



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR

Implicación de las células gliales de microglía y astrogliá en los procesos de aprendizaje y memoria de reconocimiento de objetos

Memoria para optar al grado de doctor bajo el programa de Neurociencias

PRESENTADA POR

Francisco Javier Aguilar Montilla

DIRIGIDA POR

Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez

Sevilla, 2017

Universidad Pablo de Olavide
Facultad de Ciencias Experimentales
Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología celular



Yo, Ángel Manuel Carrión Rodríguez, declaro que la presente Tesis Doctoral titulada “Implicación de las células gliales de microglía y astroglia en los procesos de aprendizaje y memoria de reconocimiento de objetos” ha sido llevada a cabo por FRANCISCO JAVIER AGUILAR MONTILLA bajo mi dirección. Además, considero que este trabajo de investigación reúne las condiciones necesarias para su depósito, presentación oral y defensa en la Universidad Pablo de Olavide.

En Sevilla, a 18 de mayo de 2017

Fdo.: Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez
Director de la Tesis

Fdo.: Fco. Javier Aguilar Montilla
Autor de la Tesis

RESUMEN

Cambios de eficiencia sináptica y síntesis de nuevas moléculas en las neuronas constituyen la base para explicar la conversión de una memoria lábil en una memoria duradera durante un proceso conocido como consolidación. Esta memoria duradera puede recuperar su estado lábil si es reactivada y posteriormente recobrar su persistencia en un proceso denominado reconsolidación. De esta manera, una memoria previamente consolidada puede ser reforzada o incluso actualizada con nueva información, según sea reactivada en ausencia o en presencia de novedad respectivamente. Tradicionalmente, los estudios sobre aprendizaje y memoria han sido diseñados para desentrañar el papel neuronal en estos procesos. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado la participación de células gliales en funciones hasta hace poco desconocidas. Por ello, nuestro objetivo en este trabajo es estudiar la posible implicación de las células gliales, especialmente microglía y astrogía, en los procesos de adquisición, consolidación y reconsolidación de la memoria.

Las células microgliales son muy activas, capaces de responder a cambios en el espacio extracelular. Usando sistémicamente minociclina, un inhibidor de la activación microglial, demostramos que la microglía no es necesaria para la adquisición de nueva información ni para el refuerzo de memorias ya almacenadas de reconocimiento de objetos (RO). Sin embargo, la consolidación de nueva información adquirida, así como la actualización de memorias de RO previamente almacenadas, requieren de la activación microglial. Estos resultados correlacionan con un aumento en el tamaño celular de la población microglial, marcada con EGR-1 en el hipocampo, tras sesiones de entrenamiento y reactivación con novedad de RO. Tales cambios de área no suceden cuando administramos minociclina justo después de las sesiones mencionadas anteriormente. Además, demostramos que la activación de la microglía es requerida para la adecuada expresión de c-Fos en el hipocampo, un trazador de cambio de actividad neuronal, tras el entrenamiento y la reactivación con novedad de RO. Todo ello, sugiere que la microglía, a través de la regulación de la actividad neuronal, participa en el almacenamiento duradero de nueva información como nueva memoria o recuerdo actualizado. Por último, la administración junto con minociclina de D-serina, un transmisor ligado a la actividad de los astrocitos que actúa como coagonista del receptor NMDA, revierte las alteraciones cognitivas y las modificaciones en la activación neuronal provocadas por la inhibición de la activación microglial. Es interesante remarcar que la D-serina no recupera el incremento de tamaño que se produce en las células microgliales EGR-1+ en los procesos de incorporación de nueva información. Estos datos apuntan a que la acción que ejerce la D-serina exógena, simula un paso posterior a la activación de la microglía durante la formación y actualización de la memoria.

Nuestros resultados sugieren que la microglía, la astrogía y las neuronas cooperan en el almacenamiento de nueva información de RO. En ese sentido, la activación microglial precedería a la liberación de D-serina por los astrocitos, que regularía el cambio de

actividad neuronal en el hipocampo a través de los receptores NMDA. Estos resultados relacionan a la glía (microglía y astrocitos) con los procesos cognitivos que dependen del hipocampo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	11
<hr/>	
I. 1 Bases celulares y moleculares del aprendizaje y la memoria	13
I. 1.1 Aprendizaje y memoria: definición, clasificación y fases del procesamiento de la información	13
I. 1.2 Bases fisiológicas del aprendizaje y la memoria	14
I. 1.2.1 LTP, un modelo de plasticidad sináptica	15
I. 1.3 La formación hipocampal	17
I. 1.4 Paradigma comportamental que depende del hipocampo: el reconocimiento de objetos	18
I. 2 Las células gliales. Microglía y astrocitos	20
I. 2.1 Microglía	21
I. 2.1.1 Funciones de las células microgliales	23
I. 2.1.1.1 <i>Protección inmunitaria del sistema nervioso central</i>	23
I. 2.1.1.2 <i>Sensores de cambios extracelulares y de la actividad neuronal</i>	23
I. 2.1.1.3 <i>Desarrollo y mantenimiento del circuito neuronal</i>	24
I. 2.1.2 Microglía, comportamiento y memoria	25
I. 2.1.3 Uso de marcadores microgliales	27
I. 2.1.4 Técnicas de eliminación o disfunción de la microglía	28
I. 2.1.4.1 <i>Modelos de eliminación de genes</i>	28
I. 2.1.4.2 <i>Modelos de eliminación génica condicional</i>	28
I. 2.1.4.3 <i>Tratamiento farmacológico</i>	29
I. 2.2 Astroglía	31
I. 2.2.1 Funciones astrogliales	32
I. 2.2.1.1 <i>Señales intracelulares de Ca²⁺. Diversidad y funciones asociadas</i>	32
I. 2.2.1.2 <i>Protección frente al estrés oxidativo y respuesta astrogliar ante una lesión</i>	34
I. 2.2.1.3 <i>SopORTE energético y regulación del nivel de K⁺ extracelular</i>	35
I. 2.2.1.4 <i>Recaptación y liberación de sustancias neuroactivas</i>	37
I. 2.2.1.4.1 <i>Vías de liberación de gliotransmisores</i>	39
I. 2.2.2 Astroglía, comportamiento y memoria	41
I. 2.2.3 Astroglía y D-serina	43
I. 2.2.4 Marcaje de astrocitos	45
II. OBJETIVOS	47
<hr/>	
III. MATERIALES Y MÉTODOS	51
<hr/>	
III. 1 Sujetos experimentales	53

