.715e-3	.079 ±1.965e-3 #	.073 ±3.066e-3
DG				
<i>Molecular</i>	.172 ±9.028e-3	.167 ±7.372e-3	.162 ±5.858e-3	.160 ±7.168e-3
<i>Granular</i>	.063 ±3.614e-3	.057 ±2.204e-3	.064 ±2.815e-3	.046 ±1.538e-3 *
<i>Hilus</i>	.032 ±1.308e-3	.031 ±1.537e-3	.032 ±2.815e-3	.031 ±1.626e-3
Volumen total	1.026 ±0,815	.975 ±0,030	.896 ±0,028 #	.815 ±0,031
Densidad celular (NeuN+/µm ³) y número total de neuronas maduras NeuN+ en la capa granular del giro dentado				
<i>Densidad</i>	.370e-2 ± 217e-6	.386e-2 ± 258e-6	.377e-2 ± 221e-6	.309e-2 ± 115e-6 *
<i>Número total</i>	241e3 ±290e2	205e3 ±186e2	234e3 ±223e2	143e3 ±581e2 *

Tabla 8. Estructura del hipocampo inmunoteñido con NeuN. Medias ± SEM. Se muestra el volumen de cada una de las capas del hipocampo, el volumen total del hipocampo y la densidad y número total de neuronas NeuN+ en la capa granular del giro dentado. LSD: diferencia entre el grupo estresado y su control (* $P < 0.05$); diferencia entre los WT control y los nulos control (# $P < 0.05$).

3.b- Resultados: Niveles de corticosterona en suero

La corticosterona en suero se determinó en condiciones control o con un tratamiento de estrés agudo, de estrés crónico o de estrés crónico+agudo, en grupos independientes en cada genotipo. Los ANOVAs factoriales mostraron un efecto significativo del protocolo de estrés sobre la corticosterona ('tratamiento': $F_{(3,49)} = 126.29$, $P < 0.001$) y del genotipo en función del tratamiento empleado ('genotipo x tratamiento': $F_{(3,49)} = 9.770$, $P < 0.001$).

El estrés agudo produjo un incremento notable de los niveles de corticosterona en ambos genotipos (LSD: grupos de estrés agudo vs su control, $P < 0.001$), pero esta respuesta fue más elevada en los animales nulos (LSD: *wild type* vs nulos, $P < 0.001$). En situación de estrés crónico, la concentración de corticosterona en los *wild type* fue similar a sus niveles iniciales, mientras que los nulos presentaron hipocortisolismo comparándolos con sus niveles control y con los *wild type* estresados (LSD: $P < 0.05$). Cuando la inmovilización aguda se presentó tras inmovilización crónica, ambos genotipos respondieron con un incremento de los niveles de corticosterona (LSD: grupos de estrés crónico+agudo vs su control, WT: $P < 0.001$, nulo: $P < 0.05$). Sin embargo, esta respuesta se redujo en comparación con la inmovilización aguda en ausencia de estrés crónico (LSD: grupos de estrés agudo vs crónico+agudo; WT: $P < 0.05$, nulo: $P < 0.001$) y fue menor en los nulos que en los *wild type* (LSD: *wild type* vs nulos, $P < 0.05$) (Figura 50). Los análisis post hoc no revelaron diferencias entre genotipos en la condición control, pero sí en las condiciones de estrés agudo, de estrés crónico y de estrés de crónico+agudo (Figura 50).

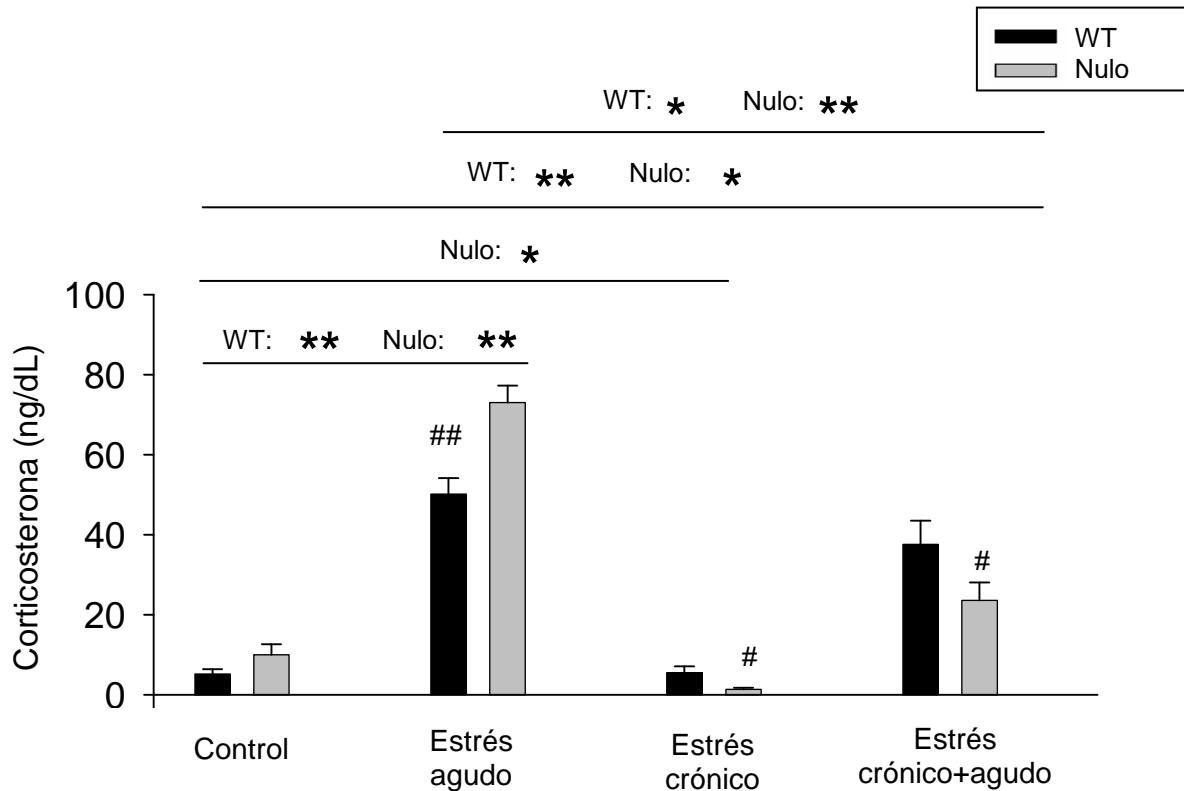


Figura 50. Niveles de corticosterona en suero. Medias \pm SEM. LSD: diferencia entre genotipos (# $P < 0.05$; ## $P < 0.001$); diferencia entre tratamientos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$).

3.c- Resultados: Análisis conductual en el laberinto de hoyos

Memoria espacial a largo plazo y de trabajo

Los análisis de la memoria espacial a largo plazo en los cuatro días de aprendizaje mostraron un déficit de memoria a largo plazo en los $maLPA_1$ -nulos ('genotipo': $F_{(1,39)} = 20.740$, $P < 0.001$; 'genotipo x día': $F_{(3,117)} = 5.568$, $P < 0.05$). El estrés deterioró la memoria a largo plazo en ambos genotipos, pero el efecto fue notablemente más dramático en el caso de los $maLPA_1$ -nulos sometidos a inmovilización ('genotipo x estrés': $F_{(1,39)} = 5.145$, $P < 0.05$, 'estrés': $F_{(1,39)} = 27.639$, $P < 0.001$, 'día': $F_{(3,117)} = 42.031$, $P < 0.001$, 'día x estrés': $F_{(3,117)} = 8.331$, $P < 0.001$; los análisis post hoc se muestran en la Figura 51). Mientras que los WT estresados demostraron un déficit principalmente en el último día de entrenamiento, los mutantes estresados rindieron peor que sus controles a lo largo de toda la tarea. De hecho, los análisis post hoc indican que este grupo fue el único que no mostró ninguna mejora significativa durante el aprendizaje (LSD > 0.05 al comparar el primer día con los siguientes).

En cuanto a la memoria espacial de trabajo, los análisis mostraron diferencias entre genotipos, pero el estrés no afectó a esta función cognitiva ('genotipo': $F_{(1,39)} = 9.493$, $P < 0.05$, 'día': $F_{(3,117)} = 5.083$, $P < 0.05$). Los animales carentes de LPA_1 , tanto los controles como los sometidos a inmovilización, mostraron un peor rendimiento en el primer día (LSD, $P < 0.05$) pero mejoraron a lo largo del entrenamiento (Figura 51).

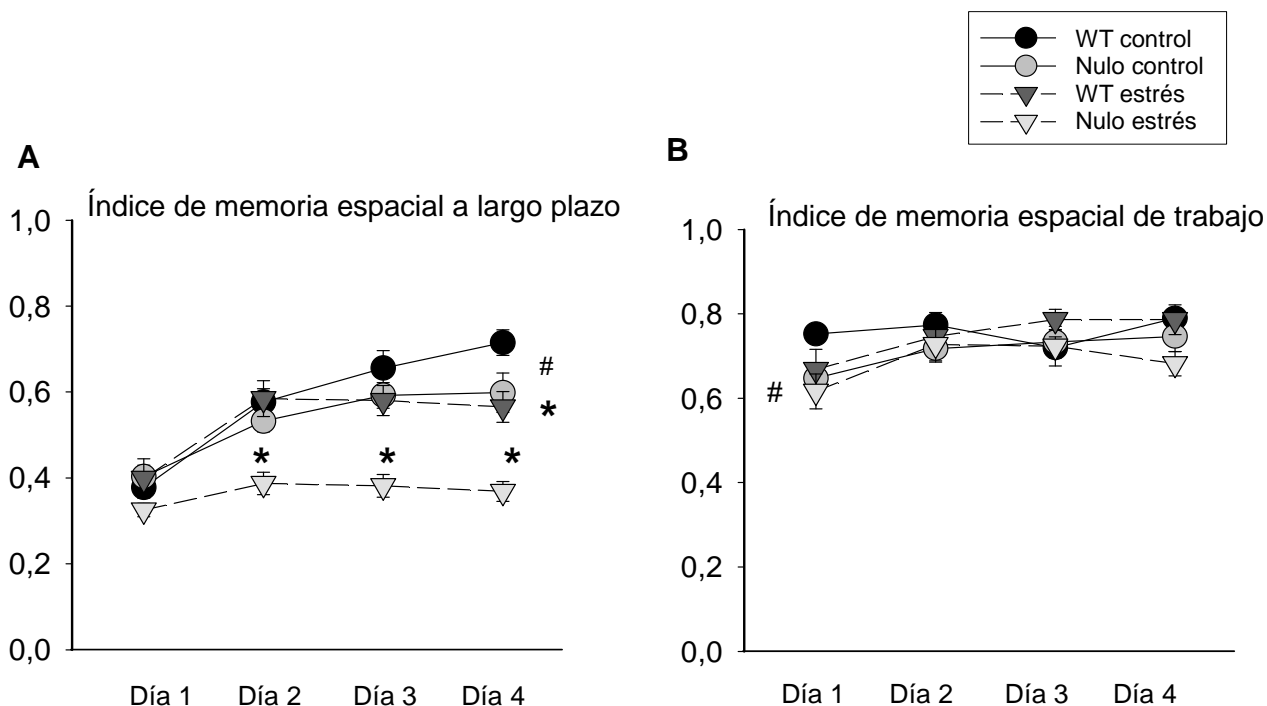


Figura 51. Efecto del estrés crónico sobre la memoria espacial a largo plazo (A) y de trabajo (B). Medias \pm SEM. (A) El estrés produjo un grave déficit de memoria a largo plazo en ausencia del receptor LPA_1 , pero no afectó a la memoria de trabajo (B). LSD: diferencia entre el grupo estresado y su control (* $P < 0.05$); diferencia entre los WT control y los nulos control (# $P < 0.05$).

Para estudiar la influencia del intervalo temporal entre ensayos sobre la memoria a largo plazo, el primer ensayo del día y el último se analizaron por separado ya que reflejan la

consolidación de la memoria a largo plazo y su adquisición, respectivamente. En ambos casos, se halló un efecto significativo del estrés crónico pero, sin embargo, la mayor afectación de los animales nulos (interacción 'genotipo x estrés') sólo fue significativa cuando se consideró el primer ensayo diario (primer ensayo: 'genotipo x estrés': $F_{(1,39)} = 10.441$, $P < 0.05$; 'genotipo': $F_{(1,39)} = 32.703$, $P < 0.001$; 'estrés': $F_{(1,39)} = 13.926$, $P < 0.001$; 'día': $F_{(3,117)} = 22.425$, $P < 0.001$; 'día x estrés': $F_{(3,117)} = 4.728$, $P < 0.05$; 'genotipo x día': $F_{(3,117)} = 3.428$, $P < 0.05$; último ensayo diario: 'genotipo': $F_{(1,39)} = 7.043$, $P < 0.05$; 'estrés': $F_{(1,39)} = 13.284$, $P < 0.05$; 'día': $F_{(3,117)} = 6.242$, $P = 0.001$; los análisis post hoc se muestran en la Figura 52). Por tanto, el llamativo déficit de memoria espacial a largo plazo en los maLPA₁-nulos estresados se debe que el estrés produce un deterioro mayor de la consolidación en este genotipo.

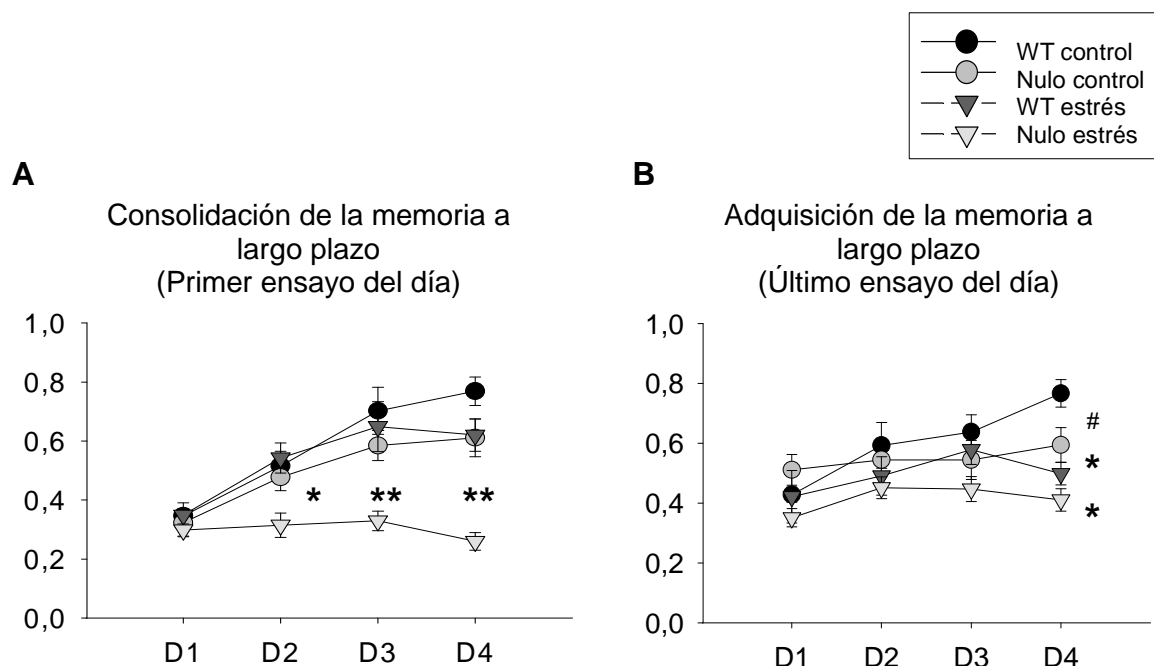


Figura 52. Índice de memoria espacial a largo plazo analizando únicamente el primer (A) y último (B) ensayo del día. Medias \pm SEM. El mayor efecto del estrés en el genotipo mutante se aprecia concretamente en los ensayos que evalúan la consolidación de la memoria (A). LSD: diferencia el grupo estresado y su control (* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$); diferencia entre los WT control y los nulos control (# $P < 0.05$).

El análisis de la memoria a largo plazo en función de las cuatro etapas que comprenden los ensayos se realizó en el último día de entrenamiento (día 4). Al igual que en el experimento anterior, los nulos sin estrés empeoraron con respecto a los WT en la tercera etapa (LSD, $P < 0.05$; genotipo x estrés': $F_{(1,39)} = 4.619$, $P < 0.05$; 'genotipo': $F_{(1,39)} = 23.333$, $P < 0.001$; 'estrés': $F_{(1,39)} = 28.952$, $P < 0.001$; 'etapa': $F_{(3,117)} = 2.959$, $P < 0.05$; 'etapa x genotipo': $F_{(3,117)} = 3.151$, $P < 0.05$). Sin embargo, el estrés afectó por igual a todas las etapas ('estrés x etapa', 'genotipo x estrés x etapa', $P > 0.05$). En el caso de los maLPA₁-nulos estresados, éstos empeoraron con respecto a sus controles en las cuatro etapas (LSD, $P < 0.05$), incluyendo en las iniciales que representan menor dificultad.

La memoria de trabajo también se analizó en función de los intervalos temporales entre ensayos y por etapas (analizadas en el día 1 de entrenamiento). Sin embargo, en ningún caso se halló que el estrés afectara a la memoria de trabajo (primer ensayo: 'genotipo': $F_{(1,39)} = 8.255$, $P < 0.05$; último ensayo: 'genotipo': $F_{(1,39)} = 10.233$, $P < 0.05$; análisis por etapas: 'genotipo': $F_{(1,39)} = 5.345$, $P < 0.05$; 'etapa': $F_{(3,117)} = 116.34$, $P < 0.001$; 'etapa x genotipo': $F_{(3,117)} = 2.765$, $P < 0.05$).

Exploración y ansiedad

La locomoción, la tigmotaxis y el *head dipping* se analizaron en la fase de habituación y en la de aprendizaje espacial. Los WT sometidos a estrés crónico presentaron hiperactividad, en tanto que aumentaron considerablemente la locomoción y la conducta de *head dipping*, principalmente durante la fase de aprendizaje espacial (Figura 53A, C). Por el contrario, los animales nulos mostraron una frecuencia reducida de *head dipping* a lo largo de la tarea, al igual que en el experimento anterior, pero no variaron esta conducta ni la locomoción a consecuencia del estrés (locomoción: 'genotipo x estrés': $F_{(1,39)} = 22.591$, $P < 0.001$; 'genotipo': $F_{(1,39)} = 11.792$, $P = 0.001$; 'estrés': $F_{(1,39)} = 9.694$, $P < 0.05$; 'día': $F_{(3,117)} = 15.592$, $P < 0.001$; 'día x estrés': $F_{(3,117)} = 13.217$, $P < 0.001$, 'genotipo' x día': $F_{(3,117)} = 4.366$, $P < 0.001$; 'genotipo' x día x estrés': $F_{(3,117)} = 4.768$, $P < 0.001$; *head dipping*: 'genotipo': $F_{(1,39)} = 104.26$, $P < 0.001$; 'día': $F_{(3,117)} = 15.747$, $P < 0.001$; 'día x estrés': $F_{(3,117)} = 4.917$, $P < 0.001$; 'genotipo' x día': $F_{(3,117)} = 10.136$, $P < 0.001$; 'genotipo' x día x estrés': $F_{(3,117)} = 8.204$, $P < 0.001$; los análisis post hoc se muestran en la Figura 53 A, C).

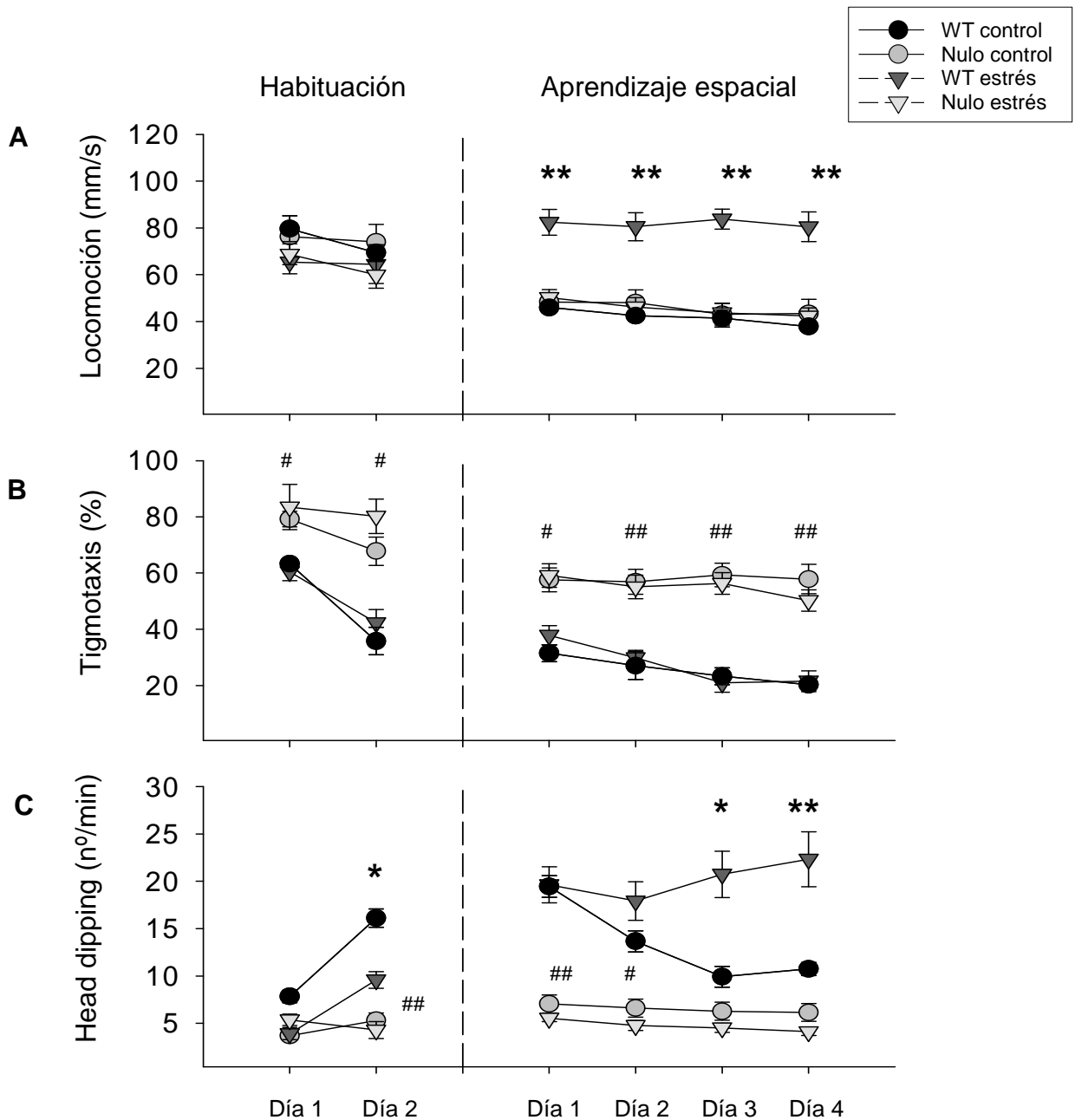


Figura 53. (página anterior). Locomoción (A), tigmotaxis (B) y head dipping (C) a lo largo de la tarea. Medias \pm SEM. Los mutantes presentaron alteraciones de la tigmotaxis y el head dipping, pero el estrés no tuvo ningún efecto en este genotipo. LSD: diferencia entre el grupo estresado y su control (* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$); diferencia entre los WT control y los nulos control (# $P < 0.05$; ## $P < 0.001$).

En cuanto a la tigmotaxis, los animales nulos presentaron una elevada preferencia por la periferia durante toda la prueba, pero el estrés crónico no modificó la tigmotaxis en ningún genotipo ('genotipo': $F_{(1,39)} = 148.460$, $P < 0.001$; 'día': $F_{(3,117)} = 47.776$, $P < 0.001$; 'genotipo' x día': $F_{(3,117)} = 3.464$, $P < 0.05$; los análisis post hoc se muestran en la Figura 53B). A diferencia del experimento anterior, los mutantes presentaron mayor ansiedad que los WT también en el contexto nuevo, pero su déficit más llamativo fue de nuevo la escasa habituación de esta conducta a lo largo de los seis días que dura la tarea.

Por otra parte, en el primer ensayo de habituación se analizó el cambio intra-ensayo de estas conductas. Es importante destacar que la habituación intra-ensayo de la tigmotaxis no estuvo alterada en el genotipo mutante, por lo que su déficit se debe a la existencia de un intervalo temporal entre ensayos (habituación intraensayo de la tigmotaxis: 'genotipo': $F_{(1,39)} = 19.213$, $P < 0.001$; 'momento del ensayo': $F_{(1,39)} = 30.818$, $P < 0.001$; Figura 54B). Tampoco se hallaron alteraciones en la habituación intraensayo de la locomoción y el head dipping en los mutantes (efecto significativo por 'momento del ensayo'; locomoción: $F_{(1,39)} = 27.844$, $P < 0.001$; head dipping: $F_{(1,39)} = 38.257$, $P < 0.001$; Figura 54A, C). El estrés no afectó a la habituación intraensayo de ninguna de las conductas evaluadas.

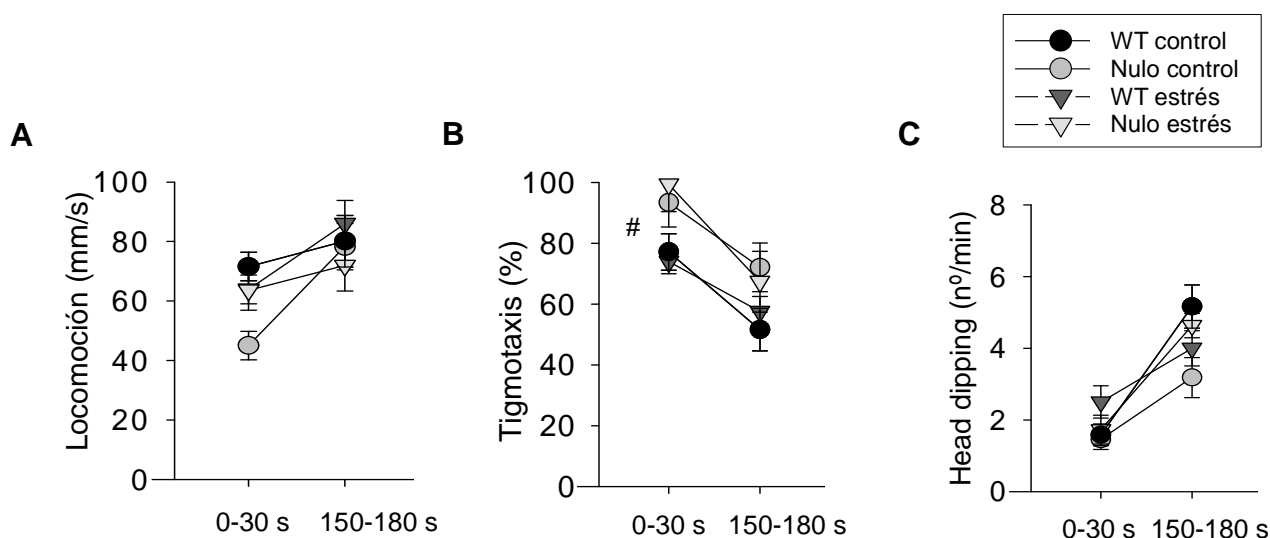


Figura 54. Cambio intra-ensayo de la locomoción (A), tigmotaxis (B) (primeros y últimos 30 segundos del primer ensayo de habituación). Medias \pm SEM. No se observaron alteraciones en la habituación intraensayo en función del genotipo ni a consecuencia del estrés. LSD: diferencia entre los WT control y los nulos control (# $P < 0.05$).

Relación entre las variables evaluadas

La relación entre las conductas de ansiedad, exploración, y los índices de memoria espacial a largo plazo y de trabajo se evaluó con correlaciones de Pearson. Es importante destacar que la tigmotaxis no correlacionó con ninguna otra variable en ningún grupo. Por tanto, la conducta de ansiedad no contaminó a las otras medidas y no explica los resultados hallados en el análisis de la memoria. Se hallaron correlaciones elevadas y positivas entre

la locomoción y el *head dipping* (WT control: 0.73; WT con estrés: 0.85; nulo control: 0.86; nulo con estrés: 0.80; $P < 0.05$). Esto sugiere, al igual que el experimento anterior, que ambas conductas comparten significado. Curiosamente, se hallaron algunas correlaciones negativas entre las medidas de memoria y de actividad (WT control: memoria a largo plazo-*head dipping* (-0.67), memoria de trabajo-locomoción (-0.59), memoria de trabajo-*head dipping* (-0.70); WT con estrés: memoria a largo plazo-*head dipping* (-0.70), memoria a largo plazo-locomoción (-0.90); nulos con estrés: memoria a largo plazo-locomoción (-0.66)). Este resultado puede tener varias interpretaciones. Podría suponerse que los animales más activos o impulsivos cometen más errores de memoria por ese motivo, pero también es posible que, a la inversa, los animales que tengan una peor memoria de la localización de los reforzadores optaran por explorar más rápidamente el laberinto para localizarlos pronto y compensar su déficit cognitivo. También es plausible que tanto el aumento de actividad como el deterioro de la memoria sean reflejo de otra alteración como, por ejemplo, daño hipocampal.

4.- Discusión

Papel del receptor LPA₁ en la modulación de la neurogénesis hipocampal en condiciones basales y de estrés crónico

La neurogénesis hipocampal adulta regula los procesos cognitivos y emocionales que dependen del hipocampo, y su alteración se asocia al inicio y agravamiento de numerosos trastornos psicopatológicos (Leuner, Gould y Shors, 2006; Pittenger y Duman, 2008). Por tanto, el estudio de nuevos mecanismos que pudieran regular la neurogénesis hipocampal resulta de gran interés.

Este trabajo demuestra que la neurogénesis hipocampal adulta requiere la participación del receptor LPA₁, pues su ausencia conlleva una reducción de la proliferación celular en la ZSG (células BrdU+, PCNA+ y DCX+). Este déficit de proliferación es genuino en tanto que no se hallaron alteraciones estructurales en el giro dentado (volumen, densidad y número de precursores primarios disponibles) que pudieran ofrecer una explicación alternativa a los resultados. Además de esto, los ratones maLPA₁-nulos presentan una vascularización normal del hipocampo (Matas-Rico et al., 2008). La ausencia de alteraciones en el neurodesarrollo del giro dentado de los mutantes sugiere que su déficit neurogénico sería consecuencia de la ausencia de LPA₁ en la edad adulta. Por otra parte, los resultados de esta Tesis Doctoral indican que el receptor LPA₁ no sólo es necesario para mantener la proliferación celular en la ZSG, sino también para una correcta diferenciación de las neuronas jóvenes (horizontalidad de las células DCX). Ambos datos coinciden con un estudio previo de nuestro grupo de investigación que caracterizó la neurogénesis hipocampal en los ratones maLPA₁-nulos (Matas-Rico et al., 2008). En este mismo trabajo (Matas-Rico et al., 2008) también se apuntaba la participación del LPA₁ en la elección del fenotipo y en la supervivencia a largo plazo de las nuevas células, aunque estos resultados no se confirman en el presente experimento. Es posible que la participación del LPA₁ en esos procesos sea menos consistente que su implicación en la proliferación y desarrollo de las nuevas neuronas, y que pudiera depender en mayor medida de las condiciones experimentales. En este sentido, el déficit de supervivencia celular que se había descrito en los maLPA₁-nulos no había sido evaluado en condiciones basales sino tras un tratamiento de enriquecimiento ambiental (Matas-Rico et al., 2008), lo cual podría explicar la diferencia con los presentes resultados.

La neurogénesis hipocampal adulta es un proceso dinámico que depende en gran medida de su microambiente y por tanto responde a numerosos factores internos y externos (Leuner y Gould, 2010; Palmer, Willhoite y Gage, 2000). El estrés crónico se ha revelado como uno de los más potentes inhibidores de la neurogénesis hipocampal, afectando a la proliferación, diferenciación y supervivencia (Heine et al., 2005; Joels et al., 2007; Lucassen et al., 2001; Oomen et al., 2009; Torner et al., 2009). Los ratones de genotipo *wild type* mostraron un déficit de supervivencia de las nuevas células en respuesta al estrés crónico pero, a pesar de observarse una tendencia, su reducción de la proliferación no fue significativa. Este resultado se contradice en apariencia con otros estudios previos, en los que el estrés de inmovilización produce una afectación tanto de la supervivencia como de la proliferación (p.ej. Pham et al., 2003). Sin embargo, esta discrepancia podría explicarse teniendo en cuenta que las consecuencias del estrés sobre la neurogénesis dependen en gran medida de numerosos factores que se relacionan con el protocolo experimental empleado. En concreto, el estrés de inmovilización en nuestro estudio es altamente predecible, ya que no se combina con otros estresores y se inicia cada día aproximadamente a la misma hora. La predictibilidad y la experiencia previa con el estresor facilita la adaptación del organismo al estrés, influyendo en el eje HHA (García et

al., 2000; Magariños y McEwen, 1995; Marin, Cruz y Planeta, 2007). Otro aspecto a considerar es que el tiempo diario de inmovilización, relacionado con la intensidad del estresor, fue relativamente bajo en comparación con otros estudios (p.ej., son frecuentes las 6 h diarias de inmovilización al día en lugar de 3 h; p.ej., Magariños y McEwen, 1995). Cuando la intensidad del estrés crónico es moderada, es más probable que se afecte la supervivencia sin alterar la proliferación (Lee et al., 2006). Además, se ha revelado que el estrés de inmovilización puede tener distintas consecuencias en función de la especie animal, y parece reducir la proliferación celular con más severidad en ratas que en ratones (Bain, Dwyer y Rusak, 2004), lo cual también explicaría la diferencia de nuestro resultado con el de otros trabajos. En este sentido, un estudio reciente que emplea un protocolo de estrés muy similar al nuestro (4 h diarias de inmovilización), coincide en hallar un déficit de supervivencia sin alteración de la proliferación en ratones no manipulados genéticamente (Torner et al., 2009).

Sin embargo, en el caso de los ratones carentes del receptor LPA₁, el estrés de inmovilización produjo una notable reducción de la proliferación hipocampal. Este dato resulta de gran importancia ya que indica que el LPA₁ no sólo regula la neurogénesis hipocampal en condiciones basales sino que también participa en contrarrestar las consecuencias del estrés crónico sobre este proceso. Se ha descrito que el estrés podría inhibir la proliferación celular impidiendo la entrada en ciclo de las células (transición G₀/G₁; Lu, 2009; Rhee et al., 1995) o bien podría arrestarlas en la fase G₁ (Heine et al., 2004a), lo cual supondría un retraso en alcanzar la fase S o una salida prematura del ciclo. Sería necesario hacer uso de marcadores de distintas etapas del ciclo celular para determinar qué momento del ciclo se encuentra afectado en los mutantes. Por el momento, los datos disponibles no parecen sugerir el arresto en la fase G₁. Las células que permanecen arrestadas en G₁ y también las células que acaban de salir del ciclo expresan PCNA (Kobayashi et al., 2006; Mandyam, Harburg y Eisch, 2007). De este modo, si los maLPA₁-nulos estresados presentaran un número significativo de células arrestadas en G₁ (que expresarían PCNA pero no habrían llegado a la fase S donde se incorpora la BrdU), sería de esperar que las células marcadas con PCNA se redujeran en menor medida que las células marcadas con BrdU en este grupo (Cayre et al., 2005), lo cual no se refleja en nuestros datos. En cualquier caso, sería necesario desarrollar más experimentos para establecer conclusiones más sólidas en este sentido.

Los maLPA₁-nulos también presentaron un menor número de neuronas jóvenes DCX+. Esta población se redujo notablemente cuando los mutantes se sometieron a inmovilización, pero esto no sucedió en el genotipo WT. La DCX se expresa en una amplia ventana temporal, desde poco después de la mitosis (células D1 con capacidad proliferativa) hasta que la neurona joven alcanza la madurez a las 3-4 semanas (Brown et al., 2003). El número de neuronas jóvenes DCX+ parece relacionarse más estrechamente con la proliferación celular que con la supervivencia a largo plazo (Joosen et al., 2009; Rao y Shetty, 2004), ya que la expresión de DCX es máxima en las nuevas células entre una y dos semanas y comienza a decrecer a medida que la neurona madura (Brown et al., 2003; Rao y Shetty, 2004). En concreto, se ha determinado que la mayoría de las células DCX+ que pueden observarse tienen entre uno y 12 días de edad (Brown et al., 2003; Rao y Shetty, 2004). En este estudio, la semejanza entre los datos de DCX y los de proliferación celular (BrdU y PCNA) también sugiere que el menor número de nuevas neuronas en los maLPA₁-nulos podría deberse a su déficit de proliferación. Además, no se halló ninguna alteración clara de la supervivencia en ausencia de LPA₁, ni en condiciones basales ni de estrés crónico, que pudiera explicar la mayor afectación de la DCX en este genotipo. La población de neuronas inmaduras DCX+ es relevante en sí misma ya que parece implicada en la función hipocampal (Dupret et al., 2007; Farioli-Vecchioli et al., 2008; Kee et al., 2007a; Snyder et al., 2005; Tashiro, Makino y Gage, 2007). En relación a esto no sólo debe tenerse en cuenta su número, ya que su grado de conectividad con los circuitos hipocampales previos también es crucial para la memoria espacial (Farioli-Vecchioli et al., 2008). Por este motivo, resulta importante que el LPA₁ también participe en el desarrollo de

estas neuronas (orientación vertical y arborización dendrítica) y en la modulación del efecto del estrés sobre este proceso, ya que el estrés crónico afectó al desarrollo de las neuronas jóvenes únicamente en el genotipo mutante.

La muerte celular por apoptosis es un factor crítico para regular la neurogénesis hipocampal y tiene consecuencias funcionales (Dupret et al., 2007). Se ha descrito que tanto el estrés como los glucocorticoides promueven la muerte celular en progenitores hipocampales y en neuronas jóvenes y adultas del hipocampo (Heine et al., 2004b; Joels et al., 2007; Yu et al., 2010). En concordancia, nuestros datos muestran que el estrés crónico redujo la población de células precursoras y también la supervivencia a largo plazo de las nuevas células (marcadas con BrdU antes del estrés), aunque este efecto fue similar en ambos genotipos y por tanto no estuvo mediado por el LPA₁. Por otra parte, es muy probable que la muerte de estas células no se encuentre reflejada en nuestros resultados de apoptosis. Esto es así porque la apoptosis se ha determinado al término del protocolo de estrés a los 21 días, mientras que las células evaluadas para la supervivencia probablemente hayan muerto con bastante anterioridad, en tanto que la muerte de las nuevas neuronas ocurre principalmente en una etapa inmadura (Dupret et al., 2007; Kempermann et al., 2003; Steiner et al., 2004; Thomas, Hotsenpiller y Peterson, 2007). Además, la apoptosis es un proceso de corta duración (Majno y Joris, 1995) y sólo se detectan las células cuya apoptosis es reciente. Por estos motivos, la apoptosis suele correlacionar con la proliferación en la ZSG (p.ej.. Belvindrah, Rougon y Chazal, 2002; Dupret et al., 2007; Egeland et al., 2010). Así, los tratamientos que aumentan la cantidad de proliferación celular conllevan un aumento de la apoptosis en las zonas proliferativas (Belvindrah, Rougon y Chazal, 2002; Dupret et al., 2007; Egeland et al., 2010), mientras que los tratamientos que reducen la proliferación, como el estrés, pueden cursar con una disminución de la apoptosis en la ZSG (Heine et al., 2004b).