III. 2 Administración de sustancias	53
III. 2.1 Implantación de cánulas	54
III. 3 Paradigma de comportamiento cognitivo	54
III. 3.1 Reconocimiento de objetos	54
III. 3.1.1 Listado de experimentos conductuales de reconocimiento de objetos	56
III. 4 Estudio de los cambios bioquímicos en el hipocampo tras una tarea conductual de exploración de objetos	57
III. 5 Sacrificio de animales y extracción del encéfalo	59
III. 6 Cuantificación relativa de la expresión génica	59
III. 6.1 Extracción de ARN	59
III. 6.2 Cuantificación de ARN	60
III. 6.3 Retrotranscripción	60
III. 6.4 Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa	60
III. 6.5 Electroforesis de ADN	61
III. 6.6 Cuantificación relativa de ADN	62
III. 7 Histología	62
III. 7.1 Tinción de Nissl	62
III. 7.2 Inmunohistoquímica	63
III. 7.3 Inmunofluorescencia	64
III. 7.4 Captura y análisis de imagen	65
III. 8 Análisis estadístico	66
IV. RESULTADOS	67
<hr/>	
IV. 1 Estudio de los cambios de la microglía en el hipocampo tras la exploración de nueva información	69
IV. 1.1 Análisis de la expresión génica en el hipocampo del marcador microglial <i>iba1</i> a diferentes tiempos tras la exposición a un ambiente rico	69
IV. 1.2 Análisis del área de células microgliales en el hipocampo tras la exposición a un ambiente rico en presencia y ausencia de minociclina	70
IV. 2 Papel de la microglía en la adquisición y formación de la memoria duradera de reconocimiento de objetos	72
IV. 2.1 Análisis de la adquisición y formación de la memoria duradera tras la administración sistémica de minociclina justo después de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos	72
IV. 2.2 Determinación de la demanda temporal de la actividad microglial en la formación de la memoria duradera de reconocimiento de objetos	73
IV. 2.3 Análisis de la adquisición y formación de la memoria duradera tras la administración intrahipocampal de minociclina justo después de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos	74

IV. 3 Papel de la microglía en la reconsolidación de memorias de reconocimiento de objetos	75
IV. 3.1 Análisis de la reconsolidación de la memoria tras la administración sistémica de minociclina justo después de la sesión de reactivación sin novedad de reconocimiento de objetos	75
IV. 3.2 Análisis de la reconsolidación de la memoria tras la administración sistémica de minociclina justo después de la sesión de reactivación con novedad de reconocimiento de objetos	77
IV. 4 Efecto de la minociclina sobre la activación neuronal en el hipocampo durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	79
IV. 4.1 Efecto de la administración sistémica de minociclina sobre la expresión de c-Fos durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	79
IV. 5 Efecto de la minociclina sobre la activación neuronal y el área microglial en el hipocampo durante la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	81
IV. 5.1 Efecto de la administración sistémica de minociclina sobre la expresión de c-Fos durante la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	81
IV. 5.2 Efecto de la administración sistémica de minociclina sobre el área de células microgliales durante la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	83
IV. 6 Estudio de los cambios de la astrogliía en el hipocampo tras la exploración de nueva información	84
IV. 6.1 Análisis de la expresión génica en el hipocampo de diferentes marcadores astrogliales a distintos tiempos tras la exposición a un ambiente rico	84
IV. 6.2 Análisis del área de astrocitos en el hipocampo tras la exposición a un ambiente rico	85
IV. 7 Acción de la D-serina sobre el efecto negativo de la minociclina en la formación y la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	87
IV. 7.1 Análisis de la formación de la memoria duradera tras la coadministración sistémica de D-serina y minociclina justo después de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos	87
IV. 7.2 Determinación del requerimiento temporal para que la D-serina revierta el efecto negativo de la minociclina sobre la formación de la memoria duradera de reconocimiento de objetos	88
IV. 7.3 Análisis de la reconsolidación de la memoria tras la coadministración sistémica de D-serina y minociclina justo después de la sesión de reactivación con novedad de reconocimiento de objetos	89

IV. 8 Efecto de la coadministración de D-serina y minociclina sobre la activación neuronal y el área microglial en el hipocampo durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	91
IV. 8.1 Efecto de la coadministración sistémica de D-serina y minociclina sobre la expresión de c-Fos durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	91
IV. 8.2 Efecto de la coadministración sistémica de D-serina y minociclina sobre el área de células microgliales durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	93
IV. 9 Efecto de la coadministración de D-serina y minociclina sobre la activación neuronal y el área microglial en el hipocampo durante la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	95
IV. 9.1 Efecto de la coadministración sistémica de D-serina y minociclina sobre la expresión de c-Fos en la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	95
IV. 9.2 Efecto de la coadministración sistémica de D-serina y minociclina sobre el área de células microgliales durante la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos	97
V. DISCUSIÓN	101
<hr/>	
V. 1 Activación de la microglía en respuesta a una tarea cognitiva	104
V. 2 La microglía participa en la formación de la memoria duradera de reconocimiento de objetos	105
V. 3 La microglía participa en la modificación de memorias de reconocimiento de objetos previamente almacenadas	106
V. 4 La activación microglial modula la actividad neuronal del hipocampo durante la formación y la actualización de memorias duraderas de reconocimiento de objetos	108
V. 5 Los astrocitos como posibles intermediarios de la comunicación microglía-neuronas implicada en la formación y la actualización de memorias duraderas de reconocimiento de objetos	110
VI. CONCLUSIONES	117
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	121
<hr/>	

I. INTRODUCCIÓN

Entender cómo y por qué los animales se comportan de la manera en la que lo hacen sigue siendo un reto fascinante. El comportamiento es el resultado de procesos evolutivos, que en ocasiones mediante codificación genética crea instrucciones comportamentales innatas y otras veces, elabora mecanismos flexibles que permite a los animales responder a los desafíos ambientales que se les presentan. A esta última estrategia, pertenecen los procesos de aprendizaje y memoria, que modifican la conducta del animal en base a su experiencia. Aunque se han realizado avances importantes, los mecanismos celulares y moleculares que permiten el almacenamiento de la información continúan siendo objeto de gran interés. Hasta ahora, la mayor parte de los estudios consideran a las neuronas como las únicas células involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria. Sin embargo, el creciente protagonismo que ha ganado el estudio de la glía nos abre una nueva vía por explorar. ¿Tendrán estas células alguna implicación en los procesos de aprendizaje y memoria?

I. 1 BASES CELULARES Y MOLECULARES DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

I. 1.1 Aprendizaje y memoria: definición, clasificación y fases del procesamiento de la información

El aprendizaje es el proceso biológico que permite adquirir conocimiento sobre el mundo, y la memoria es el proceso de retener y reconstruir este conocimiento en el tiempo (Kandel et al., 2014). Son por tanto dos conceptos estrechamente ligados, ya que un aprendizaje es evaluado en función del recuerdo, y una memoria no puede ser construida sin un previo aprendizaje.

La memoria se clasifica en dos grandes categorías, la memoria explícita y la memoria implícita (Scoville y Milner, 1957; Penfield y Milner, 1958; Squire, 1992; Morgado, 2005). La memoria explícita hace referencia a los conocimientos sobre hechos (memoria semántica), eventos (memoria episódica), lugares, sujetos y objetos, mientras que la memoria implícita o de procedimiento, la conforman habilidades motoras y perceptivas. En la primera están implicadas principalmente la formación hipocámpal y la corteza adyacente (Milner et al., 1998; Kandel, 2001), y su recuerdo en humanos supone un proceso consciente. En cambio, en la memoria implícita predomina la participación de otras áreas cerebrales, como el cerebelo, el estriado y la amígdala, y la evocación del recuerdo no supone un proceso consciente. Otro elemento importante que diferencia a ambas categorías es que la memoria explícita requiere de la atención del sujeto para una correcta codificación de la información y posterior recuerdo (Kandel et al., 2014).