En nuestro estudio, el número de núcleos apoptóticos en la ZSG estuvo en concordancia con la tasa de proliferación de cada grupo, salvo en el caso de los mutantes estresados que presentaron un incremento de apoptosis junto con una drástica reducción de la actividad proliferativa. La combinación de apoptosis elevada acompañada por una escasa proliferación se ha descrito en condiciones patológicas (Fester et al., 2006; Yu et al., 2010) y se ha asociado a una disminución de la neurogénesis (Yu et al., 2010). Por tanto, los datos sugieren que las células más recientes (aquellas en las que se han observado alteraciones en la proliferación y/o desarrollo) podrían morir con más frecuencia en los maLPA₁-nulos estresados. De este modo, aunque el LPA₁ no influyó en la supervivencia a largo plazo de las neuronas marcadas con BrdU anteriormente al estrés, sí podría participar en la supervivencia a corto/medio plazo de las nuevas células que proliferan tras 21 días de estrés crónico, indicando una adaptación disfuncional al estresor.

Sin embargo, se debe notar que los maLPA₁-nulos estresados han presentado un incremento de la apoptosis en proporción a su grado de proliferación, pero su apoptosis en números totales es similar a la de los WT sometidos a estrés. Este detalle es importante porque indica que la apoptosis de los mutantes estresados no sería suficientemente elevada como para explicar, por sí misma, la reducción de DCX y de células proliferativas en estos animales. Por tanto, el incremento de la apoptosis sería una alteración que se suma al déficit de proliferación de los maLPA₁-nulos estresados, pero no la causa de éste. Los estudios previos también han relacionado en LPA₁ con la apoptosis, señalando que la activación del receptor previene la muerte apoptótica e incrementa la supervivencia celular (Estivill-Torrus et al., 2008; Ye et al., 2002). Es posible que este papel sea especialmente notable en microambientes alterados, como ocurre a consecuencia del estrés crónico, la privación de suero (Weiner y Chun, 1999) o el enriquecimiento ambiental (Matas-Rico et al., 2008). Esto explicaría que no se hallara ningún incremento de la apoptosis en el hipocampo del grupo de maLPA₁-nulos en la condición control y sí en la condición de estrés.

El cuanto a la estructura anatómica del hipocampo, el estrés redujo el volumen de las capas piramidales de las áreas CA1 y CA3, en ambos genotipos. La reducción del volumen hipocampal es frecuente tras estrés crónico (Joels et al., 2007) y son muchos los factores que podrían causarla, como la muerte de las neuronas piramidales, alteraciones en los componentes dendríticos, cambios gliales o alteraciones en el espacio extraceular (Czeh y Lucassen, 2007). Sin embargo, el volumen de la capa granular del giro dentado sólo se halló reducida en los mutantes sometidos a inmovilización. Posiblemente, la dramática afectación de la proliferación y el incremento de apoptosis podrían explicar este resultado, aunque no se pueden descartar otros cambios como los que se han comentado anteriormente. En cualquier caso, el estrés únicamente ha afectado con más severidad a la capa granular en ausencia de LPA₁, lo que indica que el papel del receptor como modulador del impacto del estrés sobre el hipocampo podría estar ligado específicamente a la neurogénesis. Además, la reducción de volumen se acompañó de una disminución de la densidad neuronal de la zona granular en los maLPA₁-nulos. Podría deberse al hecho de que un menor número de nuevas células en la ZSG hayan madurado en neuronas adultas aunque, de nuevo, tampoco se pueden descartar otros factores como la muerte de las neuronas granulares que formaban esta capa (Czeh y Lucassen, 2007).

En definitiva, los datos de este estudio demuestran que el LPA₁ promueve la neurogénesis hipocampal en condiciones basales y de estrés crónico, de forma que su eliminación conlleva una afectación de la proliferación y diferenciación de las nuevas neuronas que se agrava considerablemente en situaciones de estrés. Existen numerosas evidencias in vivo y in vitro sobre el papel del LPA₁ como promotor de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia (Choi et al., 2009; Chun, 2005; Estivill-Torrus et al., 2008; Matas-Rico et al., 2008; Ye et al., 2002), pero aún se desconoce cuál es el mecanismo mediante el cual el LPA₁ modula la neurogénesis y la respuesta neurogénica al estrés. Además, hay que considerar que la regulación de cada uno de los procesos que intervienen en la neurogénesis (proliferación, diferenciación y muerte) podría ser independiente (p.ej. Plumpe et al., 2006; Thomas, Hotsenpiller y Peterson, 2007). El LPA₁ se expresa en progenitores hipocampales en cultivo y en neuronas hipocampales in vivo (Fujiwara et al., 2003; Pilpel y Segal, 2006; Rhee et al., 2006), así que el LPA podría proteger a estas células del estrés mediante la activación directa del receptor LPA₁ (para una revisión ver Choi et al., 2010). También podrían estar implicados mecanismos indirectos, como la activación del receptor LPA₁ en células gliales, que conlleva la liberación de factores neurotróficos (Spohr et al., 2008). Por otra parte, la muerte celular y el acortamiento de las ramificaciones dendríticas puede suceder como respuesta adaptativa al incremento del input glutamatérgico por la acción de los glucocorticoides (Conrad, 2008). Hasta la fecha, dos estudios han caracterizado los niveles de glutamato en ratones carentes de LPA₁. Uno de ellos describe un aumento de los niveles basales de glutamato pero una liberación reducida de este neurotransmisor en el hipocampo en respuesta a la estimulación en ausencia de LPA₁ (Roberts et al., 2005); mientras que el segundo halla niveles normales de glutamato en el hipocampo de los mutantes pero una disminución de la glutamina (Harrison et al., 2003). Por tanto no se puede descartar que el LPA₁ medie la respuesta del sistema glutamatérgico en situaciones de estrés. Finalmente, una regulación alterada del eje HHA y de los niveles de hormonas glucocorticoides en ausencia de LPA₁ es otro de los factores que podrían explicar el resultado descrito en la neurogénesis, como se comentará a continuación.

Papel del receptor LPA₁ en la respuesta del eje HHA al estrés

En conjunto, los resultados hallados en el genotipo *wild type* reflejan una respuesta hormonal normal ante estrés. En primer lugar, los datos confirman que la inmovilización es un estresor eficaz en tanto que produce un incremento considerable de los niveles de corticosterona ante la exposición aguda. Por otra parte, los *wild type* presentaron niveles basales de corticosterona tras estrés crónico que fueron similares a sus niveles previos al

estrés. Esto es así porque la experiencia previa con el estresor (es decir, la exposición repetida) atenúa la liberación de glucocorticoides en respuesta a éste (García et al., 2000; Magariños y McEwen, 1995; Marin, Cruz y Planeta, 2007). Por tanto, cuando los roedores finalizan un tratamiento de estrés crónico es habitual encontrar niveles normales de glucocorticoides como resultado de la adaptación hormonal al estresor (García et al., 2000; Kant et al., 1987; Magariños y McEwen, 1995; Marin, Cruz y Planeta, 2007). Como reflejo de esta adaptación, la respuesta a la inmovilización aguda fue significativamente menor cuando los animales se habían sometido previamente a inmovilización crónica. En este sentido, hay que considerar que el estresor agudo aplicado, la inmovilización, era un estresor ya conocido. Si en su lugar se hubiera presentado un estresor nuevo, hubiera sido probable que estrés crónico incrementara la respuesta hormonal al estrés agudo (Aguilera, 1994; Marin, Cruz y Planeta, 2007).

La adaptación hormonal al estresor parece depender en gran medida de las características del protocolo de estrés crónico. El retorno a los niveles iniciales de glucocorticoides es frecuente cuando se emplea un único estresor pero no tanto cuando se alternan distintos estresores (estrés variable), en cuyo caso es más frecuente la hipercortisolemia (revisado en Marin, Cruz y Planeta, 2007). El tipo de estresor también es relevante. Los estresores psicológicos, como la inmovilización repetida, tienen más probabilidad de provocar una habituación de la respuesta hormonal que los estresores sistémicos, como la privación de agua (Aguilera, 1994). Los mecanismos que subyacen a la adaptación hormonal al estrés no son conocidos. Éstos parecen implicar la acción de múltiples hormonas neuroendocrinas y del feedback negativo de los glucocorticoides en la hipófisis, el hipotálamo y en áreas reguladoras del eje (p.ej., Zalutskaya et al., 2007). En el caso de la reducción de la respuesta hormonal a un estresor, estas estructuras podrían presentar un incremento del número de receptores para glucocorticoides o de su funcionalidad, que potenciarían la inhibición del eje (Pace y Spencer, 2005). Al contrario, la hipercortisolemia basal tras estrés crónico, no hallada en este estudio, se podría producir por una desensibilización al feedback negativo de los glucocorticoides (Mizoguchi et al., 2001); aunque también se ha sugerido que el animal se encontraría en un estado de estrés permanente debido a la imposibilidad de predecir la aparición del estresor cuando éste es variable (Marin, Cruz y Planeta, 2007). Además, se debe considerar que el estrés crónico produce grandes cambios en la estructura y funcionalidad de las áreas encargadas del control central del eje HHA. Junto con la atrofia del hipocampo (comentada en el capítulo 3 de la introducción), el estrés crónico retrae las dendritas de la corteza prefrontal medial y la amígdala se vuelve hipertrófica aumentando la arborización dendrítica y la densidad de espinas (revisado en Wolf, 2008), lo cual podría repercutir en la regulación hormonal.

Por otra parte, los resultados mostraron una respuesta anómala del eje HHA en los maLPA₁-nulos. En primer lugar, el incremento de corticosterona tras inmovilización aguda fue mayor en los mutantes que en los *wild type*, sin hallarse diferencias en los niveles basales de ambos genotipos. Aunque no se puede descartar la implicación de otras áreas, la disfunción hipocampal en ausencia del LPA₁ podría explicar la hiper-reatividad al estrés. El hipocampo no parece participar en el mantenimiento de los niveles basales de glucocorticoides pero sí en la inhibición la respuesta del eje HHA ante un estresor (Herman et al., 2005; Herman et al., 1989), en la cual intervienen los receptores GR hipocampales (revisado en Herman et al., 2005; Schloesser, Manji y Martinowich, 2009). De hecho, la inhibición que ejerce el hipocampo es clave para la acción del feedback negativo de los glucocorticoides, ya que la lesión del hipocampo dorsal impide la supresión por dexametasona (Feldman y Conforti, 1980). El control hipocampal del eje HHA podría ser anómalo en los maLPA₁-nulos, teniendo en cuenta que presentan otras alteraciones de la función hipocampal (p.ej. en la memoria espacial a largo plazo) y de la estructura de las áreas CA1 y CA3 (menor volumen). Por otra parte, el déficit de neurogénesis hipocampal en ausencia de LPA₁ también podría afectar a la regulación neuroendocrina. La eliminación de las nuevas neuronas del giro dentado no afecta a la corticosterona basal, pero produce hipercortisolemia ante un estresor (Schloesser, Manji y Martinowich, 2009). Curiosamente,

en ese estudio no hallaron cambios en la expresión de los receptores GR hipocampales, lo cual sugiere que la incorporación de nuevas neuronas, en sí misma, podría modular el output que el área CA1 envía al hipotálamo (Schloesser, Manji y Martinowich, 2009).

Tras una elevada reactividad ante un estresor, podría esperarse que la exposición repetida a éste exacerbara el daño en el hipocampo, deteriorando aún más su control inhibitorio y dando lugar a una hipercortisolemia basal (Brown, Rush y McEwen, 1999). Sin embargo, los maLPA₁-nulos en situación de estrés crónico presentaron hipocortisolismo basal y mayor reducción de la respuesta hormonal a la inmovilización aguda. Mientras que la hipercortisolemia se encuentra en trastornos como la depresión mayor o el trastorno bipolar, el hipocortisolismo se ha asociado a la depresión atípica (caracterizada por un incremento de la ansiedad al rechazo social), al trastorno de estrés postraumático, la fibromialgia y a síndromes de fatiga y dolor crónico, entre otros (Brown, Rush y McEwen, 1999; Tops et al., 2008). Por este motivo, se ha sugerido que un factor clave para diferenciar los síndromes hipercortisolémicos de los relacionados con el hipocortisolismo sería una mayor ansiedad o sensibilidad al estrés (Brown, Rush y McEwen, 1999; Tops et al., 2008). Así, cuando existe una actividad anormalmente elevada del eje que se mantiene en un período prolongado (en el que los elevados niveles de glucocorticoides superarían un determinado umbral), el hipocortisolismo se generaría como un mecanismo adaptativo para evitar los efectos negativos de la hipercortisolemia crónica (Fries et al., 2005; Tops et al., 2008). Esta hipótesis de hiper-reactividad al estrés encajaría con lo observado en los animales maLPA₁-nulos, puesto que presentaron un incremento inicial de la sensibilidad a la inmovilización (tratamiento de estrés agudo). El hipocortisolismo se ha replicado experimentalmente en otros modelos animales de estrés crónico, como el de abstinencia a la morfina. Estos animales presentan una hiper-actividad inicial del eje que posteriormente da lugar a niveles reducidos de corticosterona por un incremento del feedback negativo de los glucocorticoides a nivel de la hipófisis (Fries et al., 2005; Houshyar et al., 2001). Existen múltiples mecanismos que podrían provocar el hipocortisolismo. Por ejemplo, una reducción la biosíntesis o liberación de alguno de los factores liberadores u hormonas del eje HHA (CRH, AVP, ACTH o corticosterona/cortisol), hipersecreción de alguno de estos componentes con la consiguiente regulación a la baja o desensibilización de sus receptores o incremento de la acción inhibitoria de los glucocorticoides, entre otros (Fries et al., 2005).

En resumen, los datos sugieren que la ausencia de LPA₁ produciría un incremento de la sensibilidad al estrés, quizás a causa de la disfunción hipocampal en los maLPA₁-nulos. Tras estrés crónico, esta respuesta elevada de estrés se mantendría en el tiempo y podría producir el hipocortisolismo que presentan los mutantes en lugar de una adaptación normal al estresor. Por otra parte, es relevante determinar en qué medida esta alteración del eje HHA en los maLPA₁-nulos sometidos a estrés crónico puede explicar el daño hallado en la neurogénesis.

Los glucocorticoides son potentes inhibidores de la neurogénesis hipocampal. Los cambios en los niveles de glucocorticoides a lo largo del ciclo vital mantienen una correlación negativa con cambios en la neurogénesis (Montaron et al., 2006; Gould y Tanapat, 1999). La administración de glucocorticoides reduce la proliferación celular en el giro dentado, mientras que la adrenalectomía estimula este proceso (Cameron y Gould, 1994; Gould y Tanapat, 1999; Wong y Herbert, 2006). Estudios más recientes muestran que los glucocorticoides regulan negativamente la supervivencia de las nuevas células hipocampales en condiciones basales, y niveles elevados de corticosterona reducen la supervivencia y también la diferenciación (Wong y Herbert, 2004; Wong y Herbert, 2006). En el caso de la supervivencia, la vulnerabilidad a los glucocorticoides depende de la edad de la nueva neurona, de manera que afectan específicamente a aquéllas de hasta dos-tres semanas (Wong y Herbert, 2004). En cualquier caso, la nueva neurona que ha madurado, a partir de las tres semanas, aún sería sensible a los efectos de los glucocorticoides sobre su diferenciación, lo que indica que los glucocorticoides modularían diferentes etapas de la neurogénesis a través de mecanismos distintos (Wong y Herbert, 2006). La expresión de

los receptores GR y MR es muy baja en las células en división, pero se incrementa progresivamente conforme éstas maduran (Cameron, Woolley y Gould, 1993; García et al., 2004). Por este motivo, los efectos de los glucocorticoides en células postmitóticas pueden ser directos, mientras que sus efectos sobre las células en un período anterior a la mitosis o en los primeros estadios de maduración se deberían principalmente a cambios en el microambiente (Wong y Herbert, 2006). En este sentido, los factores de crecimiento, como el BDNF o el IGF-1, se reducen por la acción de los glucocorticoides y podrían mediar sus efectos indirectos (Schaaf, De Kloet y Vreugdenhil, 2000; Wong y Herbert, 2006). En el caso de la proliferación, los glucocorticoides también podrían inhibirla a través de la estimulación de los receptores de glutamato NMDA (Gould y Tanapat, 1999).

Además de lo anteriormente mencionado, se ha demostrado que los antagonistas de los glucocorticoides (Oomen et al., 2007) o la adrenalectomía (Tanapat et al., 2001) impiden las consecuencias del estrés crónico sobre la neurogénesis. Esto indica que la acción de la corticosterona podría explicar, al menos parcialmente, el efecto del estrés crónico sobre la neurogénesis hipocampal hallado en este estudio. Sin embargo, hay que considerar que al final del protocolo de estrés crónico los niveles basales de corticosterona eran similares a los iniciales (WT) o más bajos (nulos), y la respuesta aguda al estresor estaba atenuada. Los niveles de corticosterona circulante son relevantes. Éstos correlacionan con los cambios en la neurogénesis (revisado en Gould y Tanapat, 1999) y, además, la neurogénesis no se reduce por administración crónica de corticosterona si las dosis no son suficientemente elevadas (Brummelte y Galea, 2010; Murray, Smith y Hutson, 2008; Pravosudov y Omanska, 2005). Por tanto, la adaptación en la respuesta hormonal de los *wild type* al final del estrés crónico podría explicar la ausencia de afectación de los procesos que se evalúan al término del protocolo (apoptosis, proliferación). Al contrario, la elevada respuesta hormonal al principio del estrés crónico podría ser responsable del daño en los procesos que son más susceptibles de afectarse al inicio del tratamiento (p.ej., muerte de las células evaluadas para la supervivencia a largo plazo, volumen hipocampal). En el caso de los mutantes sometidos a estrés crónico, es poco probable que su déficit final en la proliferación y apoptosis se deba a la acción de la corticosterona, ya que sus niveles están reducidos al término del estrés. Sin embargo, no puede descartarse que su hiperreactividad inicial haya producido algún cambio estructural a largo plazo que pudiera producir una alteración duradera de la neurogénesis (Murray, Smith y Hutson, 2008).

Papel del receptor LPA₁ en las consecuencias del estrés crónico sobre la memoria espacial

El estrés crónico es un factor de riesgo en el inicio y agravamiento de la psicopatología emocional y cognitiva que depende del hipocampo (Gregus et al., 2005; Pittenger y Duman, 2008; Shekhar et al., 2005). En nuestro trabajo hemos evaluado la capacidad cognitiva de los diferentes grupos experimentales en el laberinto de hoyos, para investigar si las llamativas alteraciones neurogénicas observadas en los maLPA₁-nulos sometidos a inmovilización tienen consecuencias funcionales sobre su conducta. Se evaluó la memoria espacial a largo plazo, al ser ésta una función estrechamente relacionada con el hipocampo y la neurogénesis (Leuner, Gould y Shors, 2006). Al igual que en el experimento anterior, los ratones carentes de LPA₁ presentaron déficit de memoria a largo plazo en el último día de la tarea, y los *wild type* estresados también mostraron un ligero déficit en esta memoria en el último día. Sin embargo, la alteración de la memoria a largo plazo fue crítica en el caso de los mutantes estresados, ya que fueron prácticamente incapaces de mejorar su rendimiento a lo largo de la tarea. En concreto, el déficit fue especialmente llamativo en la consolidación de esta memoria (intervalo de 24 h), en comparación con su adquisición a corto plazo.

Muy posiblemente, estos resultados podrían explicarse por las alteraciones neurogénicas que hemos descrito a consecuencia del estrés crónico. Como se ha

comentado previamente, los ratones mutantes presentaron una reducción de la proliferación celular que provocó una reducción del número de neuronas jóvenes DCX+, que además mostraron alteraciones en su desarrollo y conectividad. La edad concreta en la que las nuevas neuronas comienzan a ser funcionales no se ha determinado aún con exactitud, pero son muchos los trabajos que sugieren que las neuronas jóvenes DCX+ son necesarias para la memoria espacial a largo plazo (Dupret et al., 2007; Farioli-Vecchioli et al., 2008; Kee et al., 2007a; Snyder et al., 2005). En este sentido, la mayor afectación de la consolidación no resulta inesperada, ya que la neurogénesis podría ser más necesaria en las tareas que requieren una mayor participación del hipocampo (Dupret et al., 2008; Jessberger et al., 2009; Winocur et al., 2006), como ocurre al almacenar información durante intervalos temporales largos. Además del déficit de proliferación y diferenciación en los *maLPA₁*-nulos, el estrés produjo otras alteraciones como la afectación de la capa celular de las áreas CA1 y CA3 y la menor supervivencia de las células con 21 días de edad. Estas alteraciones también podrían provocar déficit espaciales (Dupret et al., 2008) pero, a diferencia de las anteriores, ocurrieron con la misma intensidad en ambos genotipos y, por tanto, no parecen suficientes para explicar que el déficit de memoria sea mucho mayor en los mutantes estresados en comparación con los *wild type*.

En cuanto a la memoria de trabajo espacial, en ésta podemos distinguir un componente de capacidad de almacenamiento a corto plazo y un componente a largo plazo (el aprendizaje de las reglas de la tarea) (Yoon et al., 2008). Los animales carentes de LPA₁, tanto en la condición control como de estrés crónico, presentaron peor memoria de trabajo únicamente en el primer día de entrenamiento. Como se comentó en el experimento anterior, esto indica una adquisición más lenta de las reglas necesarias para realizar la tarea. Estas reglas representan un componente de memoria a largo plazo que depende del hipocampo (Joel et al., 1997; Yoon et al., 2008), pero se trataría de un componente no espacial que, además, no parece requerir la neurogénesis (Hernández-Rabaza et al., 2009; Winocur et al., 2006). Seguramente representa un aprendizaje más simple que la navegación espacial y, quizás por este motivo, el déficit inicial de los mutantes en esta función no se agravó a consecuencia del estrés.

El estrés tampoco alteró el componente a corto plazo de la memoria de trabajo (la memoria de trabajo espacial propiamente dicha) en ningún genotipo, pues todos los grupos rindieron por igual en los últimos días. Este resultado es llamativo, ya que la memoria de trabajo espacial, aunque depende en gran medida de la corteza prefrontal, también requiere el hipocampo (Yoon et al., 2008) y es sensible a los efectos del estrés crónico (Cerqueira et al., 2007). Sin embargo, aunque está comprobada la dependencia hipocampal, la relación de la memoria de trabajo espacial con la neurogénesis es ambigua. Las investigaciones al respecto son relativamente escasas, pero el entrenamiento en memoria de trabajo espacial reduce la neurogénesis en el hipocampo (Mohapel et al., 2006) y, a diferencia de lo que sucede con la memoria a largo plazo, la eliminación de la neurogénesis no deteriora la memoria de trabajo espacial (Hernández-Rabaza et al., 2009). Incluso, se ha llegado a proponer que la ausencia de neurogénesis favorecería la memoria de trabajo espacial en ciertas tareas con elevada interferencia (Saxe et al., 2007). Por tanto, la memoria de trabajo no tendría por qué verse afectada aunque exista un daño notable en la neurogénesis. Sin embargo, nuestros datos sugieren que las alteraciones hipocampales inducidas por estrés no se limitaron a la neurogénesis, pues se halló una reducción del volumen de la capa piramidal en CA1 y CA3 en ambos genotipos tras estrés crónico. Según nuestros resultados, hay que asumir que esta alteración tampoco tendría una implicación funcional sobre la memoria de trabajo. En relación a esto hay que considerar la dependencia de la memoria de trabajo espacial de la corteza prefrontal (no evaluada en este estudio), y que esta estructura puede soportar parcialmente la memoria de trabajo cuando el hipocampo se daña (Lee y Kesner, 2003). Aunque el estrés también puede dañar la corteza prefrontal, esta afectación es compleja en tanto que puede limitarse únicamente a algunas de las conexiones de la corteza (Shansky et al., 2009). Quizás por estos motivos, una reciente revisión concluye que los efectos del estrés crónico sobre la memoria espacial de trabajo

son menos severos y menos consistentes que los efectos del estrés sobre la memoria espacial a largo plazo (Conrad, 2010).

Por otra parte, también se evaluaron las conductas de exploración y ansiedad. Los *wild type* sometidos a inmovilización incrementaron su actividad (locomoción, *head dipping*), pero el estrés no se afectó la conducta de ansiedad (tigmotaxis). El aumento de la actividad de los roedores en situaciones de estrés crónico es un resultado que se halla con frecuencia (Ito et al., 2010; Schweizer, Henniger y Sillaber, 2009; Strelakova et al., 2005) mientras que la afectación de la conducta de ansiedad resulta menos consistente (Ito et al., 2010; Kompagne et al., 2008; revisado en Schweizer, Henniger y Sillaber, 2009). Al igual que en el primer experimento de esta Tesis Doctoral, los knockout presentaron una elevada tigmotaxis durante la prueba y menos conductas de exploración, pero ninguna de estas variables se relacionó con su peor rendimiento cognitivo. Además, estas conductas no variaron tras el estrés en el genotipo mutante. El hecho de que los mutantes no incrementaran su actividad después del tratamiento de estrés de nuevo apunta a la existencia de déficit motores en estos animales, seguramente relacionados con su alteración en la organización de la corteza motora y en la fuerza muscular (Estivill-Torrús et al., 2008; Santín et al., 2009).

Relevancia clínica de los resultados: Implicación para la esquizofrenia

Los resultados de este experimento sugieren que el LPA₁ modula el efecto del estrés crónico sobre la neurogénesis hipocámpal y sobre la conducta que depende de este proceso, como la memoria espacial a largo plazo. Por tanto, la estimulación de este receptor (mediante la administración de LPA u otros agonistas) tendría una utilidad potencial para paliar las consecuencias del estrés sobre la neurogénesis y tendría por tanto relevancia clínica. Esta hipótesis deberá comprobarse en futuras investigaciones. Sin embargo, los resultados aquí expuestos podrían tener especial interés en relación a la patología esquizofrénica, ya que los pacientes esquizofrénicos comparten numerosas características con los LPA₁-nulos, entre ellas la baja expresión del receptor (Bowden et al., 2006).

Las características de los ratones carentes del receptor LPA₁ ha llevado a proponerlos como un modelo para el estudio de la esquizofrenia (Choi et al., 2009; Desbonnet, Waddington y Tuathaigh, 2009; van den Buuse, 2010). Así, los *maLPA₁*-nulos presentan dismorfismo craneoencefálico (Contos et al., 2000; Estivill-Torrús et al., 2008; Harrison et al., 2003), menor tamaño cerebral (Estivill-Torrús et al., 2008), menor volumen del hipocampo (este trabajo), alteración de la mielinización (Contos et al., 2000) y alteración de la neurotransmisión de la 5-HT, GABA y glutamato (Cunningham et al., 2006, Harrison et al., 2003; Roberts et al., 2005). Estas características se han descrito en pacientes esquizofrénicos y en otros modelos murinos de esta patología (p.ej., Abi-Dargham et al., 1997; Akbarian et al., 1993; Ayhan et al., 2009; Benes, Todtenkopf y Kostoulakos, 2001; Bressan y Pilowsky, 2000; Hennessy et al., 2007; Karoutzou, Emrich y Dietrich, 2008; Selemon y Goldman-Rakic, 1999; van Haren et al., 2008). En este sentido cabe destacar que, al igual que en los *maLPA₁*-nulos, los pacientes esquizofrénicos muestran una reducción de neurogénesis hipocámpal (Reif et al., 2006; 2007), lo cual podría explicar parte de su sintomatología (Aleman et al., 1999). Por otra parte, las alteraciones conductuales de los ratones carentes de LPA₁ recuerdan a los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (Arguello y Gogos, 2010; Cosoff y Hafner, 1998; van den Buuse, 2010; Wolff y O'Driscoll, 1999). Este es el caso de la exploración reducida, el deterioro de la inhibición prepulso del reflejo de sobresalto (Harrison et al., 2003), el déficit de memoria espacial a largo plazo, el uso de estrategias repetitivas (Santín et al., 2009), la elevada ansiedad y el déficit de memoria espacial de trabajo en tareas que requieren el aprendizaje de reglas. Por otra parte, como se ha mencionado, un estudio muestra que la expresión del gen del receptor LPA₁ se halla reducida en una población de pacientes

esquizofrénicos (Bowden et al., 2006), indicando que la ausencia de LPA₁ podría suponer un factor de vulnerabilidad genética para la esquizofrenia.

La esquizofrenia es un trastorno complejo en el que podría participar un amplio conjunto de genes, que soportarían aspectos específicos de la enfermedad (Desbonnet, Waddington y Tuathaigh, 2009). El estrés de la vida diaria interaccionaría con los factores genéticos para inducir el inicio o el agravamiento de los síntomas esquizofrénicos (Corcoran et al., 2002; Jones y Fernyhough, 2007; Leff et al., 1983; Norman y Malla, 1993), y se ha sugerido que estos pacientes presentarían un incremento de la respuesta hormonal al estrés (Jones y Fernyhough, 2007). Sin embargo, aún no se han descrito los mecanismos mediante los que el estrés podría exacerbar la patología esquizofrénica. Este trabajo muestra que la ausencia del receptor LPA₁ en combinación con estrés crónico es suficiente para producir un notable déficit de neurogénesis hipocampal acompañado de una severa alteración de la consolidación de la memoria espacial a largo plazo. En concordancia, los déficit mnésicos en la esquizofrenia pueden estar más relacionados con la memoria a largo plazo que con la memoria a corto plazo y podrían explicarse, al menos en parte, por una consolidación defectuosa (meta-análisis de Aleman et al., 1999). Este perfil cognitivo en los pacientes esquizofrénicos podría relacionarse con su déficit de neurogénesis hipocampal, que muestra un menor número de nuevas neuronas (Reif et al., 2006; 2007) y también una conectividad defectuosa de éstas (Duan et al., 2007), al igual que ocurre en los ratones maLPA₁-nulos. Los resultados también sugieren que los pacientes esquizofrénicos tendrían un peor pronóstico que los sujetos no vulnerables al enfrentarse a un mismo estresor, por lo que no sería necesaria la ocurrencia de estresores más severos para que se desencadenara la psicopatología (Norman y Malla, 1993). En definitiva, el estudio de la influencia del LPA y el receptor LPA₁ sobre la respuesta neurogénica al estrés crónico podría beneficiar el desarrollo de nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de la psicopatología esquizofrénica.

Capítulo V

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Los ratones carentes del receptor LPA₁ presentan déficit de memoria espacial a largo plazo y de trabajo, elevada ansiedad y menor exploración. Estas alteraciones conductuales son independientes entre sí.
2. Los ratones carentes del receptor de ácido lisofosfatídico LPA₁ presentan alteraciones de la neurogénesis hipocampal adulta, afectándose la proliferación y el desarrollo de las nuevas neuronas.
3. En situaciones de estrés crónico, la ausencia del receptor LPA₁ agrava la afectación de la neurogénesis hipocampal inducida por el estrés, encontrándose una alteración más severa en la proliferación celular, en el número y desarrollo de las neuronas jóvenes, en la apoptosis y en el volumen y densidad de la capa granular del giro dentado.
4. En situaciones de estrés crónico y agudo, los ratones carentes del receptor LPA₁ presentan una alteración de los niveles de corticosterona en suero.
5. En situaciones de estrés crónico, la ausencia del receptor LPA₁ agrava la afectación de la memoria espacial al largo plazo, hallándose un severo déficit en la consolidación.
6. Los resultados demuestran que el receptor LPA₁ modula la neurogénesis hipocampal adulta en situaciones basales y de estrés crónico. En ambos casos, el deterioro de la neurogénesis hipocampal podría explicar, al menos en parte, los déficit conductuales hallados en ausencia de LPA₁.
7. La estimulación de la vía de señalización mediada por el LPA₁ podría tener aplicación clínica en patologías asociadas a la neurogénesis hipocampal y al estrés, como es el caso de la esquizofrenia.

ANEXOS

Anexo I: Tablas de las soluciones factoriales

Soluciones factoriales completas extraídas por el ACP, por separado para cada día y para cada genotipo. Se consideraron las cargas mayores de 0.6 (en negrita).

Día 1 de Habitación								
	Wild Type				maLPA ₁ -nulo			
<i>Factor</i>	1	2	3	4	1	2	3	4
Locomoción	.927	.156	-.154	-.031	.950	.091	-.083	-.036
<i>Head dipping</i>	.408	.733	-.190	-.036	.078	-.003	-.102	.975
<i>Rearing</i>	.897	.329	.164	-.072	.835	-.106	-.296	.125
<i>Grooming</i>	.143	.910	-.059	-.125	.475	.782	.185	-.162
Valoración riesgo	-.075	-.117	.167	.969	-.266	.885	-.190	.061
Tigmotaxis	.149	.038	.909	.280	-.193	.039	.918	-.198
Defecación	-.265	-.430	.768	-.051	-.210	-.441	.671	.501
<i>%Varianza total</i>	43.43	23.06	12.05	10.37	34.90	24.26	17.03	14.50

Día 2 de Habitación								
	Wild Type				maLPA ₁ -nulo			
<i>Factor</i>	1	2	3	4	1	2	3	4
Locomoción	.135	.961	-.080	.012	.882	-.075	-.300	-.177
<i>Head dipping</i>	-.060	.046	-.177	.956	.315	-.327	-.622	.390
<i>Rearing</i>	.892	.273	.176	.108	.845	.076	-.077	.365
<i>Grooming</i>	.095	-.109	.906	-.277	.046	.028	-.080	.978
Valoración riesgo	.168	-.574	-.607	-.331	-.434	.836	.165	-.060
Tigmotaxis	.754	-.224	-.200	-.435	-.125	.097	.936	.001
Defecación	-	-	-	-	.399	.853	.135	.082
<i>%Varianza total</i>	30.97	26.86	20.98	11.28	39.12	23.13	15.90	10.52

Día 1 de Aprendizaje Espacial								
	Wild Type				maLPA ₁ -nulo			
<i>Factor</i>	1	2	3	4	1	2	3	4
M. Largo plazo.	.058	-.112	.853	-.111	.296	.041	.929	.053
M. De trabajo	-.233	-.101	-.771	-.090	-.227	.740	.340	-.337
Locomoción	.931	-.053	.213	.252	.861	.021	.342	.284
Duración ensayo	-.291	.920	.034	.108	-.894	-.105	-.329	.162
<i>Head dipping</i>	.931	-.053	.213	.252	.825	-.475	-.150	-.064
<i>Rearing</i>	.312	.018	-.043	.936	.065	.922	-.124	.250
Tigmotaxis	.567	.768	-.086	-.167	-.017	.056	.046	.971
<i>%Varianza total</i>	39.8	21.38	17.66	10.35	39.82	26.69	17.30	9.54

Día 2 de Aprendizaje Espacial								
Factor	Wild Type				maLPA ₁ -nulo			
	1	2	3	4	1	2	3	4
M. Largo plazo	-.108	-.102	-.969	-.026	.003	-.046	.945	.183
M. De trabajo	.011	-.142	-.034	-.971	.014	.878	-.220	.035
Locomoción	.531	.481	.294	.469	.926	-.024	.184	-.192
Duración ensayo	-.946	-.046	.074	.203	-.828	-.432	-.041	-.293
Head dipping	.871	.114	.307	.290	.919	-.230	-.246	-.047
Rearing	.090	.697	.517	.236	-.034	.791	.173	-.274
Tigmotaxis	.080	.962	-.003	.076	-.052	-.154	.197	.929
<i>%Varianza total</i>	45.36	20.63	13.03	12.09	34.49	24.85	18.65	11.44
Día 3 de Aprendizaje Espacial								
Factor	Wild Type				maLPA ₁ -nulo			
	1	2	3	4	1	2	3	4
M. Largo plazo	.051	.001	.401	.859	.080	.953	-.163	.114
M. De trabajo	.048	.016	.921	.253	.026	.152	-.221	.945
Locomoción	.654	.511	-.394	-.110	.831	.323	.175	-.226
Duración ensayo	-.939	.100	-.192	-.146	-.647	-.649	-.099	-.235
Head dipping	.633	.005	-.567	-.345	.947	-.041	.031	.161
Rearing	.154	.823	.081	-.411	-.147	-.317	.777	-.388
Tigmotaxis	-.140	.882	-.025	.291	.302	.055	.910	-.059
<i>%Varianza total</i>	36.47	23.75	20.90	7.8	39.92	31.20	11.46	9.26
Día 4 de Aprendizaje Espacial								
Factor	Wild Type				maLPA ₁ -nulo			
	1	2	3	4	1	2	3	4
M. Largo plazo	-.069	-.097	-.012	.985	.133	-.030	.082	.969
M. De trabajo	-.059	-.187	.969	-.022	.009	.966	.005	-.027
Locomoción	.668	.477	-.446	-.129	.922	-.134	.087	-.151
Duración ensayo	-.899	.238	-.089	-.195	-.829	-.124	.148	-.256
Head dipping	.926	.075	-.123	-.282	.856	.184	-.279	.231
Rearing	-.103	.885	-.105	-.122	-.194	-.591	-.667	-.020
Tigmotaxis	.060	.870	-.162	-.017	-.289	-.049	.867	.080
<i>%Varianza total</i>	38.08	27.19	15.15	10.00	37.78	23.05	15.33	11.85

Anexo II: Protocolos del fijador y de los tampones usados en inmunohistoquímica

- *PLP: Paraformaldehído 4 %, Lisina 0.075 M, Peryodato sódico 0.01 M, pH 7.4 (Perfusión y posfijación)*

Para 200 ml:

- Disolver 8 g de paraformaldehído en 50 ml de agua destilada calentada previamente a 60 °C, con agitación. Puede ser necesario añadir 1-2 gotas de NaOH al 2.5 % para que se disuelva completamente.
- Filtrar, completar hasta 100 ml con agua destilada y dejar enfriar.
- Añadir 100 ml de PB 0.2 M, pH 7.4 en los que se ha disuelto previamente 2.74 gr de lisina (L-lisina monoclóhidrato) y 0.428 gr de meta-peryodato sódico (NaIO_4).