En el procesamiento de la información son reconocidas distintas fases: adquisición, consolidación, reactivación, reconsolidación, extinción, recuerdo y olvido (Kandel, 2001; Morgado, 2005). La adquisición, codificación o registro, consiste en la recepción, procesamiento y combinación de la información recibida. Es el paso inicial para la formación de la memoria a corto plazo (MCP), almacén transitorio (segundos a horas)

de los estímulos que acaban de ser percibidos. Es una memoria lábil, muy vulnerable ante las interferencias, que se desvanece si no se produce su consolidación.

La consolidación (acuñado por Müller y Pilzecker, 1900) es el proceso de conversión de una memoria lábil (MCP) en una memoria duradera (días a años), conocida como memoria a largo plazo (MLP). La MLP es una memoria estable que ofrece resistencia a los agentes que interfieren con la MCP (McGaugh, 2000; Kandel, 2001; Dudai, 2004). Sin embargo, es posible provocar su amnesia si esta es reactivada antes del tratamiento amnésico (Misanin et al., 1968; Schneider y Sherman, 1968). La reactivación es un proceso en el que la MLP recupera su estado lábil por reexposición a estímulos implicados en el proceso anterior de adquisición (Nader et al., 2000b). Por consiguiente, se necesita de un nuevo proceso de consolidación, denominado reconsolidación, para que la memoria persista (Przybylski y Sara, 1997; Nader et al., 2000a; Sara, 2000; Nader y Hardt, 2009). Así, la reconsolidación constituye un mecanismo que permite fortalecer una memoria anteriormente consolidada o actualizarla si durante la reactivación se introduce nueva información (Lee, 2008, 2010; Alberini, 2011).

La extinción consiste en la formación de una nueva memoria que desplaza a otra anteriormente almacenada con la que guarda relación. Finalmente, el recuerdo es la recuperación de información previamente almacenada, mientras que el olvido es la imposibilidad de evocar el recuerdo.

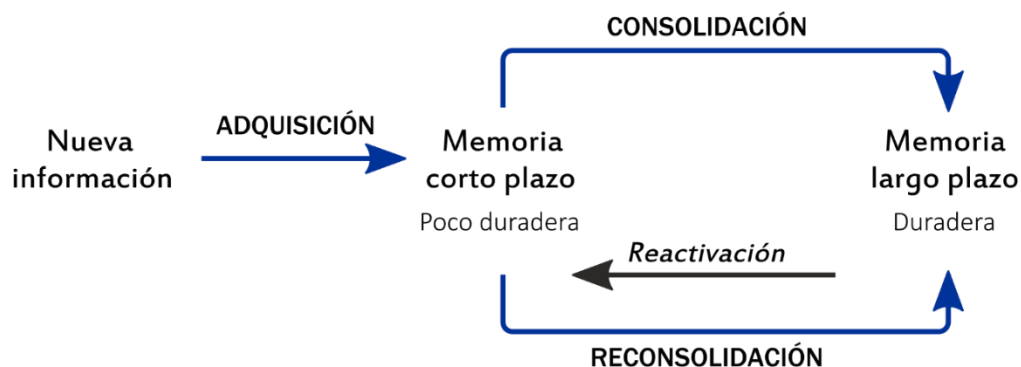


Figura I.1. Esquema representativo de las principales fases del procesamiento de la información.

La codificación de nueva información recibe el nombre de adquisición y constituye el paso inicial en la formación de la memoria. La memoria a corto plazo, resultado de modificaciones post-traduccionales, presenta una naturaleza lábil que es fortalecida mediante un proceso de consolidación que implica la síntesis de nuevas moléculas. A pesar de su persistencia, la memoria a largo plazo puede recuperar su estado lábil mediante la evocación del recuerdo por reexposición al estímulo inicial (reactivación), por lo que necesita de un nuevo proceso de consolidación para recuperar su estabilidad (reconsolidación).

I. 1.2 Bases fisiológicas del aprendizaje y la memoria

Una propiedad del encéfalo de mamíferos es su enorme plasticidad, lo que significa que las conexiones sinápticas entre las neuronas son modificadas en respuesta a cambios en

la actividad eléctrica inducidos por la experiencia (Korte y Schmitz, 2016). La plasticidad sináptica constituye el mecanismo fundamental del aprendizaje y la memoria (Milner et al., 1998). Las conexiones neuronales pueden verse modificadas en la eficacia de la transmisión sináptica (plasticidad funcional), así como en la estructura y el número de conexiones (plasticidad estructural) (Korte y Schmitz, 2016). La plasticidad funcional es el resultado de modificaciones post-traduccionales sobre proteínas preexistentes que modifican la fortaleza de la sinapsis, por ejemplo mediante un aumento en la liberación de neurotransmisor. Son cambios transitorios que constituyen la base de la formación de la MCP (adquisición). En cambio, la plasticidad estructural requiere cambios en la expresión (transcripción y traducción) de genes para la síntesis de nuevas proteínas, el crecimiento y la formación de nuevas conexiones. Son por tanto, cambios más duraderos asociados al remodelado sináptico, característicos de la formación de la MLP (consolidación y reconsolidación) (Davis y Squire, 1984; Goelet et al., 1986; Dudai, 2004; Inda et al., 2005). Aunque existe una base celular y molecular compartida entre los procesos de consolidación y reconsolidación, parece que las vías moleculares y las ventanas temporales de sensibilidad a inhibidores de la traducción no son las mismas en ambos procesos (Taubenfeld et al., 2001; Milekic y Alberini, 2002; Lee, Everitt, et al., 2004; Alberini, 2005; von Herten y Giese, 2005; Maroun y Akirav, 2009; Romero-Granados et al., 2010). En cualquier caso, ambas fases del procesamiento de la información requieren de la transcripción *de novo* de ADN, ya sea para la expresión de nuevas proteínas o para la generación de transcritos de ARN no codificantes que desarrollan un papel regulador sobre la expresión génica (Abel y Kandel, 1998; Milner et al., 1998; Abel y Lattal, 2001, revisado recientemente por Alberini y Kandel, 2015).

Un grupo importante de genes implicados en la formación de la MLP (Robertson, 1992; Dragunow, 1996; Tischmeyer y Grimm, 1999; Guzowski, 2002) son los genes de expresión inmediata temprana cuya inducción por cambios en la actividad neuronal produce modificaciones estables en la fortaleza de las sinapsis (Abraham et al., 1993; Worley et al., 1993). El gen *Fos*, que codifica la proteína c-Fos, fue uno de los primeros genes en el que se reconoció un rápido cambio en su expresión en respuesta a la actividad neuronal (Greenberg et al., 1986). Además, se ha demostrado un incremento en su expresión ante una amplia variedad de estímulos fisiológicos (Morgan et al., 1987; Rusak et al., 1990; Anokhin et al., 1991) o tras un entrenamiento comportamental (Hess et al., 1995; Vann et al., 2000). Más aún, la supresión de la síntesis de c-Fos afecta a la formación de la MLP sin perjudicar a la adquisición de información (Grimm et al., 1997; Guzowski, 2002).