- *Tampón PBS, 0.1 M pH 7.4 (Perfusión e inmunohistoquímica)*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.9 gr
 KH_2PO_40.43 gr
 NaCl.....7.22 gr
 Agua destilada..... Hasta 1 litro

- *Tampón TRIS-PBS (TPBS), 0.01 M PH 7.8 (Inmunohistoquímica de BrdU)*

Na_2HPO_4 (x2 H_2O).....1.48 gr
 KH_2PO_40.48 gr
 NaCl.....7 gr
 TRIS (Hydroxymethyl-aminomethan)..... 5 gr
 NaN_3 (Azida Sódica).....0.2 gr
 Agua destilada..... Hasta 1 litro

- *Tampón borato pH 8.5 (Inmunohistoquímica de BrdU)*

Para 100 ml:

50 ml $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.025 M

15.2 ml HCl 0.1 M

Llevar a 100 ml con agua destilada y hasta pH 8.5

En todos los casos, el pH se ajusta con HCl o NaOH según sea necesario.

Anexo III: Publicación de los resultados

Los resultados derivados de esta Tesis Doctoral se han presentado en congresos nacionales e internacionales y en revistas científicas de impacto:

- Castilla-Ortega, E., Hoyo-Becerra, C., Pedraza, C., Chun, J., De Fonseca, F.R., Estivill-Torrús, G. y Santín, L.J. Absence of lysophosphatidic acid LPA₁ receptor aggravates the pathological consequences of chronic stress on hippocampal neurogenesis and spatial memory. En revisión por la revista *PlosONE*.
- Castilla-Ortega, E., Pedraza, C., Estivill-Torrús, G. y Santín L.J. (2011). When is adult hippocampal neurogenesis necessary for learning? Evidence from animal research. *Reviews in the Neurosciences*, En prensa.
- Castilla-Ortega, E., Sanchez-Lopez, J., Hoyo-Becerra, C., Matas-Rico, E., Zambrana-Infantes, E., Chun, J., De Fonseca, F. R., Pedraza, C., Estivill-Torrús, G. y Santín, L.J. (2010). Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA1 receptor. *Neurobiol Learn Mem*, 94, 73-82.
- Castilla-Ortega, E., Sánchez-López, J., Hoyo-Becerra, C., Zambrana-Infantes, E., Matas-Rico, E., Chun, J., Rodríguez De Fonseca, F., Pedraza, C., Estivill-Torrús y Santín, L.J. (2010). Aplicación del análisis de componentes principales al estudio de la conducta de ratones salvajes y carentes del receptor LPA1 en el laberinto de hoyos. Actas del XI congreso de metodología de las ciencias sociales y de la salud. MJ Blanca, R Alarcón, D López-Montiel, Coords. Ed. UMA-Technolex, Málaga, España. pp 516-521.
- Santín, L.J., Castilla-Ortega, E., Hoyo-Becerra, C., Pedraza, C., Chun, J., Rodríguez de Fonseca, F. y Estivill-Torrús, G. Moduladores Lipídicos en la respuesta hipocampal al estrés crónico: Papel del ácido lisofosfatídico en la neurogénesis hipocampal adulta y la memoria espacial. VII Congreso Iberoamericano de Psicología. Oviedo; 20-24 de Julio, 2010. Comunicación invitada a Simposium.
- Castilla-Ortega E., Hoyo-Becerra C., Hurtado-Guerrero I., García-Díaz B., Sánchez-López J., Zambrana-Infantes E., Gómez-Conde A.I., Matas-Rico E., Chun J., García-Fernández M., Rodríguez De Fonseca F., Pedraza C., Estivill-Torrús G. y Santín L.J. Lysophosphatidic acid LPA₁ receptor modulates the effect of chronic stress on spatial long-term memory and hippocampal neurogenesis. 7th Forum of European Neuroscience. Ámsterdam; 3-7 de Julio, 2010. Comunicación en formato de póster.
- Castilla-Ortega, E., Hoyo-Becerra, C., Pedraza, C., Sánchez-López, J., Zambrana-Infantes, E., García, M., Matas-Rico, E., Chun, J., Rodríguez de Fonseca, F., Estivill-Torrús, G. y Santín, L.J. La ausencia del receptor LPA₁ potencia las alteraciones de memoria a largo plazo inducidas por estrés crónico. XIII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. Tarragona; 16-19 de septiembre, 2009. Comunicación en formato de póster.

REFERENCIAS

- Aberg, M. A., Aberg, N. D., Hedbacker, H., Oscarsson, J. y Eriksson, P. S. (2000). Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20, 2896-903.
- Abi-Dargham, A., Laruelle, M., Aghajanian, G. K., Charney, D. y Krystal, J. (1997). The role of serotonin in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 9, 1-17.
- Acevedo, S. F., Pfankuch, T., Ohtsu, H. y Raber, J. (2006). Anxiety and cognition in female histidine decarboxylase knockout (Hdc^{-/-}) mice. *Behav Brain Res*, 168, 92-9.
- Aggleton, J. P. y Brown, M. W. (1999). Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci*, 22, 425-44; discussion 444-89.
- Aguilera, G. (1994). Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol*, 15, 321-50.
- Airan, R. D., Meltzer, L. A., Roy, M., Gong, Y., Chen, H. y Deisseroth, K. (2007). High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science*, 317, 819-23.
- Akirav, I., Kozenicky, M., Tal, D., Sandi, C., Venero, C. y Richter-Levin, G. (2004). A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learn Mem*, 11, 188-95.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1992). *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega, D.L.
- Aleman, A., Hijman, R., de Haan, E. H. y Kahn, R. S. (1999). Memory impairment in schizophrenia: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 156, 1358-66.
- Alfarez, D. N., Karst, H., Velzing, E. H., Joels, M. y Krugers, H. J. (2008). Opposite effects of glucocorticoid receptor activation on hippocampal CA1 dendritic complexity in chronically stressed and handled animals. *Hippocampus*, 18, 20-8.
- Alger, B. E. y Teyler, T. J. (1976). Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice. *Brain Res*, 110, 463-80.
- Allard, J., Barron, S., Diaz, J., Lubetzki, C., Zalc, B., Schwartz, J. C. y Sokoloff, P. (1998). A rat G protein-coupled receptor selectively expressed in myelin-forming cells. *Eur J Neurosci*, 10, 1045-53.
- Altman, J. y Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124, 319-35.
- Álvarez-Buylla, A. y García-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*, 22, 629-34.
- Amaral, D. G. y Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31, 571-91.
- Anagnostaras, S. G., Gale, G. D. y Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*, 11, 8-17.
- Anliker, B. y Chun, J. (2004). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 279, 20555-8.
- Aoki, J. (2004). Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol*, 15, 477-89.
- Aoki, J., Inoue, A. y Okudaira, S. (2008). Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta*, 1781, 513-8.
- Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R. y Arai, H. (2002). Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem*, 277, 48737-44.
- Arai, N., Sakurai, Y., Shikai, C., Fuse, S. y Shimpo, T. (2006). Severe amnesia after a restricted lesion in the left hippocampal body. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77, 1196-8.

- Arguello, P. A. y Gogos, J. A. (2010). Cognition in mouse models of schizophrenia susceptibility genes. *Schizophr Bull*, 36, 289-300.
- Arias-Carrión, O., Olivares-Buñuelos, T. y Drucker-Colin, R. (2007). [Neurogenesis in the adult brain]. *Rev Neurol*, 44, 541-50.
- Aston-Jones, G. y Cohen, J. D. (2005). An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci*, 28, 403-50.
- Atkinson, H. C. y Waddell, B. J. (1997). Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology*, 138, 3842-8.
- Avital, A., Segal, M. y Richter-Levin, G. (2006). Contrasting roles of corticosteroid receptors in hippocampal plasticity. *J Neurosci*, 26, 9130-4.
- Aznar, S., Rasmussen, T. y Zimmer, J. (1998). Impaired learning correlates with size of excitotoxic hippocampal CA3 lesions in adult rats, but shows no amelioration by CA3 transplants. *Restor Neurol Neurosci*, 13, 141-51.
- Bain, M. J., Dwyer, S. M. y Rusak, B. (2004). Restraint stress affects hippocampal cell proliferation differently in rats and mice. *Neurosci Lett*, 368, 7-10.
- Balu, D. T. y Lucki, I. (2009). Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev*, 33, 232-52.
- Banasr, M., Hery, M., Printemps, R. y Daszuta, A. (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*, 29, 450-60.
- Bandoh, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H. y Inoue, K. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 274, 27776-85.
- Bandoh, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H. y Inoue, K. (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett*, 478, 159-65.
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N., McHugh, S. B., Deacon, R. M., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H. y Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 28, 273-83.
- Barnea, A. y Nottebohm, F. (1994). Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 11217-21.
- Beck, K. D. y Luine, V. N. (1999). Food deprivation modulates chronic stress effects on object recognition in male rats: role of monoamines and amino acids. *Brain Res*, 830, 56-71.
- Begega, A., Miranda, R., Rubio, S., Santín, L., Cuesta, M. y Arias, J. L. (1998). Aplicaciones de la estereología en Psicobiología. *Revista Electrónica de Metodología Aplicada*, 3, 30-40.
- Belvindrah, R., Rougon, G. y Chazal, G. (2002). Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice. *J Neurosci*, 22, 3594-607.
- Benes, F. M., Todtenkopf, M. S. y Kostoulakos, P. (2001). GluR5,6,7 subunit immunoreactivity on apical pyramidal cell dendrites in hippocampus of schizophrenics and manic depressives. *Hippocampus*, 11, 482-91.
- Bergami, M., Berninger, B. y Canossa, M. (2009). Conditional deletion of TrkB alters adult hippocampal neurogenesis and anxiety-related behavior. *Commun Integr Biol*, 2, 14-6.
- Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Gotz, M. y Canossa, M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15570-5.
- Bertoglio, L. J., Joca, S. R. y Guimaraes, F. S. (2006). Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav Brain Res*, 175, 183-8.
- Best, P. J., White, A. M. y Minai, A. (2001). Spatial processing in the brain: the activity of

- hippocampal place cells. *Annu Rev Neurosci*, 24, 459-86.
- Blackstad, T. W., Brink, K., Hem, J. y Jeune, B. (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol*, 138, 433-49.
- Bliss, T. V. y Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 331-56.
- Bothe, G. W., Bolivar, V. J., Vedder, M. J. y Geistfeld, J. G. (2004). Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes Brain Behav*, 3, 149-57.
- Bowden, N. A., Weidenhofer, J., Scott, R. J., Schall, U., Todd, J., Michie, P. T. y Tooney, P. A. (2006). Preliminary investigation of gene expression profiles in peripheral blood lymphocytes in schizophrenia. *Schizophr Res*, 82, 175-83.
- Branchi, I., D'Andrea, I., Sietzema, J., Fiore, M., Di Fausto, V., Aloe, L. y Alleva, E. (2006). Early social enrichment augments adult hippocampal BDNF levels and survival of BrdU-positive cells while increasing anxiety- and "depression"-like behavior. *J Neurosci Res*, 83, 965-73.
- Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., von der Behrens, W. y Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*, 24, 603-13.
- Brezun, J. M. y Daszuta, A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*, 89, 999-1002.
- Brindley, D. N. (2004). Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem*, 92, 900-12.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R. y Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14515-20.
- Brody, D. L. y Holtzman, D. M. (2006). Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 197, 330-40.
- Brown, E. S., Rush, A. J. y McEwen, B. S. (1999). Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacology*, 21, 474-84.
- Brown, J. P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L. y Kuhn, H. G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 467, 1-10.
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S. y Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 21, 513-21.
- Brummelte, S. y Galea, L. A. (2010). Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats. *Neuroscience*, 168, 680-90.
- Brunson, K. L., Baram, T. Z. y Bender, R. A. (2005). Hippocampal neurogenesis is not enhanced by lifelong reduction of glucocorticoid levels. *Hippocampus*, 15, 491-501.
- Cameron, H. A. y Gould, E. (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*, 61, 203-9.
- Cameron, H. A., McEwen, B. S. y Gould, E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 15, 4687-92.
- Cameron, H. A. y McKay, R. D. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci*, 2, 894-7.
- Cameron, H. A. y McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 435, 406-17.
- Cameron, H. A., Woolley, C. S. y Gould, E. (1993). Adrenal steroid receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus. *Brain Res*, 611, 342-6.
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S. y Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56, 337-44.

- Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiology reviews*, 9, 399-431.
- Carobrez, A. P. y Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, 29, 1193-205.
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F. y Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res*, 134, 49-57.
- Carro, E., Nunez, A., Busiguina, S. y Torres-Aleman, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci*, 20, 2926-33.
- Cassel, J. C., Duconseille, E., Jeltsch, H. y Will, B. (1997). The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol*, 51, 663-716.
- Castilla-Ortega, E., Sánchez-López, J., Hoyo-Becerra, C., Matas-Rico, E., Zambrana-Infantes, E., Chun, J., De Fonseca, F. R., Pedraza, C., Estivill-Torrús, G. y Santín, L. J. (2010). Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA1 receptor. *Neurobiol Learn Mem*, 94, 73-82.
- Cayre, M., Malaterre, J., Scotto-Lomassese, S., Aouane, A., Strambi, C. y Strambi, A. (2005). Hormonal and sensory inputs regulate distinct neuroblast cell cycle properties in adult cricket brain. *J Neurosci Res*, 82, 659-64.
- Cerqueira, J. J., Mailliet, F., Almeida, O. F., Jay, T. M. y Sousa, N. (2007). The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci*, 27, 2781-7.
- Chen, J., Lipska, B. K. y Weinberger, D. R. (2006). Genetic mouse models of schizophrenia: from hypothesis-based to susceptibility gene-based models. *Biol Psychiatry*, 59, 1180-8.
- Choi, J. W., Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C. W., Mutoh, T., Lin, M. E., Teo, S. T., Park, K. E., Mosley, A. N. y Chun, J. (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 157-86.
- Choi, J. W., Lee, C. W. y Chun, J. (2008). Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim Biophys Acta*, 1781, 531-9.
- Choi, S. H., Li, Y., Parada, L. F. y Sisodia, S. S. (2009). Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. *Mol Neurodegener*, 4, 52.
- Christie, B. R. y Cameron, H. A. (2006). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus*, 16, 199-207.
- Christie, B. R., Swann, S. E., Fox, C. J., Froc, D., Lieblich, S. E., Redila, V. y Webber, A. (2005). Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. *Eur J Neurosci*, 21, 1719-26.
- Chrousos, G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*, 332, 1351-62.
- Chun, J. (2005). Lysophospholipids in the nervous system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 77, 46-51.
- Clark, P. J., Brzezinska, W. J., Thomas, M. W., Ryzhenko, N. A., Toshkov, S. A. y Rhodes, J. S. (2008). Intact neurogenesis is required for benefits of exercise on spatial memory but not motor performance or contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Neuroscience*, 155, 1048-58.
- Clark, R. E., Zola-Morgan, S. y Squire, L. R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci*, 20, 8853-60.
- Conrad, C. D. (2008). Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Rev Neurosci*, 19, 395-411.
- Conrad, C. D. (2010). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34, 742-55.
- Conrad, C. D. y Roy, E. J. (1993). Selective loss of hippocampal granule cells following adrenalectomy: implications for spatial memory. *J Neurosci*, 13, 2582-90.
- Contos, J. J. y Chun, J. (2000). Genomic characterization of the lysophosphatidic acid receptor

- gene, lp(A2)/Edg4, and identification of a frameshift mutation in a previously characterized cDNA. *Genomics*, 64, 155-69.
- Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D. y Chun, J. (2000). Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13384-9.
- Contos, J. J., Ishii, I. y Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*, 58, 1188-96.
- Contos, J. J., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M. A., Ye, X., Kawamura, S., Brown, J. H. y Chun, J. (2002). Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). *Mol Cell Biol*, 22, 6921-9.
- Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J. y Kuhn, H. G. (2004). Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res*, 77, 155-65.
- Coras, R., Siebzehrubl, F. A., Pauli, E., Huttner, H. B., Njunting, M., Kobow, K., Villmann, C., Hahnen, E., Neuhuber, W., Weigel, D., Buchfelder, M., Stefan, H., Beck, H., Steindler, D. A. y Blumcke, I. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain, En prensa*; doi:10.1093/brain/awq215.,
- Corcoran, C., Mujica-Parodi, L., Yale, S., Leitman, D. y Malaspina, D. (2002). Could stress cause psychosis in individuals vulnerable to schizophrenia? *CNS Spectr*, 7, 33-8, 41-2.
- Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci*, 3, 153-60.
- Corkin, S., Amaral, D. G., Gonzalez, R. G., Johnson, K. A. y Hyman, B. T. (1997). H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci*, 17, 3964-79.
- Corotto, F. S., Henegar, J. A. y Maruniak, J. A. (1993). Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett*, 149, 111-4.
- Cosoff, S. J. y Hafner, R. J. (1998). The prevalence of comorbid anxiety in schizophrenia, schizoaffective disorder and bipolar disorder. *Aust N Z J Psychiatry*, 32, 67-72.
- Cowan, N., Morey, C. C., Chen, Z., Gilchrist, A. L. y Scott, S. (2008). Theory and Measurement of Working Memory Capacity Limits. *Psychology of Learning and Motivation*, 49, 49-104.
- Cowen, D. S., Takase, L. F., Fornal, C. A. y Jacobs, B. L. (2008). Age-dependent decline in hippocampal neurogenesis is not altered by chronic treatment with fluoxetine. *Brain Res*, 1228, 14-9.
- Crawley, J. N. (1999). Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res*, 835, 18-26.
- Crofford, L. J., Young, E. A., Engleberg, N. C., Korszun, A., Brucksch, C. B., McClure, L. A., Brown, M. B. y Demitrack, M. A. (2004). Basal circadian and pulsatile ACTH and cortisol secretion in patients with fibromyalgia and/or chronic fatigue syndrome. *Brain Behav Immun*, 18, 314-25.
- Cruz-Orive, L. M. (1987). Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. *J Microsc*, 145, 121-42.
- Cunningham, M. O., Hunt, J., Middleton, S., LeBeau, F. E., Gillies, M. J., Davies, C. H., Maycox, P. R., Whittington, M. A. y Racca, C. (2006). Region-specific reduction in entorhinal gamma oscillations and parvalbumin-immunoreactive neurons in animal models of psychiatric illness. *J Neurosci*, 26, 2767-76.
- Czeh, B. y Lucassen, P. J. (2007). What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 257, 250-60.
- Daenen, E. W., Van der Heyden, J. A., Kruse, C. G., Wolterink, G. y Van Ree, J. M. (2001). Adaptation and habituation to an open field and responses to various stressful events in animals with neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus. *Brain Res*, 918, 153-65.
- Dash, P. K., Orsi, S. A., Moody, M. y Moore, A. N. (2004). A role for hippocampal Rho-ROCK pathway in long-term spatial memory. *Biochem Biophys Res Commun*, 322, 893-8.