I. 1.2.1 LTP, un modelo de plasticidad sináptica

Uno de los fenómenos más estudiados asociado a cambios en el fortalecimiento de la sinapsis es la potenciación sináptica a largo plazo (LTP, del inglés *Long-Term Potentiation*). Fue inicialmente descrita por Lomo en 1966 y más extensamente por Bliss y Lomo en el hipocampo de conejos anestesiados en 1973. Ambos descubrieron que tras estimular una vía aferente con pulsos de corriente eléctrica de alta frecuencia, se produce un incremento

persistente en la fortaleza de la transmisión sináptica. Desde su descubrimiento hasta la actualidad ha sido descrito en diferentes especies de vertebrados incluyendo primates no humanos (Urban et al., 1996) y humanos (Beck et al., 2000; Cooke y Bliss, 2006), así como en diferentes regiones encefálicas: cerebelo, amígdala, corteza prefrontal, corteza sensorial o corteza motora (Castro-Alamancos et al., 1995; Blond et al., 2002; D'Angelo et al., 2005; Sigurdsson et al., 2007), siendo el hipocampo la región donde más se ha estudiado (Bliss y Collingridge, 2013).

Este modelo de plasticidad sináptica, que depende de actividad, trajo consigo otro descubrimiento importante, la participación de un receptor iónico de glutamato de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) como elemento clave de muchas formas de LTP en el sistema nervioso central (SNC) (Collingridge et al., 1983). Además, fue descrito que la apertura del canal iónico del receptor NMDA es dependiente de voltaje y ligando, lo que lo convierte en un detector de coincidencia, ya que para abrirse el canal requiere de la despolarización de la membrana postsináptica y de la liberación de glutamato por la neurona presináptica en un tiempo próximo (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Una vez abierto el canal se produce la entrada de Ca^{2+} , capaz de activar un amplio rango de vías de señalización que han sido implicadas en la inducción y estabilización de algunas formas de LTP (Barrionuevo y Brown, 1983; Chittajallu et al., 1998; Malenka y Bear, 2004; Lisman et al., 2012; Huang et al., 2013; Kandel et al., 2014). Por otro lado, la actividad del receptor NMDA está regulada por un sitio de unión de coagonistas, conocido como sitio de unión de glicina, un aminoácido capaz de potenciar la respuesta mediada por el receptor (Johnson y Ascher, 1987) y disminuir su desensibilización (Mayer et al., 1989). De hecho, la acción de la glicina permite la formación de LTP usando protocolos de estimulación de menor frecuencia (Hayashi et al., 2006). Otros aminoácidos como D-alanina y D-serina también se unen al sitio de unión de coagonistas del receptor NMDA y presentan mayor afinidad que la propia glicina (Nishikawa, 2011).

Aunque muchos de los protocolos de estimulación utilizados en la inducción de LTP son considerados improbables en condiciones fisiológicas, se han encontrado importantes correlaciones entre LTP y conducta (Kandel et al., 2014). Por ejemplo, la inhibición de los receptores NMDA a niveles suficientes para bloquear la LTP en el hipocampo, incapacita al animal para aprender una localización espacial (Morris et al., 1986).

En contraposición a la LTP, protocolos de estimulación a baja frecuencia pueden inducir una reducción duradera en la respuesta sináptica en las mismas sinapsis capaces de mostrar LTP (Korte y Schmitz, 2016). Este fenómeno de plasticidad es conocido como depresión sináptica a largo plazo (LTD, del inglés *Long-Term Depression*) (Dudek y Bear, 1992; Mulkey y Malenka, 1992).

I. 1.3 La formación hipocampal

En el encéfalo de mamíferos existe una región ampliamente relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria explícita, conocida como formación hipocampal (Kandel, 2001). Situada en lo profundo del lóbulo temporal medial de ambos hemisferios, está constituida por distintas subregiones entre las que destacan el subículo, la corteza entorrinal y el hipocampo propiamente dicho, que está compuesto por el giro dentado y el asta de Amón o *cornu ammonis* (CA), subdividido principalmente en CA3 y CA1 (Khalaf-Nazzal y Francis, 2013; Radonjic et al., 2014) (**Fig.I.2**).

El giro dentado (GD) está compuesto de tres capas, la capa molecular, la capa granular y el *hilus* (**Fig.I.2B**). La capa molecular y el *hilus* contienen interneuronas inhibitoras que modulan la actividad eferente de las células de la capa granular. Las células granulares presentan axones altamente ramificados que forman la vía de las fibras musgosas. El *cornu ammonis* (CA) está formado por las capas *stratum oriens*, *stratum pyramidale* y la zona molecular, aunque suelen subdividirse en más capas, por ejemplo el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum/moleculare* que engloban los segmentos proximales y distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales, región a la que haremos referencia bajo el primer término (**Fig.I.2B**). El *stratum pyramidale* es la zona principal, contiene los cuerpos celulares, mientras que el resto de capas lo componen axones, dendritas y diferentes tipos de interneuronas. En CA3, las células piramidales hacen sinapsis recurrentes con otras neuronas de la región y con células de CA3 y CA1 del hipocampo contralateral a través de las conexiones comisurales. Las células granulares y piramidales son principalmente glutamatérgicas, mientras que las interneuronas son GABAérgicas. Otros transmisores como la sustancia P, el polipéptido intestinal vasoactivo, la somatostatina, el factor liberador de corticotropina, la dinorfina o el neuropéptido Y están presentes en niveles inferiores (Radonjic et al., 2014).

Cada región del hipocampo proyecta a regiones vecinas pero no siempre de forma recíproca (Hjorth-Simonsen, 1973), así las conexiones entre subregiones del hipocampo conforman un circuito unidireccional que recibe el nombre de circuito trisináptico (Andersen et al., 1969) (**Fig.I.2**). El circuito se inicia en la corteza entorrinal cuyos axones forman la vía perforante que atraviesa el subículo hacia la capa molecular del GD, donde se produce la sinapsis con las dendritas de las células granulares (1ª sinapsis). Estas proyectan sus axones altamente ramificados (fibras musgosas) a través del *hilus* sobre las dendritas apicales de las células piramidales de CA3 (2ª sinapsis), que a través de la vía de las colaterales de *Schaffer* hacen sinapsis con las dendritas apicales de las células piramidales de CA1 (3ª sinapsis). Finalmente, la subregión de CA1 conecta con el subículo y la corteza entorrinal. A lo largo del circuito trisináptico existen conexiones entre las diferentes células principales y las interneuronas inhibitoras. Además, hay proyecciones directas desde las células de la capa II de la corteza entorrinal hacia las dendritas apicales de CA3 (vía perforante) y desde las células de la capa III de la corteza entorrinal hacia las dendritas basales de CA1 (vía temporoamónica) (Radonjic et al., 2014).