- Daszuta, A., Chazal, G., Garcia, S., Oleskevich, S. y Descarries, L. (1991). Ultrastructural features of serotonin neurons grafted to adult rat hippocampus: an immunocytochemical analysis of their cell bodies and axon terminals. *Neuroscience*, 42, 793-811.
- Daumas, S., Halley, H., Frances, B. y Lassalle, J. M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem*, 12, 375-82.
- Dayer, A. G., Ford, A. A., Cleaver, K. M., Yassaee, M. y Cameron, H. A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 460, 563-72.
- Deacon, R. M., Croucher, A. y Rawlins, J. N. (2002). Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav Brain Res*, 132, 203-13.
- Denis-Donini, S., Dellarole, A., Crociara, P., Francese, M. T., Bortolotto, V., Quadrato, G., Canonico, P. L., Orsetti, M., Ghi, P., Memo, M., Bonini, S. A., Ferrari-Toninelli, G. y Grilli, M. (2008). Impaired adult neurogenesis associated with short-term memory defects in NF-kappaB p50-deficient mice. *J Neurosci*, 28, 3911-9.
- Desbonnet, L., Waddington, J. L. y Tuathaigh, C. M. (2009). Mice mutant for genes associated with schizophrenia: common phenotype or distinct endophenotypes? *Behav Brain Res*, 204, 258-73.
- Dircks, L. y Sul, H. S. (1999). Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis. *Prog Lipid Res*, 38, 461-79.
- Dobrossy, M. D., Drapeau, E., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V. y Abrous, D. N. (2003). Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry*, 8, 974-82.
- Dockstader, C. L. y van der Kooy, D. (2001). Mouse strain differences in opiate reward learning are explained by differences in anxiety, not reward or learning. *J Neurosci*, 21, 9077-81.
- Doetsch, F. y Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14895-900.
- Donohue, H. S., Gabbott, P. L., Davies, H. A., Rodriguez, J. J., Cordero, M. I., Sandi, C., Medvedev, N. I., Popov, V. I., Colyer, F. M., Peddie, C. J. y Stewart, M. G. (2006). Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and three-dimensional ultrastructural study. *Neuroscience*, 140, 597-606.
- Douma, B. R., Korte, S. M., Buwalda, B., la Fleur, S. E., Bohus, B. y Luiten, P. G. (1998). Repeated blockade of mineralocorticoid receptors, but not of glucocorticoid receptors impairs food rewarded spatial learning. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 33-44.
- Drapeau, E., Mayo, W., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V. y Abrous, D. N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14385-90.
- Drapeau, E., Montaron, M. F., Aguerre, S. y Abrous, D. N. (2007). Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. *J Neurosci*, 27, 6037-44.
- Duan, X., Chang, J. H., Ge, S., Faulkner, R. L., Kim, J. Y., Kitabatake, Y., Liu, X. B., Yang, C. H., Jordan, J. D., Ma, D. K., Liu, C. Y., Ganesan, S., Cheng, H. J., Ming, G. L., Lu, B. y Song, H. (2007). Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell*, 130, 1146-58.
- Dupret, D., Fabre, A., Dobrossy, M. D., Panatier, A., Rodriguez, J. J., Lamarque, S., Lemaire, V., Oliet, S. H., Piazza, P. V. y Abrous, D. N. (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol*, 5, e214.
- Dupret, D., Revest, J. M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N. y Piazza, P. V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*, 3, e1959.
- Earnheart, J. C., Schweizer, C., Crestani, F., Iwasato, T., Itoharu, S., Mohler, H. y Luscher, B. (2007). GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *J Neurosci*, 27, 3845-54.
- Egeland, M., Warner-Schmidt, J., Greengard, P. y Svenningsson, P. (2010). Neurogenic effects of

- fluoxetine are attenuated in p11 (S100A10) knockout mice. *Biol Psychiatry*, 67, 1048-56.
- Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci*, 1, 41-50.
- Eichenbaum, H. (2003). *Neurociencia cognitiva de la memoria*. Barcelona: Ariel Neurociencia.
- Eisch, A. J., Cameron, H. A., Encinas, J. M., Meltzer, L. A., Ming, G. L. y Overstreet-Wadiche, L. S. (2008). Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *J Neurosci*, 28, 11785-91.
- Eliasson, C., Sahlgren, C., Berthold, C. H., Stakeberg, J., Celis, J. E., Betsholtz, C., Eriksson, J. E. y Pekny, M. (1999). Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem*, 274, 23996-4006.
- Enoch, M. A. (2010). The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence. *Psychopharmacology (Berl)*,
- Epp, J. R. y Galea, L. A. (2009). Hippocampus-dependent strategy choice predicts low levels of cell proliferation in the dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem*, 91, 437-46.
- Epp, J. R., Haack, A. K. y Galea, L. A. (2010). Task difficulty in the Morris water task influences the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 20, 866-76.
- Epp, J. R., Spritzer, M. D. y Galea, L. A. (2007). Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience*, 149, 273-85.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. y Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4, 1313-7.
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J. y Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*, 25, 10074-86.
- Estivill-Torrús, G., Llebreg-Zayas, P., Matas-Rico, E., Santín, L., Pedraza, C., De Diego, I., Del Arco, I., Fernández-Llébreg, P., Chun, J. y De Fonseca, F. R. (2008). Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development. *Cereb Cortex*, 18, 938-50.
- Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C. J. y Palmer, T. D. (2003). VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 18, 2803-12.
- Farioli-Vecchioli, S., Saraulli, D., Costanzi, M., Pacioni, S., Cina, I., Aceti, M., Micheli, L., Bacci, A., Cestari, V. y Tirone, F. (2008). The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS Biol*, 6, e246.
- Feldman, S. y Conforti, N. (1980). Participation of the dorsal hippocampus in the glucocorticoid feedback effect on adrenocortical activity. *Neuroendocrinology*, 30, 52-5.
- Feng, Y. Q., Zhou, Z. Y., He, X., Wang, H., Guo, X. L., Hao, C. J., Guo, Y., Zhen, X. C. y Li, W. (2008). Dysbindin deficiency in sandy mice causes reduction of snapin and displays behaviors related to schizophrenia. *Schizophr Res*, 106, 218-28.
- Fernandes, C., Gonzalez, M. I., Wilson, C. A. y File, S. E. (1999). Factor analysis shows that female rat behaviour is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 64, 731-8.
- Fester, L., Ribeiro-Gouveia, V., Prange-Kiel, J., von Schassen, C., Bottner, M., Jarry, H. y Rune, G. M. (2006). Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem*, 97, 1136-44.
- Figueiredo, H. F., Bodie, B. L., Tauchi, M., Dolgas, C. M. y Herman, J. P. (2003). Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology*, 144, 5249-58.
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H. y Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*, 23, 373-82.

- Florian, C. y Roulet, P. (2004). Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res*, 154, 365-74.
- Fortin, N. J., Agster, K. L. y Eichenbaum, H. B. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nat Neurosci*, 5, 458-62.
- Fourcade, O., Simon, M. F., Viode, C., Rugani, N., Leballe, F., Ragab, A., Fournie, B., Sarda, L. y Chap, H. (1995). Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*, 80, 919-27.
- Frankland, P. W. y Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*, 6, 119-30.
- Frick, K. M. y Fernandez, S. M. (2003). Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging*, 24, 615-26.
- Frielingsdorf, H., Simpson, D. R., Thal, L. J. y Pizzo, D. P. (2007). Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis*, 26, 47-55.
- Fries, E., Hesse, J., Hellhammer, J. y Hellhammer, D. H. (2005). A new view on hypocortisolism. *Psychoneuroendocrinology*, 30, 1010-6.
- Fuchs, E., Uno, H. y Flugge, G. (1995). Chronic psychosocial stress induces morphological alterations in hippocampal pyramidal neurons of the tree shrew. *Brain Res*, 673, 275-82.
- Fujiwara, Y., Sebok, A., Meakin, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K. y Tigyi, G. (2003). Cyclic phosphatidic acid elicits neurotrophin-like actions in embryonic hippocampal neurons. *J Neurochem*, 87, 1272-83.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y. y Hisatsune, T. (2003). Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, 23, 9357-66.
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. J., Weiner, J. A. y Chun, J. (2001). Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 507-34.
- Fukushima, N., Kimura, Y. y Chun, J. (1998). A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6151-6.
- Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., Contos, J. J., Rehen, S. K., Kingsbury, M. A., Kim, K. Y. y Chun, J. (2002). Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Mol Cell Neurosci*, 20, 271-82.
- Fukushima, N., Ye, X. y Chun, J. (2002). Neurobiology of lysophosphatidic acid signaling. *Neuroscientist*, 8, 540-50.
- Fuster, J. M. (1995). *Memory in the cerebral cortex. An empirical approach to neural networks in the human and nonhuman primate*. Cambridge: The MIT Press.
- Gage, F. H., Kempermann, G. y Song, H. (2008). *Adult neurogenesis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Galea, L. A. (2008). Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res Rev*, 57, 332-41.
- García, A., Martí, O., Vallès, A., Dal-Zotto, S. y Armario, A. (2000). Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology*, 72, 114-25.
- García, A., Steiner, B., Kronenberg, G., Bick-Sander, A. y Kempermann, G. (2004). Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell*, 3, 363-71.
- García-Díaz, B., Matas-Rico, E., Riquelme, R., Varela-Nieto, I., Jimenez, A. J., Chun, J., Leyva, L., Fernández, O., De Fonseca, F. R. y Estivill-Torrús, G. (2007). Defective myelination in mice lacking the lysophosphatidic acid receptor LPA1: newcomer models for demyelinating diseases. *Multiple Sclerosis*, 13, 258.
- García-Márquez, C. y Armario, A. (1987). Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiol Behav*, 40, 33-8.

- Garthe, A., Behr, J. y Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*, 4, e5464.
- Ge, S., Goh, E. L., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. L. y Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439, 589-93.
- Ge, S., Sailor, K. A., Ming, G. L. y Song, H. (2008). Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol*, 586, 3759-65.
- Goetzl, E. J., Graeler, M., Huang, M. C. y Shankar, G. (2002). Lysophospholipid growth factors and their G protein-coupled receptors in immunity, coronary artery disease, and cancer. *ScientificWorldJournal*, 2, 324-38.
- Goodman, T., Trouche, S., Massou, I., Verret, L., Zerwas, M., Roulet, P. y Rampon, C. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience*, *En prensa*, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.09.047.,
- Gooney, M., Shaw, K., Kelly, A., O'Mara, S. M. y Lynch, M. A. (2002). Long-term potentiation and spatial learning are associated with increased phosphorylation of TrkB and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the dentate gyrus: evidence for a role for brain-derived neurotrophic factor. *Behav Neurosci*, 116, 455-63.
- Gotz, M. y Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 777-88.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. y Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*, 2, 260-5.
- Gould, E. y Gross, C. G. (2002). Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci*, 22, 619-23.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A. y Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, 17, 2492-8.
- Gould, E. y Tanapat, P. (1999). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*, 46, 1472-9.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G. y Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3168-71.
- Gould, E., Woolley, C. S. y McEwen, B. S. (1990). Short-term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus. *Neuroscience*, 37, 367-75.
- Gregus, A., Wintink, A. J., Davis, A. C. y Kalynchuk, L. E. (2005). Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res*, 156, 105-14.
- Gross, C., Santarelli, L., Brunner, D., Zhuang, X. y Hen, R. (2000). Altered fear circuits in 5-HT(1A) receptor KO mice. *Biol Psychiatry*, 48, 1157-63.
- Grote, H. E. y Hannan, A. J. (2007). Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34, 533-45.
- Gundersen, H. J. y Jensen, E. B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147, 229-63.
- Gundersen, H. J., Jensen, E. B., Kieu, K. y Nielsen, J. (1999). The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J Microsc*, 193, 199-211.
- Hama, K., Bandoh, K., Kakehi, Y., Aoki, J. y Arai, H. (2002). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett*, 523, 187-92.
- Han, J. S., Gallagher, M. y Holland, P. (1998). Hippocampal lesions enhance configural learning by reducing proactive interference. *Hippocampus*, 8, 138-46.
- Handford, E. J., Smith, D., Hewson, L., McAllister, G. y Beer, M. S. (2001). Edg2 receptor distribution in adult rat brain. *Neuroreport*, 12, 757-60.
- Harrison, S. M., Reavill, C., Brown, G., Brown, J. T., Cluderay, J. E., Crook, B., Davies, C. H., Dawson, L. A., Grau, E., Heidbreder, C., Hemmati, P., Hervieu, G., Howarth, A., Hughes, Z. A.,

- Hunter, A. J., Latcham, J., Pickering, S., Pugh, P., Rogers, D. C., Shilliam, C. S. y Maycox, P. R. (2003). LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Mol Cell Neurosci*, 24, 1170-9.
- Hastings, N. B. y Gould, E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*, 413, 146-54.
- Hayashi, K., Takahashi, M., Nishida, W., Yoshida, K., Ohkawa, Y., Kitabatake, A., Aoki, J., Arai, H. y Sobue, K. (2001). Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res*, 89, 251-8.
- Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R. y Chun, J. (1996). Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol*, 135, 1071-83.
- Heimer, L. (1968). Synaptic distribution of centripetal and centrifugal nerve fibres in the olfactory system of the rat. An experimental anatomical study. *J Anat*, 103, 413-32.
- Heine, V. M., Maslam, S., Joels, M. y Lucassen, P. J. (2004). Increased P27KIP1 protein expression in the dentate gyrus of chronically stressed rats indicates G1 arrest involvement. *Neuroscience*, 129, 593-601.
- Heine, V. M., Maslam, S., Zareno, J., Joels, M. y Lucassen, P. J. (2004). Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur J Neurosci*, 19, 131-44.
- Heine, V. M., Zareno, J., Maslam, S., Joels, M. y Lucassen, P. J. (2005). Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression. *Eur J Neurosci*, 21, 1304-14.
- Henckens, M. J., Hermans, E. J., Pu, Z., Joels, M. y Fernandez, G. (2009). Stressed memories: how acute stress affects memory formation in humans. *J Neurosci*, 29, 10111-9.
- Hennessy, R. J., Baldwin, P. A., Browne, D. J., Kinsella, A. y Waddington, J. L. (2007). Three-dimensional laser surface imaging and geometric morphometrics resolve frontonasal dysmorphology in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 61, 1187-94.
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K. y Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29, 1201-13.
- Herman, J. P., Schafer, M. K., Young, E. A., Thompson, R., Douglass, J., Akil, H. y Watson, S. J. (1989). Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci*, 9, 3072-82.
- Hernández-Rabaza, V., Llorens-Martín, M., Velázquez-Sánchez, C., Ferragud, A., Arcusa, A., Gumus, H. G., Gómez-Pinedo, U., Pérez-Villalba, A., Roselló, J., Trejo, J. L., Barcia, J. A. y Canales, J. J. (2009). Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal. *Neuroscience*, 159, 59-68.
- Herrero, A. I., Sandi, C. y Venero, C. (2006). Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiol Learn Mem*, 86, 150-9.
- Hodges, H. (1996). Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res*, 3, 167-81.
- Holmes, A. y Rodgers, R. J. (1998). Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav*, 60, 473-88.
- Honey, R. C., Marshall, V. J., McGregor, A., Futter, J. y Good, M. (2007). Revisiting places passed: sensitization of exploratory activity in rats with hippocampal lesions. *Q J Exp Psychol (Colchester)*, 60, 625-34.
- Hoshino, T., Ito, S., Asai, A., Shibuya, M., Prados, M. D., Dodson, B. A., Davis, R. L. y Wilson, C. B. (1992). Cell kinetic analysis of human brain tumors by in situ double labelling with bromodeoxyuridine and iododeoxyuridine. *Int J Cancer*, 50, 1-5.

- Houshyar, H., Galigniana, M. D., Pratt, W. B. y Woods, J. H. (2001). Differential responsivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to glucocorticoid negative-feedback and corticotropin releasing hormone in rats undergoing morphine withdrawal: possible mechanisms involved in facilitated and attenuated stress responses. *J Neuroendocrinol*, 13, 875-86.
- Huang, G. J. y Herbert, J. (2006). Stimulation of neurogenesis in the hippocampus of the adult rat by fluoxetine requires rhythmic change in corticosterone. *Biol Psychiatry*, 59, 619-24.
- Im, D. S., Heise, C. E., Harding, M. A., George, S. R., O'Dowd, B. F., Theodorescu, D. y Lynch, K. R. (2000). Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol*, 57, 753-9.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S. y Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci*, 11, 1153-61.
- Inoue, M., Rashid, M. H., Fujita, R., Contos, J. J., Chun, J. y Ueda, H. (2004). Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med*, 10, 712-8.
- Ishii, I., Contos, J. J., Fukushima, N. y Chun, J. (2000). Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol*, 58, 895-902.
- Ito, H., Nagano, M., Suzuki, H. y Murakoshi, T. (2010). Chronic stress enhances synaptic plasticity due to disinhibition in the anterior cingulate cortex and induces hyper-locomotion in mice. *Neuropharmacology*, 58, 746-57.
- Jaholkowski, P., Kiryk, A., Jedynek, P., Ben Abdallah, N. M., Knapska, E., Kowalczyk, A., Piechal, A., Blecharz-Klin, K., Figiel, I., Lioudyno, V., Widy-Tyszkiewicz, E., Wilczynski, G. M., Lipp, H. P., Kaczmarek, L. y Filipkowski, R. K. (2009). New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning. *Learn Mem*, 16, 439-51.
- Janssens, R., Boeynaems, J. M., Godart, M. y Communi, D. (1997). Cloning of a human heptahelical receptor closely related to the P2Y5 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 106-12.
- Jeckel, C. M., Lopes, R. P., Berleze, M. C., Luz, C., Feix, L., Argimon, II, Stein, L. M. y Bauer, M. E. (2010). Neuroendocrine and immunological correlates of chronic stress in 'strictly healthy' populations. *Neuroimmunomodulation*, 17, 9-18.
- Jessberger, S., Clark, R. E., Broadbent, N. J., Clemenson, G. D., Jr., Consiglio, A., Lie, D. C., Squire, L. R. y Gage, F. H. (2009). Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn Mem*, 16, 147-54.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L. y Greenberg, D. A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11946-50.
- Joel, D., Tarrasch, R., Feldon, J. y Weiner, I. (1997). Effects of electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex or its subfields on 4-arm baited, 8-arm radial maze, two-way active avoidance and conditioned fear tasks in the rat. *Brain Res*, 765, 37-50.
- Joels, M. y Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*, 10, 459-66.
- Joels, M., Karst, H., Krugers, H. J. y Lucassen, P. J. (2007). Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol*, 28, 72-96.
- Jones, S. R. y Fernyhough, C. (2007). A new look at the neural diathesis--stress model of schizophrenia: the primacy of social-evaluative and uncontrollable situations. *Schizophr Bull*, 33, 1171-7.
- Jonsson, Z. O. y Hubscher, U. (1997). Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays*, 19, 967-75.
- Joo, J. Y., Kim, B. W., Lee, J. S., Park, J. Y., Kim, S., Yun, Y. J., Lee, S. H., Lee, S. H., Rhim, H. y Son, H. (2007). Activation of NMDA receptors increases proliferation and differentiation of hippocampal neural progenitor cells. *J Cell Sci*, 120, 1358-70.
- Joosen, M. J., Jousma, E., van den Boom, T. M., Kuijpers, W. C., Smit, A. B., Lucassen, P. J. y van Helden, H. P. (2009). Long-term cognitive deficits accompanied by reduced neurogenesis after