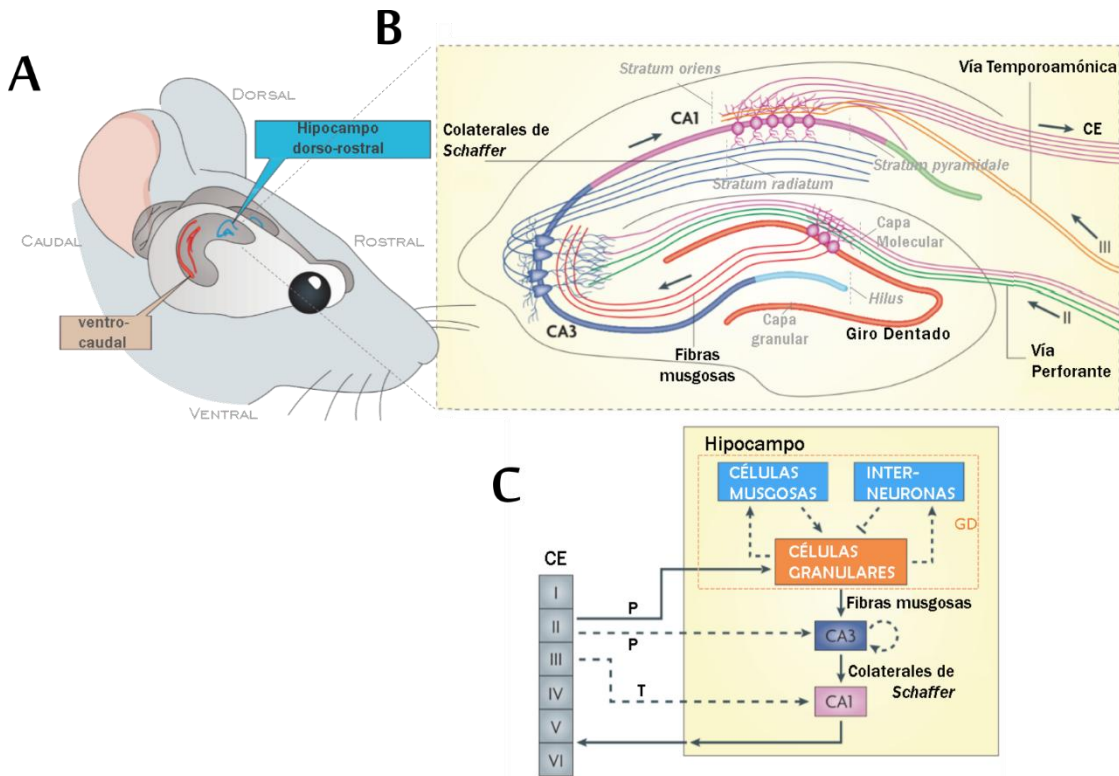


Figura I.2. Circuito neuronal del hipocampo de ratón adulto.

(A) Localización tridimensional del hipocampo en el encéfalo de ratón adulto en relación a diferentes coordenadas anatómicas. (B-C) Ilustración y diagrama del flujo de información ipsilateral en el hipocampo y su interconexión con la corteza entorrinal (CE). La principal aferencia al hipocampo es la vía perforante (P) que transmite información procedente de la capa II de la CE medial (líneas verdes) y lateral (líneas rosas) a diferentes niveles del árbol dendrítico de las células granulares del giro dentado (GD) situado en la capa molecular. Las neuronas granulares a través de sus axones (fibras musgosas) proyectan hacia las dendritas apicales de las células piramidales de CA3, las cuales inervan las neuronas piramidales de CA1 vía colaterales de Schaffer. Las neuronas de CA1 establecen conexiones de regreso a la CE, aunque a capas más profundas, cerrando así el circuito. A su vez, CA3 también recibe proyecciones directas procedentes de la capa II de CE a través de la vía perforante (P), y CA1 recibe aferencias de la capa III de CE mediante la vía temporoamónica (T). (C) Además, las células de la capa granular de GD conectan con células musgosas e interneuronas del *hilus* que envían señales excitadoras e inhibitorias respectivamente a las células granulares. Finalmente, las células de CA3 realizan sinapsis con otras neuronas de la misma región y mediante conexiones comisurales contactan con neuronas de CA3 y CA1 del hipocampo contralateral (no mostrado). Imágenes modificadas de Deng et al., 2010 y Bannerman et al., 2014.

I. 1.4 Paradigma comportamental que depende del hipocampo: el reconocimiento de objetos

El paradigma comportamental de reconocimiento de objetos (RO) es un modelo muy robusto en el estudio de la formación de memorias explícitas (lábilis y duraderas) no espaciales (Cohen y Stackman Jr., 2015). Su base se sustenta en la propensión de los roedores a explorar e interactuar más con un objeto novedoso frente a uno familiar (Berlyne, 1950; Bevins y Besheer, 2006) sin necesidad de aplicar recompensa o castigo

para inducir la conducta (Ennaceur y Delacour, 1988). Esta preferencia se manifiesta mediante un mayor acercamiento, olfateo, manipulación y elevación sobre los objetos novedosos frente a los objetos familiares (Aggleton, 1985). Aunque el paradigma permite variaciones en su protocolo, nuestro estudio se centra en aquel que comprende (1) una sesión de entrenamiento en la que el ratón codifica la información al explorar dos objetos idénticos en una arena familiar, (2) un tiempo ajustable en el que el animal permanece en la jaula de estabulación, durante el cual se forma la memoria a corto o largo plazo en función de su duración y (3) un test de evaluación del recuerdo, donde el animal es devuelto a la arena con un objeto idéntico al del entrenamiento (familiar) y otro desconocido (novedoso) (Cohen y Stackman Jr., 2015).

Además de la participación de las cortezas sensoriales (olfativa, somatosensorial y visual) que captan y codifican la información del entorno, destaca la actividad del lóbulo temporal medial, que procesa la información para su almacenamiento. En esta área se encuentran diferentes regiones implicadas en el reconocimiento de objetos: el hipocampo, la corteza entorrinal y las cortezas extra-hipocampales (perirrinal y postrrinal) (Buffalo et al., 1999; Squire et al., 2004; Eichenbaum et al., 2007). Todas ellas están interconectadas, de modo que el hipocampo tiene conexiones con las cortezas extra-hipocampales a través de la corteza entorrinal (Dickerson y Eichenbaum, 2010; Kinnavane et al., 2016).

Las áreas neocorticales que procesan la información sensorial unimodal acerca de las cualidades de los objetos (el componente “qué”) y aquellas que procesan la información espacial, contextual (el componente “dónde”) proyectan sus aferencias a la corteza perirrinal y postrrinal respectivamente (Suzuki y Amaral, 1994; Burwell et al., 1995; Ranganath y Ritchey, 2012). Aunque hay conexiones entre ambas cortezas extra-hipocampales, las corrientes de procesamiento “qué” y “dónde” se mantienen separadas anatómicamente en la corteza entorrinal. De ese modo, la corteza perirrinal conecta principalmente con la corteza entorrinal lateral y la corteza postrrinal con la corteza entorrinal medial. Ambos componentes de información convergen en el hipocampo, implicado posiblemente en la asociación y categorización de ambas variables aisladas (Brown y Aggleton, 2001) (**Fig.I.3**). Además, parece que la corteza perirrinal y postrrinal presentan conexiones directas con CA1 y subículo manteniendo la segregación anatómica; la corteza perirrinal está más fuertemente conectada con la zona anterior y la postrrinal con la posterior, al menos en humanos (Ranganath y Ritchey, 2012). Así, dada la implicación del hipocampo, su inactivación total o parcial, bajo determinadas condiciones, impide la formación de la memoria de reconocimiento de objetos (Cohen y Stackman Jr., 2015).