- soman poisoning. *Neurotoxicology*, 30, 72-80.
- Jozsa, R., Olah, A., Cornelissen, G., Csernus, V., Otsuka, K., Zeman, M., Nagy, G., Kaszaki, J., Stebelova, K., Csokas, N., Pan, W., Herold, M., Bakken, E. E. y Halberg, F. (2005). Circadian and extracircadian exploration during daytime hours of circulating corticosterone and other endocrine chronomes. *Biomed Pharmacother*, 59 Suppl 1, S109-16.
- Kalueff, A. V., Fox, M. A., Gallagher, P. S. y Murphy, D. L. (2007). Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes Brain Behav*, 6, 389-400.
- Kalueff, A. V. y Tuohimaa, P. (2004). Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 64, 439-48.
- Kalueff, A. V. y Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J Neurosci Methods*, 143, 169-77.
- Kameda, S. R., Frussa-Filho, R., Carvalho, R. C., Takatsu-Coleman, A. L., Ricardo, V. P., Patti, C. L., Calzavara, M. B., Lopez, G. B., Araujo, N. P., Abilio, V. C., Ribeiro Rde, A., D'Almeida, V. y Silva, R. H. (2007). Dissociation of the effects of ethanol on memory, anxiety, and motor behavior in mice tested in the plus-maze discriminative avoidance task. *Psychopharmacology (Berl)*, 192, 39-48.
- Kant, G. J., Leu, J. R., Anderson, S. M. y Mougey, E. H. (1987). Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav*, 40, 775-9.
- Karoutzou, G., Emrich, H. M. y Dietrich, D. E. (2008). The myelin-pathogenesis puzzle in schizophrenia: a literature review. *Mol Psychiatry*, 13, 245-60.
- Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H. y Frankland, P. W. (2007). Imaging activation of adult-generated granule cells in spatial memory. *Nat Protoc*, 2, 3033-44.
- Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H. y Frankland, P. W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 10, 355-62.
- Kempermann, G. y Gage, F. H. (2002). Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci*, 16, 129-36.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M. y Gage, F. H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130, 391-9.
- Kempermann, G., Krebs, J. y Fabel, K. (2008). The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Curr Opin Psychiatry*, 21, 290-5.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. y Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386, 493-5.
- Kesner, R. P., Lee, I. y Gilbert, P. (2004). A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev Neurosci*, 15, 333-51.
- Kessler, R. C., Price, R. H. y Wortman, C. B. (1985). Social factors in psychopathology: stress, social support, and coping processes. *Annu Rev Psychol*, 36, 531-72.
- Khawaja, X., Xu, J., Liang, J. J. y Barrett, J. E. (2004). Proteomic analysis of protein changes developing in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment: Implications for depressive disorders and future therapies. *J Neurosci Res*, 75, 451-60.
- Kim, J., Keys, J. R. y Eckhart, A. D. (2006). Vascular smooth muscle migration and proliferation in response to lysophosphatidic acid (LPA) is mediated by LPA receptors coupling to Gq. *Cell Signal*, 18, 1695-701.
- Kitamura, T., Mishina, M. y Sugiyama, H. (2003). Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Neurosci Res*, 47, 55-63.
- Knowles, W. D. (1992). Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin*

- Neurophysiol*, 9, 252-63.
- Kobayashi, H., Kambe, F., Imai, T., Hibi, Y., Kikumori, T., Ohmori, S., Nakao, A. y Seo, H. (2006). Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p27Kip1 and p57Kip2, by corticotropin in rat adrenal cortex. *J Endocrinol*, 189, 671-9.
- Kolata, S., Light, K., Grossman, H. C., Hale, G. y Matzel, L. D. (2007). Selective attention is a primary determinant of the relationship between working memory and general learning ability in outbred mice. *Learn Mem*, 14, 22-8.
- Kolber, B. J., Wieczorek, L. y Muglia, L. J. (2008). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered glucocorticoid or mineralocorticoid receptor function. *Stress*, 11, 321-38.
- Kompagne, H., Bardos, G., Szenasi, G., Gacsalyi, I., Harsing, L. G. y Levay, G. (2008). Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behav Brain Res*, 193, 311-4.
- Korbo, L., Pakkenberg, B., Ladefoged, O., Gundersen, H. J., Arlien-Soborg, P. y Pakkenberg, H. (1990). An efficient method for estimating the total number of neurons in rat brain cortex. *J Neurosci Methods*, 31, 93-100.
- Kotarsky, K., Boketoft, A., Bristulf, J., Nilsson, N. E., Norberg, A., Hansson, S., Owman, C., Sillard, R., Leeb-Lundberg, L. M. y Olde, B. (2006). Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 619-28.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. y Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16, 2027-33.
- Kulkarni, V. A., Jha, S. y Vaidya, V. A. (2002). Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 16, 2008-12.
- Kvajo, M., McKellar, H., Arguello, P. A., Drew, L. J., Moore, H., MacDermott, A. B., Karayiorgou, M. y Gogos, J. A. (2008). A mutation in mouse *Disc1* that models a schizophrenia risk allele leads to specific alterations in neuronal architecture and cognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7076-81.
- Lagace, D. C., Donovan, M. H., DeCarolis, N. A., Farnbauch, L. A., Malhotra, S., Berton, O., Nestler, E. J., Krishnan, V. y Eisch, A. J. (2010). Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4436-41.
- Laskowski, A., Howell, O. W., Sosunov, A. A., McKhann, G. y Gray, W. P. (2007). NPY mediates basal and seizure-induced proliferation in the subcallosal zone. *Neuroreport*, 18, 1005-8.
- Lee, C. W., Rivera, R., Dubin, A. E. y Chun, J. (2007). LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *J Biol Chem*, 282, 4310-7.
- Lee, E. y Son, H. (2009). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep*, 42, 239-44.
- Lee, I. y Kesner, R. P. (2003). Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J Neurosci*, 23, 1517-23.
- Lee, J. L., Everitt, B. J. y Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, 304, 839-43.
- Lee, K. J., Kim, S. J., Kim, S. W., Choi, S. H., Shin, Y. C., Park, S. H., Moon, B. H., Cho, E., Lee, M. S., Choi, S. H., Chun, B. G. y Shin, K. H. (2006). Chronic mild stress decreases survival, but not proliferation, of new-born cells in adult rat hippocampus. *Exp Mol Med*, 38, 44-54.
- Lee, T., Jarome, T., Li, S. J., Kim, J. J. y Helmstetter, F. J. (2009). Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Neuroreport*, 20, 1554-8.
- Lee, Z., Cheng, C. T., Zhang, H., Subler, M. A., Wu, J., Mukherjee, A., Windle, J. J., Chen, C. K. y Fang, X. (2008). Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell*, 19, 5435-45.

- Leff, J., Kuipers, L., Berkowitz, R., Vaughn, C. y Sturgeon, D. (1983). Life events, relatives' expressed emotion and maintenance neuroleptics in schizophrenic relapse. *Psychol Med*, 13, 799-806.
- Leuner, B. y Gould, E. (2010). Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol*, 61, 111-40, C1-3.
- Leuner, B., Gould, E. y Shors, T. J. (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*, 16, 216-24.
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E. y Shors, T. J. (2004). Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci*, 24, 7477-81.
- Leussis, M. P. y Bolivar, V. J. (2006). Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev*, 30, 1045-64.
- Lever, C., Burton, S. y O'Keefe, J. (2006). Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci*, 17, 111-33.
- Lister, R. G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 46, 321-40.
- Llano López, L., Hauser, J., Feldon, J., Gargiulo, P. A. y Yee, B. K. (2010). Evaluating spatial memory function in mice: a within-subjects comparison between the water maze test and its adaptation to dry land. *Behav Brain Res*, 209, 85-92.
- Lopes da Silva, F. H., Witter, M. P., Boeijinga, P. H. y Lohman, A. H. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev*, 70, 453-511.
- Lu, J. (2009). The anti-proliferation mechanism of glucocorticoid mediated by glucocorticoid receptor-regulating gene expression. *Pathophysiology*, 16, 267-72.
- Lu, L., Bao, G., Chen, H., Xia, P., Fan, X., Zhang, J., Pei, G. y Ma, L. (2003). Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol*, 183, 600-9.
- Lucassen, P. J., Vollmann-Honsdorf, G. K., Gleisberg, M., Czeh, B., De Kloet, E. R. y Fuchs, E. (2001). Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *Eur J Neurosci*, 14, 161-6.
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R. y Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 10, 434-45.
- Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11, 173-89.
- Lynch, K. R. y Macdonald, T. L. (2002). Structure-activity relationships of lysophosphatidic acid analogs. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 289-94.
- Macleay, P. D. (1952). Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 4, 407-18.
- Maekawa, M., Namba, T., Suzuki, E., Yuasa, S., Kohsaka, S. y Uchino, S. (2009). NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production of mature granule neurons in the adult hippocampus. *Neurosci Res*, 63, 259-66.
- Magariños, A. M. y McEwen, B. S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience*, 69, 83-8.
- Magariños, A. M., McEwen, B. S., Flugge, G. y Fuchs, E. (1996). Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*, 16, 3534-40.
- Magariños, A. M., Verdugo, J. M. y McEwen, B. S. (1997). Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 14002-8.
- Majno, G. y Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146, 3-15.
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J. y Duman, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20, 9104-10.

- Mandyam, C. D., Harburg, G. C. y Eisch, A. J. (2007). Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. *Neuroscience*, 146, 108-22.
- Mandyam, C. D., Norris, R. D. y Eisch, A. J. (2004). Chronic morphine induces premature mitosis of proliferating cells in the adult mouse subgranular zone. *J Neurosci Res*, 76, 783-94.
- Mao, Y., Ge, X., Frank, C. L., Madison, J. M., Koehler, A. N., Doud, M. K., Tassa, C., Berry, E. M., Soda, T., Singh, K. K., Biechele, T., Petryshen, T. L., Moon, R. T., Haggarty, S. J. y Tsai, L. H. (2009). Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell*, 136, 1017-31.
- Marin, M. T., Cruz, F. C. y Planeta, C. S. (2007). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav*, 90, 29-35.
- Markwardt, S. y Overstreet-Wadiche, L. (2008). GABAergic signalling to adult-generated neurons. *J Physiol*, 586, 3745-9.
- Martin, S. J., de Hoz, L. y Morris, R. G. (2005). Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia*, 43, 609-24.
- Matas-Rico, E., García-Díaz, B., Llébreg-Zayas, P., López-Barroso, D., Santín, L., Pedraza, C., Smith-Fernández, A., Fernández-Llébreg, P., Téllez, T., Redondo, M., Chun, J., De Fonseca, F. R. y Estivill-Torrús, G. (2008). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci*, 39, 342-55.
- Matzel, L. D., Grossman, H., Light, K., Townsend, D. y Kolata, S. (2008). Age-related declines in general cognitive abilities of Balb/C mice are associated with disparities in working memory, body weight, and general activity. *Learn Mem*, 15, 733-46.
- Mazzucco, C. A., Lieblich, S. E., Bingham, B. I., Williamson, M. A., Viau, V. y Galea, L. A. (2006). Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Neuroscience*, 141, 1793-800.
- McLaughlin, K. J., Baran, S. E., Wright, R. L. y Conrad, C. D. (2005). Chronic stress enhances spatial memory in ovariectomized female rats despite CA3 dendritic retraction: possible involvement of CA1 neurons. *Neuroscience*, 135, 1045-54.
- McLean, I. W. y Nakane, P. K. (1974). Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 22, 1077-83.
- Meshi, D., Drew, M. R., Saxe, M., Ansorge, M. S., David, D., Santarelli, L., Malapani, C., Moore, H. y Hen, R. (2006). Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci*, 9, 729-31.
- Meyer zu Heringdorf, D. y Jakobs, K. H. (2007). Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 923-40.
- Miracle, A. D., Brace, M. F., Huyck, K. D., Singler, S. A. y Wellman, C. L. (2006). Chronic stress impairs recall of extinction of conditioned fear. *Neurobiol Learn Mem*, 85, 213-8.
- Miyagawa, H., Hasegawa, M., Fukuta, T., Amano, M., Yamada, K. y Nabeshima, T. (1998). Dissociation of impairment between spatial memory, and motor function and emotional behavior in aged rats. *Behav Brain Res*, 91, 73-81.
- Mizoguchi, K., Yuzurihara, M., Ishige, A., Sasaki, H., Chui, D. H. y Tabira, T. (2001). Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 443-59.
- Mizuno, M., Yamada, K., He, J., Nakajima, A. y Nabeshima, T. (2003). Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem*, 10, 108-15.
- Mohapel, P., Mundt-Petersen, K., Brundin, P. y Frielingsdorf, H. (2006). Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 142, 609-13.
- Moller, T., Contos, J. J., Musante, D. B., Chun, J. y Ransom, B. R. (2001). Expression and function of lysophosphatidic acid receptors in cultured rodent microglial cells. *J Biol Chem*, 276, 25946-52.

- Montaron, M. F., Drapeau, E., Dupret, D., Kitchener, P., Aourousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V. y Abrous, D. N. (2006). Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol Aging*, 27, 645-54.
- Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A. y Giepmans, B. N. (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*, 26, 870-81.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N. y O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-3.
- Moscovitch, M., Nadel, L., Winocur, G., Gilboa, A. y Rosenbaum, R. S. (2006). The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol*, 16, 179-90.
- Mullen, R. J., Buck, C. R. y Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116, 201-11.
- Murakami, S., Imbe, H., Morikawa, Y., Kubo, C. y Senba, E. (2005). Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res*, 53, 129-39.
- Murph, M. M., Nguyen, G. H., Radhakrishna, H. y Mills, G. B. (2008). Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: expression in cancer and mechanisms of regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1781, 547-57.
- Murray, F., Smith, D. W. y Hutson, P. H. (2008). Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol*, 583, 115-27.
- Nacher, J., Crespo, C. y McEwen, B. S. (2001). Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci*, 14, 629-44.
- Nacher, J., Rosell, D. R., Alonso-Llosa, G. y McEwen, B. S. (2001). NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 13, 512-20.
- Nacher, J., Varea, E., Miguel Blasco-Ibanez, J., Gomez-Climent, M. A., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., Martinez-Guijarro, F. J. y McEwen, B. S. (2007). N-methyl-d-aspartate receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus. *Neuroscience*, 144, 855-64.
- Nadel, L., O'Keefe, J. y Black, A. (1975). Slam on the brakes: a critique of Altman, Brunner, and Bayer's response-inhibition model of hippocampal function. *Behav Biol*, 14, 151-62.
- Nardicchi, V., Macchioni, L., Ferrini, M. y Goracci, G. (2007). The presence of a secretory phospholipase A2 in the nuclei of neuronal and glial cells of rat brain cortex. *Biochim Biophys Acta*, 1771, 1345-52.
- Noguchi, K., Herr, D., Mutoh, T. y Chun, J. (2009). Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 9, 15-23.
- Norman, R. M. y Malla, A. K. (1993). Stressful life events and schizophrenia. I: A review of the research. *Br J Psychiatry*, 162, 161-6.
- Oades, R. D. (1981). Type of memory or attention? Impairments after lesions of the hippocampus and limbic ventral tegmentum. *Brain Res Bull*, 7, 221-6.
- O'Connor, T. M., O'Halloran, D. J. y Shanahan, F. (2000). The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Qjm*, 93, 323-33.
- Ohl, F., Roedel, A., Binder, E. y Holsboer, F. (2003). Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Eur J Neurosci*, 17, 128-36.
- Ohl, F., Roedel, A., Storch, C., Holsboer, F. y Landgraf, R. (2002). Cognitive performance in rats differing in their inborn anxiety. *Behav Neurosci*, 116, 464-71.
- O'Keefe, J. y Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, 34, 171-5.
- O'Keefe, J. y Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Oxford University

- Press.
- Olson, A. K., Eadie, B. D., Ernst, C. y Christie, B. R. (2006). Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus*, 16, 250-60.
- Olton, D. S. y Papas, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17, 669-82.
- Oomen, C. A., Girardi, C. E., Cahyadi, R., Verbeek, E. C., Krugers, H., Joels, M. y Lucassen, P. J. (2009). Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PLoS One*, 4, e3675.
- Oomen, C. A., Mayer, J. L., de Kloet, E. R., Joels, M. y Lucassen, P. J. (2007). Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur J Neurosci*, 26, 3395-401.
- Overstreet Wadiche, L., Bromberg, D. A., Bensen, A. L. y Westbrook, G. L. (2005). GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J Neurophysiol*, 94, 4528-32.
- Overstreet-Wadiche, L. S. y Westbrook, G. L. (2006). Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus*, 16, 208-15.
- Pace, T. W. y Spencer, R. L. (2005). Disruption of mineralocorticoid receptor function increases corticosterone responding to a mild, but not moderate, psychological stressor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288, E1082-8.
- Packer, M. A., Stasiv, Y., Benraiss, A., Chmielnicki, E., Grinberg, A., Westphal, H., Goldman, S. A. y Enikolopov, G. (2003). Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9566-71.
- Palkovits, M., Baffi, J. S. y Pacak, K. (1999). The role of ascending neuronal pathways in stress-induced release of noradrenaline in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats. *J Neuroendocrinol*, 11, 529-39.
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R. y Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 425, 479-94.
- Papez, J. W. (1995). A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 7, 103-12.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A. y Sacktor, T. C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*, 313, 1141-4.
- Patterson, S. L., Grover, L. M., Schwartzkroin, P. A. y Bothwell, M. (1992). Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron*, 9, 1081-8.
- Paxinos, G. y Franklin, K. B. J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Peinado, M. A., Pedrosa, J. A. y Rodrigo, J. (1996). *Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Jaén: Publicaciones de la Universidad de Jaén.
- Peterson, D. A. (2002). Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr Opin Pharmacol*, 2, 34-42.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P. R. y McEwen, B. S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 17, 879-86.
- Phelps, E. A. (2004). Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 198-202.
- Pilpel, Y. y Segal, M. (2004). Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci*, 19, 3151-64.
- Pilpel, Y. y Segal, M. (2006). The role of LPA1 in formation of synapses among cultured hippocampal neurons. *J Neurochem*, 97, 1379-92.
- Pilquil, C., Singh, I., Zhang, Q., Ling, Z., Buri, K., Stromberg, L. M., Dewald, J. y Brindley, D. N. (2001). Lipid phosphate phosphatase-1 dephosphorylates exogenous lysophosphatidate and

- thereby attenuates its effects on cell signalling. *Prostaglandins*, 64, 83-92.
- Pittenger, C. y Duman, R. S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33, 88-109.
- Ploner, C. J., Gaymard, B. M., Rivaud-Pechoux, S., Baulac, M., Clemenceau, S., Samson, S. y Pierrot-Deseilligny, C. (2000). Lesions affecting the parahippocampal cortex yield spatial memory deficits in humans. *Cereb Cortex*, 10, 1211-6.
- Plumpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Romer, B., Rodriguez, G. R., Kronenberg, G. y Kempermann, G. (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci*, 7, 77.
- Pravosudov, V. V. y Omanska, A. (2005). Prolonged moderate elevation of corticosterone does not affect hippocampal anatomy or cell proliferation rates in mountain chickadees (*Poecile gambeli*). *J Neurobiol*, 62, 82-91.
- Pyne, S., Kong, K. C. y Darroch, P. I. (2004). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Semin Cell Dev Biol*, 15, 491-501.
- Radley, J. J. y Jacobs, B. L. (2002). 5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res*, 955, 264-7.
- Rakic, P. (2002). Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci*, 22, 614-8.
- Rakic, P. (2002). Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci*, 3, 65-71.
- Ramón y Cajal, S. (1893). Estructura del asta de Ammón y fascia dentata. *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural*, tomo XXII.
- Ramos, A. y Mormede, P. (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev*, 22, 33-57.
- Ramos, B. P. y Arnsten, A. F. (2007). Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther*, 113, 523-36.
- Ramos, J. M. (2009). Remote spatial memory and the hippocampus: effect of early and extensive training in the radial maze. *Learn Mem*, 16, 554-63.
- Rao, M. S. y Shetty, A. K. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 19, 234-46.
- Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A. y Lesch, K. P. (2006). Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry*, 11, 514-22.
- Reif, A., Schmitt, A., Fritzen, S. y Lesch, K. P. (2007). Neurogenesis and schizophrenia: dividing neurons in a divided mind? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 257, 290-9.
- Renback, K., Inoue, M., Yoshida, A., Nyberg, F. y Ueda, H. (2000). Vzg-1/lysophosphatidic acid-receptor involved in peripheral pain transmission. *Brain Res Mol Brain Res*, 75, 350-4.
- Reul, J. M. y de Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117, 2505-11.
- Revest, J. M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P. V. y Abrous, D. N. (2009). Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry*, 14, 959-67.
- Rhee, H. J., Nam, J. S., Sun, Y., Kim, M. J., Choi, H. K., Han, D. H., Kim, N. H. y Huh, S. O. (2006). Lysophosphatidic acid stimulates cAMP accumulation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in immortalized hippocampal progenitor cells. *Neuroreport*, 17, 523-6.
- Rhee, K., Reisman, D., Bresnahan, W. y Thompson, E. A. (1995). Glucocorticoid regulation of G1 cyclin-dependent kinase genes in lymphoid cells. *Cell Growth Differ*, 6, 691-8.
- Ribeiro, R. L., Andreatini, R., Wolfman, C., Viola, H., Medina, J. H. y Da Cunha, C. (1999). The "anxiety state" and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiol Learn Mem*,

- 72, 78-94.
- Richter-Levin, G. y Akirav, I. (2000). Amygdala-hippocampus dynamic interaction in relation to memory. *Mol Neurobiol*, 22, 11-20.
- Rietze, R., Poulin, P. y Weiss, S. (2000). Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. *J Comp Neurol*, 424, 397-408.
- Roberts, C., Winter, P., Shilliam, C. S., Hughes, Z. A., Langmead, C., Maycox, P. R. y Dawson, L. A. (2005). Neurochemical changes in LPA1 receptor deficient mice--a putative model of schizophrenia. *Neurochem Res*, 30, 371-7.
- Robertson, G. S., Hori, S. E. y Powell, K. J. (2006). Schizophrenia: an integrative approach to modelling a complex disorder. *J Psychiatry Neurosci*, 31, 157-67.
- Roosendaal, B. (2000). 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 25, 213-38.
- Roosendaal, B., Okuda, S., de Quervain, D. J. y McGaugh, J. L. (2006). Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience*, 138, 901-10.
- Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., Fabbri, M. E., Tessarollo, L., Maffei, L., Berardi, N. y Caleo, M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 24, 1850-6.
- Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castren, M. y Castren, E. (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, 25, 1089-94.
- Sandi, C., Loscertales, M. y Guaza, C. (1997). Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci*, 9, 637-42.
- Sandi, C., Venero, C. y Cordero, M. I. (2001). Psicobiología de la memoria. En C. Sandi, C. Venero y M. I. Cordero. *Estrés, memoria y trastornos asociados. Implicaciones en el daño cerebral y en el envejecimiento*. Barcelona: Ariel Neurociencia (págs. 75-124).
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C. y Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301, 805-9.
- Santín, L. J., Bilbao, A., Pedraza, C., Matas-Rico, E., López-Barroso, D., Castilla-Ortega, E., Sánchez-López, J., Riquelme, R., Varela-Nieto, I., de la Villa, P., Suardíaz, M., Chun, J., De Fonseca, F. R. y Estivill-Torrús, G. (2009). Behavioral phenotype of maLPA1-null mice: increased anxiety-like behavior and spatial memory deficits. *Genes Brain Behav*, 8, 772-84.
- Sato, K., Malchinkhuu, E., Muraki, T., Ishikawa, K., Hayashi, K., Tosaka, M., Mochiduki, A., Inoue, K., Tomura, H., Mogi, C., Nochi, H., Tamoto, K. y Okajima, F. (2005). Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources. *J Neurochem*, 92, 904-14.
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J. W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., Santarelli, L., Hen, R. y Drew, M. R. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 17501-6.
- Saxe, M. D., Malleret, G., Vronskaya, S., Mendez, I., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R. y Hen, R. (2007). Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 4642-6.
- Schaaf, M. J., De Kloet, E. R. y Vreugdenhil, E. (2000). Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress*, 3, 201-8.
- Schanzer, A., Wachs, F. P., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., Winkler, J., Aigner, L., Plate, K. H. y Kuhn, H. G. (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol*, 14, 237-48.
- Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C. y Croll, S. (2005). Increased

- neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol*, 192, 348-56.
- Schloesser, R. J., Manji, H. K. y Martinowich, K. (2009). Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. *Neuroreport*, 20, 553-7.
- Schweizer, M. C., Henniger, M. S. y Sillaber, I. (2009). Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoS One*, 4, e4326.
- Scoville, W. B. y Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20, 11-21.
- Seki, T. y Arai, Y. (1995). Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport*, 6, 2479-82.
- Selemon, L. D. y Goldman-Rakic, P. S. (1999). The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 45, 17-25.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138, 32.
- Sengupta, S., Wang, Z., Tipps, R. y Xu, Y. (2004). Biology of LPA in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*, 15, 503-12.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S. y Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 478, 359-78.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S. y Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, 21, 7153-60.
- Shah, B. H. y Catt, K. J. (2005). Roles of LPA3 and COX-2 in implantation. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 397-9.
- Shano, S., Moriyama, R., Chun, J. y Fukushima, N. (2008). Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. *Neurochem Int*, 52, 216-20.
- Shansky, R. M., Hamo, C., Hof, P. R., McEwen, B. S. y Morrison, J. H. (2009). Stress-induced dendritic remodeling in the prefrontal cortex is circuit specific. *Cereb Cortex*, 19, 2479-84.
- Shekhar, A., Truitt, W., Rainnie, D. y Sajdyk, T. (2005). Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress*, 8, 209-19.
- Shen, Z., Belinson, J., Morton, R. E., Xu, Y. y Xu, Y. (1998). Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulates lysophosphatidic acid secretion from ovarian and cervical cancer cells but not from breast or leukemia cells. *Gynecol Oncol*, 71, 364-8.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. y Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12, 578-84.
- Simon, P., Dupuis, R. y Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res*, 61, 59-64.
- Smith, M. A., Makino, S., Kvetnansky, R. y Post, R. M. (1995). Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*, 15, 1768-77.
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J. y Wojtowicz, J. M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130, 843-52.
- Snyder, J. S., Kee, N. y Wojtowicz, J. M. (2001). Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*, 85, 2423-31.
- Song, H., Stevens, C. F. y Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417, 39-44.
- Song, H. J., Stevens, C. F. y Gage, F. H. (2002). Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci*, 5, 438-45.
- Sousa, N., Madeira, M. D. y Paula-Barbosa, M. M. (1998). Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study. *Brain Res*, 794, 199-210.

- Spohr, T. C., Choi, J. W., Gardell, S. E., Herr, D. R., Rehen, S. K., Gomes, F. C. y Chun, J. (2008). Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *J Biol Chem*, 283, 7470-9.
- Squire, L. R. y Zola-Morgan, S. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13515-22.
- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M. D., Reuter, K. y Kempermann, G. (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*, 46, 41-52.
- Strekalova, T., Spanagel, R., Dolgov, O. y Bartsch, D. (2005). Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice. *Behav Pharmacol*, 16, 171-80.
- Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y. y Tokumura, A. (2002). Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *J Lipid Res*, 43, 2049-55.
- Tabuchi, S., Kume, K., Aihara, M. y Shimizu, T. (2000). Expression of lysophosphatidic acid receptor in rat astrocytes: mitogenic effect and expression of neurotrophic genes. *Neurochem Res*, 25, 573-82.
- Takeda, H., Tsuji, M. y Matsumiya, T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol*, 350, 21-9.
- Tanaka, M., Okudaira, S., Kishi, Y., Ohkawa, R., Iseki, S., Ota, M., Noji, S., Yatomi, Y., Aoki, J. y Arai, H. (2006). Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 281, 25822-30.
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J. y Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, 19, 5792-801.
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Rydel, T. A., Galea, L. A. y Gould, E. (2001). Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol*, 437, 496-504.
- Tashiro, A., Makino, H. y Gage, F. H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci*, 27, 3252-9.
- Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev*, 53, 198-214.
- Taupin, P. y Gage, F. H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*, 69, 745-9.
- Tham, C. S., Lin, F. F., Rao, T. S., Yu, N. y Webb, M. (2003). Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression. *Int J Dev Neurosci*, 21, 431-43.
- Thiel, C. M., Muller, C. P., Huston, J. P. y Schwarting, R. K. (1999). High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93, 243-51.
- Thomas, R. M., Hotsenpiller, G. y Peterson, D. A. (2007). Acute psychosocial stress reduces cell survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation. *J Neurosci*, 27, 2734-43.
- Thompson, R. F. y Kim, J. J. (1996). Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13438-44.
- Tigyi, G. y Parrill, A. L. (2003). Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Prog Lipid Res*, 42, 498-526.
- Tokumura, A. (2004). Metabolic pathways and physiological and pathological significances of lysolipid phosphate mediators. *J Cell Biochem*, 92, 869-81.
- Tokumura, A., Miyake, M., Nishioka, Y., Yamano, S., Aono, T. y Fukuzawa, K. (1999). Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biol Reprod*, 61, 195-9.
- Tops, M., Riese, H., Oldehinkel, A. J., Rijdsdijk, F. V. y Ormel, J. (2008). Rejection sensitivity relates

- to hypocortisolism and depressed mood state in young women. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 551-9.
- Torner, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, H. G., Winkler, J., Aigner, L. y Neumann, I. D. (2009). Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J Neurosci*, 29, 1826-33.
- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T. y Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47, 803-15.
- Trejo, J. L., Carro, E. y Torres-Aleman, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 21, 1628-34.
- Trejo, J. L., Llorens-Martin, M. V. y Torres-Aleman, I. (2008). The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*, 37, 402-11.
- Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Oliet, S. H., Gage, F. H. y Abrous, D. N. (2010). Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 7963-8.
- Tsuda, S., Okudaira, S., Moriya-Ito, K., Shimamoto, C., Tanaka, M., Aoki, J., Arai, H., Murakami-Murofushi, K. y Kobayashi, T. (2006). Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. *J Biol Chem*, 281, 26081-8.
- Tsuji, M., Takeda, H. y Matsumiya, T. (2000). Different effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naive and stressed mice: a study using the hole-board test. *Psychopharmacology (Berl)*, 152, 157-66.
- Tyler, W. J., Alonso, M., Bramham, C. R. y Pozzo-Miller, L. D. (2002). From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem*, 9, 224-37.
- Ueda, S., Sakakibara, S. y Yoshimoto, K. (2005). Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning. *Neuroscience*, 135, 395-402.
- Ulrich-Lai, Y. M. y Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, 10, 397-409.
- Urs, N. M., Kowalczyk, A. P. y Radhakrishna, H. (2008). Different mechanisms regulate lysophosphatidic acid (LPA)-dependent versus phorbol ester-dependent internalization of the LPA₁ receptor. *J Biol Chem*, 283, 5249-57.
- Vaher, P. R., Luine, V. N., Gould, E. y McEwen, B. S. (1994). Effects of adrenalectomy on spatial memory performance and dentate gyrus morphology. *Brain Res*, 656, 71-8.
- van Corven, E. J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. y Moolenaar, W. H. (1989). Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*, 59, 45-54.
- Van de Kar, L. D., Piechowski, R. A., Rittenhouse, P. A. y Gray, T. S. (1991). Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology*, 54, 89-95.
- van den Buuse, M. (2010). Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: pharmacology and methodology aspects. *Schizophr Bull*, 36, 246-70.
- Van der Borght, K., Havekes, R., Bos, T., Eggen, B. J. y Van der Zee, E. A. (2007). Exercise improves memory acquisition and retrieval in the Y-maze task: relationship with hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci*, 121, 324-34.
- van Haren, N. E., Hulshoff Pol, H. E., Schnack, H. G., Cahn, W., Brans, R., Carati, I., Rais, M. y Kahn, R. S. (2008). Progressive brain volume loss in schizophrenia over the course of the illness: evidence of maturational abnormalities in early adulthood. *Biol Psychiatry*, 63, 106-13.
- van Praag, H., Kempermann, G. y Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*, 1, 191-8.

- van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D. y Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415, 1030-4.
- Vanderwolf, C. H. (2001). The hippocampus as an olfacto-motor mechanism: were the classical anatomists right after all? *Behav Brain Res*, 127, 25-47.
- Vizi, E. S. y Kiss, J. P. (1998). Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*, 8, 566-607.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B. S. y Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*, 22, 6810-8.
- Waddell, J. y Shors, T. J. (2008). Neurogenesis, learning and associative strength. *Eur J Neurosci*, 27, 3020-8.
- Walther, C. (2002). Hippocampal terminology: concepts, misconceptions, origins. *Endeavour*, 26, 41-4.
- Wang, S., Scott, B. W. y Wojtowicz, J. M. (2000). Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol*, 42, 248-57.
- Weiner, J. A. y Chun, J. (1999). Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5233-8.
- Weiner, J. A., Hecht, J. H. y Chun, J. (1998). Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/lpA1/edg-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *J Comp Neurol*, 398, 587-98.
- West, M. J. (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*, 14, 275-85.
- Winocur, G., Wojtowicz, J. M., Sekeres, M., Snyder, J. S. y Wang, S. (2006). Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*, 16, 296-304.
- Witter, M. P. (1993). Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus*, 3 Spec No, 33-44.
- Woelk, H., Rubly, N., Arienti, G., Gaiti, A. y Porcellati, G. (1981). Occurrence and properties of phospholipases A1 of plasma membranes prepared from neuronal- and glial-enriched fractions of the rabbit cerebral cortex. *J Neurochem*, 36, 875-80.
- Wolf, O. T. (2008). The influence of stress hormones on emotional memory: relevance for psychopathology. *Acta Psychol (Amst)*, 127, 513-31.
- Wong, E. Y. y Herbert, J. (2004). The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus. *Eur J Neurosci*, 20, 2491-8.
- Wong, E. Y. y Herbert, J. (2005). Roles of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the regulation of progenitor proliferation in the adult hippocampus. *Eur J Neurosci*, 22, 785-92.
- Wong, E. Y. y Herbert, J. (2006). Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience*, 137, 83-92.
- Woolley, C. S., Gould, E. y McEwen, B. S. (1990). Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res*, 531, 225-31.
- Wright, R. L., Lightner, E. N., Harman, J. S., Meijer, O. C. y Conrad, C. D. (2006). Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *Eur J Neurosci*, 24, 595-605.
- Wurbel, H. (2007). Environmental enrichment does not disrupt standardisation of animal experiments. *Altex*, 24 Spec No, 70-3.
- Yan, H., Lu, D. y Rivkees, S. A. (2003). Lysophosphatidic acid regulates the proliferation and migration of olfactory ensheathing cells in vitro. *Glia*, 44, 26-36.
- Yanagida, K., Masago, K., Nakanishi, H., Kihara, Y., Hamano, F., Tajima, Y., Taguchi, R., Shimizu, T. y Ishii, S. (2009). Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem*, 284, 17731-41.
- Ye, X. (2008). Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the reproductive system.

- Hum Reprod Update*, 14, 519-36.
- Ye, X., Hama, K., Contos, J. J., Anliker, B., Inoue, A., Skinner, M. K., Suzuki, H., Amano, T., Kennedy, G., Arai, H., Aoki, J. y Chun, J. (2005). LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*, 435, 104-8.
- Ye, X., Ishii, I., Kingsbury, M. A. y Chun, J. (2002). Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim Biophys Acta*, 1585, 108-13.
- Yoon, T., Okada, J., Jung, M. W. y Kim, J. J. (2008). Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learn Mem*, 15, 97-105.
- Yoshida, K., Nishida, W., Hayashi, K., Ohkawa, Y., Ogawa, A., Aoki, J., Arai, H. y Sobue, K. (2003). Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation*, 108, 1746-52.
- Yu, S., Patchev, A. V., Wu, Y., Lu, J., Holsboer, F., Zhang, J. Z., Sousa, N. y Almeida, O. F. (2010). Depletion of the neural precursor cell pool by glucocorticoids. *Ann Neurol*, 67, 21-30.
- Yun, J., Koike, H., Ibi, D., Toth, E., Mizoguchi, H., Nitta, A., Yoneyama, M., Ogita, K., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Nagai, T. y Yamada, K. (2010). Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: Possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J Neurochem*,
- Zaborszky, L. (1982). Afferent connections of the medial basal hypothalamus. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 69, 1-107.
- Zalutskaya, A. A., Arai, M., Bounoutas, G. S. y Abou-Samra, A. B. (2007). Impaired adaptation to repeated restraint and decreased response to cold in urocortin 1 knockout mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E259-63.
- Zhao, C., Deng, W. y Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132, 645-60.
- Zhe, D., Fang, H. y Yuxiu, S. (2008). Expressions of hippocampal mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in the single-prolonged stress-rats. *Acta Histochem Cytochem*, 41, 89-95.

Índice de abreviaturas

5-HT: Serotonina (5-hidroxitriptamina)

A: Adrenalina

ACP: Análisis de Componentes Principales

AVP: Arginina vasopresina

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor*)

BrdU: Bromodeoxiuridina; 5 - bromo - 2'-deoxiuridina

CA1: Cuerno de Amón 1

CA2: Cuerno de Amón 2

CA3: Cuerno de Amón 3

DAB: Tetrahidrocloreuro de 3,3' diaminobenzindina

DA: Dopamina

DCX: Doblecortina (*Doublecortin X-linked gene*)

DISC1: Gen *Disrupted in Schizophrenia 1*

DLP: Depresión a largo plazo

EDG: Gen de diferenciación endotelial (*Endothelial Differentiation Gene*)

GABA: Ácido γ aminobutírico (*Gamma Aminobutiric Acid*)

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida (*Gliar Fibrillary Acidic Protein*)

GR: Receptor de glucocorticoides (*Glucocorticoid Receptor*)

HHA: Hipotálamo Hipofisario Adrenal (eje)

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insuline-like Growth Factor-1*)

LPA: Ácido lisofosfatídico (*Lysophosphatidic Acid*)

LPA_n: Receptor n de ácido lisofosfatídico

MR: Receptor de mineralocorticoides (*Mineralocorticoid Receptor*)

NA: Noradrenalina

NeuN: Proteína nuclear específica neuronal (*Neuronal Nuclei*)

NGF: Factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*)

NPV: Núcleo paraventricular (del hipotálamo)

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

pH3: Histona H3 fosforilada (*Phosphorilated histone H3*)

PLP: Potenciación a largo plazo

PLP (fijador): Solución fijadora de paraformaldehído, lisina y peryodato sódico

PSA-NCAM: Proteína de adhesión celular neuronal en forma polisializada (*Polysialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule*)

SEM: Error típico de la media (*Standard Error of the Mean*)

TPBS: Tampón Tris-PBS

Tris: Hidroximetil aminometano

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial (*Vascular Endotelial Growth Factor*)

ZSG: Zona subgranular (del hipocampo)

ZSV: Zona subventricular (del ventrículo lateral)

Unidades de medida

cm: centímetro

h: hora

M: molar

ml: mililitro

min: minuto

mm: milímetro

μ l: microlitro

μ m: micrometro

s: segundo

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento hacia todas las personas que han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

A mi Director, el Dr. Luis J Santín, le agradezco la dedicación que ha prestado a este trabajo, lo mucho que me ha enseñado y su apoyo desde el comienzo de mi formación investigadora.

A mi Codirector, el Dr. Guillermo Estivill, y a la Dra. Carmen Pedraza quiero agradecerles la valiosa ayuda y consejo que me han prestado en todo momento.

Al Dr. José Cimadevilla le agradezco su colaboración durante el tiempo que estudié en la Universidad de Almería, al Dr. José Ángel Aguirre el acceso al equipo estereológico y a la Dra. María García su ayuda en la realización del radioinmunoensayo.

A mis compañeros del grupo de Neuropsicofarmacología de los Transmisores Lipídicos, del Departamento de Psicobiología y Metodología de las CC del Comportamiento, de la Unidad de Microscopía de la Fundación IMABIS, de los Departamentos de Fisiología y Farmacología, a los miembros del grupo de investigación del Dr. Zafaruddin Khan y al personal del Centro de Experimentación Animal, les agradezco su gran apoyo y los buenos momentos que hemos compartido mientras realizaba este trabajo.

A mi familia, no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho y hacen por mí, gracias por todo.