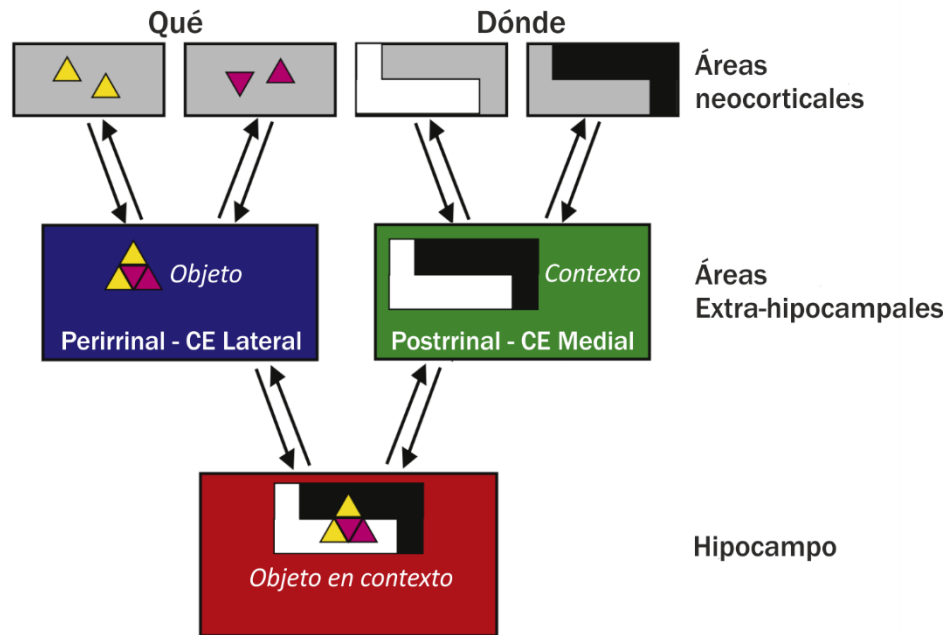


Figura I.3. Organización funcional de la memoria de reconocimiento en el lóbulo temporal medial.

La información neocortical proyecta las características del objeto a la corteza perirrinal y la corteza entorrinal (CE) lateral, mientras que los detalles sobre el entorno de los objetos son transmitidos a la corteza postrrinal y la CE medial. Ambas corrientes convergen en el hipocampo, donde el objeto es representado en el contexto donde fue explorado y son bidireccionales. Modificado de Eichenbaum et al., 2012.

I. 2 LAS CÉLULAS GLIALES. MICROGLÍA Y ASTROCITOS

La señalización eléctrica y la transmisión sináptica constituyen la base de la función cerebral, sin embargo el estudio aislado del componente neuronal aporta una explicación sesgada de los procesos cognitivos complejos. En los últimos años, las células gliales, un conjunto de células muy diversas con múltiples funciones y presentes en un alto número en el sistema nervioso, han sido consideradas en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares del aprendizaje y la memoria (Fields et al., 2014).

El número de células gliales en el encéfalo es similar al de neuronas (Herculano-Houzel, 2014), ambos conforman los tipos celulares mayoritarios del sistema nervioso. Por tanto, cabe esperar la posible participación de la glía en otras funciones, más allá de su labor como células de soporte de las neuronas. Pese a que estas células no propagan potenciales de acción, mantienen una interacción física y una comunicación química con las neuronas. Los tipos fundamentales de glía en el SNC son los astrocitos y oligodendrocitos, derivados del neuroectodermo, y la microglía, derivada del mesodermo. Sus análogos en el sistema nervioso periférico (SNP) son las células satélite, las células de Schwann y los macrófagos respectivamente (Hutchins et al., 2003). La intercomunicación entre células microgliales, astrocitos y neuronas en el hipocampo sostiene el núcleo de nuestro estudio.

I. 2.1 Microglía

La microglía son las células que conforman el sistema inmunitario innato del SNC. Se estima que entre un 5-20% de las células del encéfalo de ratón son microgliales (Hof et al., 2008), si bien su porcentaje varía entre regiones cerebrales y especies (Lawson et al., 1990; Mittelbronn et al., 2001). Aunque tuvo importantes predecesores, fue Pío del Río-Hortega quien modificando el método de marcaje con carbonato de plata de Cajal, convenció a la comunidad científica del descubrimiento de un nuevo tipo celular al que denominó microglía (Río-Hortega, 1919a, 1919b, 1919c, revisado en Kettenmann et al., 2011 y Tremblay et al., 2015).

Las células microgliales derivan de progenitores de origen mesodérmico/mesenquimal originados en el saco vitelino en el día embrionario 8,5 (E8,5) que migran al encéfalo desde E9,5-10,5 hasta que se forma la barrera hematoencefálica (E13,5-14,5) (Ginhoux et al., 2010; Kierdorf et al., 2013; Waisman et al., 2015; Matcovitch-Natan et al., 2016). Estas células migratorias tienen una morfología ameboide que adquiere un fenotipo ramificado al invadir el parénquima encefálico, donde proliferan y se distribuyen (Kettenmann et al., 2011). Esta es la única fuente de microglía en el encéfalo sano junto con su capacidad de auto-renovación, aunque en condiciones patológicas pueden producirse infiltraciones de células mieloides procedentes de la médula espinal (Matscovitch-Natan et al., 2016). No obstante, el origen de la microglía y su mantenimiento en el encéfalo adulto no está exento de debate (Soulet y Rivest, 2008; Waisman et al., 2015; ElAli y Rivest, 2016).

La microglía está distribuida de forma regular, de manera que cada célula ocupa un volumen definido del parénquima encefálico sin solapar con los dominios de células microgliales vecinas (Lawson et al., 1990) (**Fig.I.4A**). Las células microgliales presentan un perfil transcripcional heterogéneo que varía en función de la región cerebral, la edad y las señales del medio. Posiblemente esta diversidad microglial se deba en parte a los distintos microambientes del tejido nervioso, caracterizados por diferencias en subtipos neuronales, la presencia o no de vainas de mielina, perfiles de neurotransmisores, variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la presencia de distintos tipos celulares (Schwartz et al., 2006; Kettenmann et al., 2011; Njie et al., 2012; Hanisch, 2013; Gertig y Hanisch, 2014; Doorn et al., 2015; Grabert et al., 2016). Esta heterogeneidad transcripcional supone diferencias en la respuesta microglial ante un mismo estímulo (Schwartz et al., 2006; Grabert et al., 2016).

La microglía expresa una gran variedad de receptores que le permite registrar señales procedentes del espacio extracelular y de otros tipos celulares, así como cambios en la actividad neuronal (**Fig.I.4B**). Principalmente a partir de cultivos primarios de microglía, ha sido descrita la expresión de receptores para distintos neurotransmisores, como receptores de purinas y pirimidinas, receptores metabotrópicos de glutamato, receptores de dopamina, receptores GABAérgicos, colinérgicos y adrenérgicos. Además, expresan receptores para neurohormonas y neuromoduladores, como receptores de bradikina,

de histamina, de endotelinas, de sustancia P, de neurotrofinas y receptores cannabinoides. También es conocida la presencia de receptores de citoquinas (p.e. receptor de TNF- α), receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (p.e. receptores de tipo *Toll*) y receptores del complemento entre otros (Kettenmann et al., 2011). Las señales reconocidas por los receptores microgliales afectan a la permeabilidad de la membrana, la liberación de moléculas, la movilidad de la célula, el nivel de Ca²⁺ intracelular, etc. (Biber et al., 2007; Pocock y Kettenmann, 2007). A su vez, la microglía expresa canales de Ca²⁺, K⁺, Cl⁻, canales de receptores de potencial transitorio (sigla en inglés: TRP), etc. (Kettenmann et al., 2011). Por otro lado, las células microgliales son capaces de liberar un amplio abanico de sustancias neuroactivas: citoquinas como el factor de necrosis tumoral TNF- α (del inglés, *Tumor Necrosis Factor*), factores tróficos como BDNF (del inglés, *Brain Derived Neurotrophic Factor*), óxido nítrico y neurotransmisores como ATP y glutamato (Kettenmann et al., 2013). Recientes descubrimientos apuntan a que tales factores, muchos asociados a la actividad inmunitaria de la microglía, también participan en otras funciones en el sistema nervioso sano.

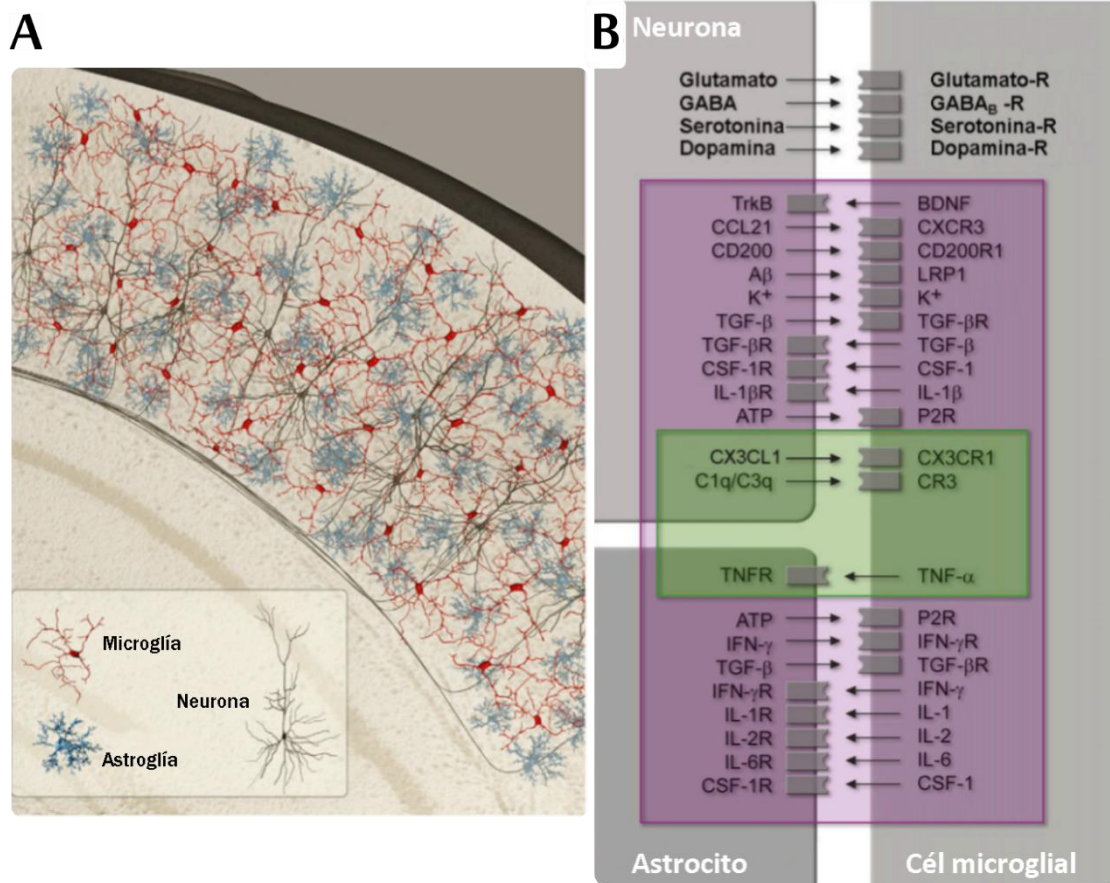


Figura I.4. Distribución y señalización de las células microgliales con neuronas y astrocitos.

(A) Los procesos microgliales escanean la red neuronal (gris) y astroglial (azul). Tanto las células microgliales como los astrocitos se distribuyen uniformemente con apenas solapamiento entre sus procesos en el espacio tridimensional. Sin embargo, procesos de un tipo celular pueden solapar con los de otro. Aunque ambos tipos gliales presentan movilidad en sus procesos, la microglía se caracteriza por un mayor dinamismo, estableciendo contactos frecuentes con

neuronas y astrocitos vecinos. **(B)** Además del contacto físico de la microglía con otros tipos celulares, las células microgliales mantienen una intercomunicación química con neuronas y astrocitos mediante la expresión de un conjunto de receptores y ligandos como los que se muestran en este esquema simplificado. En el recuadro morado se engloban aquellos involucrados en situaciones patológicas, entre los cuales se encuadran en verde aquellos que además presentan funcionalidad en condiciones fisiológicas. Modificado de Kettenmann et al., 2013.

I. 2.1.1 Funciones de las células microgliales

I. 2.1.1.1 *Protección inmunitaria del sistema nervioso central*

En condiciones fisiológicas, la microglía presenta una morfología ramificada, caracterizada por un pequeño soma del que emergen finos procesos arborizados, que tradicionalmente recibe el nombre de microglía en reposo (en inglés *resting microglia*) o microglía ramificada. Ante una alteración de la homeostasis cerebral, como una infección, lesión, enfermedad neurodegenerativa o alteración de la actividad neuronal, la microglía modifica su perfil transcripcional, su funcionalidad y morfología adquiriendo un fenotipo ameboide con un soma más grande y procesos reducidos; lo que tradicionalmente se conoce como activación microglial (Block et al., 2007; Hanisch y Kettenmann, 2007; Colton y Wilcock, 2010; Graeber y Streit, 2010). La microglía activada es capaz de movilizarse al foco de la lesión a través de gradientes quimiotácticos, incrementar su densidad, liberar factores proinflamatorios o inmunoreguladores (p.e. citoquinas), así como fagocitar patógenos, células dañadas y restos celulares (Kettenmann et al., 2011). De esta manera, la microglía actúa como sistema inmunocompetente del SNC.

Hasta hace muy poco tiempo, las células microgliales ramificadas eran consideradas células inactivas o en reposo a la espera de un evento patológico. Descubrimientos recientes nos alejan de considerar a la microglía ramificada como meros sensores de daños, añadiendo nuevas funciones, más allá del papel inmunitario descrito arriba (Kettenmann et al., 2013; Salter y Beggs, 2014). Por tanto, el concepto de activación microglial entendido como la transformación de la microglía hacia un perfil inmunocompetente resulta incompleto. Queda mejor definido como un cambio de estado funcional de la microglía, no necesariamente inmunitario y que no siempre va acompañado de un cambio morfológico obvio (Eskes et al., 2003; Cunningham et al., 2005). A continuación, se detallan algunas de las diferentes funciones microgliales.

I. 2.1.1.2 *Sensores de cambios extracelulares y de la actividad neuronal*

Un rasgo indicativo de actividad en la microglía ramificada es el movimiento. En el encéfalo sano de ratón adulto, el movimiento de los procesos microgliales constituye el más rápido descrito para una estructura celular, con una velocidad de extensión y retracción superior a 1-3 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Posiblemente, permite a la microglía examinar el espacio extracelular del encéfalo

completo cada pocas horas (Raivich, 2005). Así, la microglía ramificada o mal llamada “en reposo” gracias a sus delgados procesos, escanea el ambiente extracelular en búsqueda de lesiones e invasores, y registra la actividad sináptica sin dañar el circuito neuronal (Wake et al., 2009; Tremblay et al., 2010). De hecho, la microglía al igual que los astrocitos, mantiene contacto físico con las neuronas, pero a diferencia de la astrogía la interacción parece ser menos permanente, más dinámica. En cortezas somatosensorial y visual libres de patología se han detectado repetitivos contactos de procesos de microglía ramificada con sinapsis, a una frecuencia de un contacto por hora con una duración de 5 minutos. Esta frecuencia es reducida al disminuir la actividad neuronal (Wake et al., 2009), lo que sugiere que los contactos microglía-neuronas son regulados por la actividad sináptica. En este sentido, la aplicación de NMDA desencadena la extensión de los procesos microgliales en hipocampo y corteza (Dissing-Olesen et al., 2014; Eyo et al., 2014), y la aplicación de AMPA o kainato produce el sobrecrecimiento de los procesos microgliales en la retina de ratones adultos mediado por ATP (Fontainhas et al., 2011). Receptores purinérgicos están asociados con extensión y retracción de los procesos (Davalos et al., 2005), como es el caso de P2Y₁₂ y A_{2A} respectivamente (Haynes et al., 2006; Orr et al., 2009). En contraposición al efecto de la vía glutamatérgica, la vía GABAérgica disminuye la movilidad microglial (Fontainhas et al., 2011). Sin embargo, en hipocampo *in vitro* y con un protocolo de estimulación distinto (adición de neurotransmisores o agonistas diferentes) se obtuvieron resultados opuestos (Grinberg et al., 2011). A su vez, en la dirección contraria, la microglía parece modular la transmisión sináptica. Por ejemplo, en larvas de pez cebra se produce un aumento de la actividad neuronal cuando la microglía no puede interactuar con las neuronas (Li et al., 2012).

I. 2.1.1.3 Desarrollo y mantenimiento del circuito neuronal

Una función importante de la microglía es el moldeado de la red neuronal. El cableado del sistema nervioso adulto es el resultado de un mecanismo regulado que ocurre durante el desarrollo, en el que tras la producción de conexiones sinápticas redundantes, se eliminan aquellas sinapsis inapropiadas para formar un circuito neuronal preciso (Lichtman y Colman, 2000). El primer proceso se conoce como sinaptogénesis y en él participan los astrocitos. Sin embargo, la primera oleada de generación de sinapsis, transcurre en ausencia de astrogía, probablemente asistida por la microglía (Kettenmann et al., 2013). El segundo proceso recibe el nombre de poda sináptica (en inglés *synaptic pruning*), en el que la microglía envuelve las estructuras sinápticas para su eliminación, ejerciendo el control sobre el número de sinapsis (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Zhan et al., 2014) en un proceso regulado por la actividad neuronal (Hua y Smith, 2004; Huberman et al., 2008).

La fractalquina (CX₃CL1), una quimioquina abundante expresada por las neuronas (Harrison et al., 1998; Hatori et al., 2002; Cardona et al., 2006), es el ligando endógeno del receptor CX₃CR1, que en el encéfalo es específico de microglía (Jung et al., 2000; Cardona et al., 2006; Wolf et al., 2013). La fractalquina desempeña un papel importante en la neuroprotección frente a procesos inflamatorios o lesiones (Hughes et al., 2002;

Cardona et al., 2006; Lauro et al., 2010; D'Haese et al., 2012). En cambio, en condiciones fisiológicas, la comunicación microglía-neuronas a través de CX₃CL1-CX₃CR1 parece mediar otras funciones, incluyendo la poda sináptica. Ratones *knockouts* para el gen *cx3cr1* exhiben un incremento transitorio en la densidad de espinas dendríticas inmaduras en desarrollo y un aumento en la frecuencia de corrientes postsinápticas excitadoras miniatura en el hipocampo (Paolicelli et al., 2011). Aunque el mecanismo se desconoce, es posible que CX₃CL1, que interviene como factor soluble y como proteína transmembrana, movilice a la microglía. También ha sido descrita la posible implicación de las moléculas de la cascada del complemento C1q y C3 en el etiquetado de sinapsis inmaduras que necesitan ser eliminadas por las células microgliales (Stevens et al., 2007). La eliminación génica del receptor microglial del complemento 3 (en inglés CR3) produce una actividad fagocítica menor y déficits en la conectividad sináptica (Schafer et al., 2012). Por otro lado, la microglía sostiene la supervivencia de determinados tipos específicos de neuronas durante periodos concretos del desarrollo, como es el caso de las neuronas corticales de la capa V que requieren de la actividad microglial para sobrevivir durante el desarrollo postnatal, por un mecanismo desconocido en el que está implicada la liberación de factores tróficos como IGF-1 (del inglés, *Insulin-like Growth Factor 1*), procedente de la microglía (Ueno et al., 2013). También en el animal adulto, las células microgliales eliminan sinapsis disfuncionales en un proceso conocido como *synaptic stripping* (Kettenmann et al., 2013).

Por otra parte, las células microgliales están involucradas en la regulación de la actividad de la red neuronal del hipocampo adulto, controlando la integración de nuevas neuronas y la eliminación de neuronas apoptóticas (Sierra et al., 2010). De hecho, la administración de fractalquina exógena en ratas, revierte la tasa de neurogénesis hipocampal disminuida por el envejecimiento (Bachstetter et al., 2011).

I. 2.1.2 Microglía, comportamiento y memoria

Diversos estudios parecen indicar que la microglía influye sobre la plasticidad sináptica, mecanismo base de la memoria. Las células microgliales, mediante la liberación de glicina, potencian la respuesta mediada por el receptor NMDA en cultivos de neuronas piramidales de CA1, favoreciendo la LTP (Hayashi et al., 2006). Además, la aplicación en rodajas de fractalquina (CX₃CL1) produce una disminución de la transmisión sináptica glutamatérgica que no fue observada en ratones *cx3cr1*^{-/-} (Bertollini et al., 2006; Ragozzino et al., 2006). Lo que sugiere que una neurona puede reducir su propia actividad a través de la microglía. Asimismo, la estimulación de la microglía con CX₃CL1 induce la liberación de adenosina que a través del receptor A₃ inhibe la LTP en CA1 de rodajas hipocampales (Maggi et al., 2009). En cambio, ha sido sugerido que la adenosina liberada en la región CA1, activa receptores A_{2A} de microglía y probablemente de astrocitos, promoviendo en ambos tipos celulares la liberación de D-serina, potenciando así la transmisión sináptica que depende de los receptores NMDA. La aplicación del inhibidor de la activación microglial, minociclina, bloquea el efecto de la fractalquina, reafirmando la relevancia de este tipo celular (Scianni et al., 2013).

La citoquina TNF- α liberada por células microgliales en situaciones neuropatológicas es un importante efector de plasticidad en condiciones fisiológicas donde interviene con una concentración menor. Su implicación ha sido descrita en un proceso de plasticidad conocido como escalado sináptico (en inglés *synaptic scaling*) (Stellwagen y Malenka, 2006; Pascual et al., 2012), en el que se ajusta proporcionalmente la fortaleza de las sinapsis de una neurona para mantener estable su funcionamiento (Turrigiano, 2008).

La importancia de las células microgliales en plasticidad queda reflejada en experimentos de comportamiento. En ratones que carecen del receptor CX₃CR1, además de verse perjudicada la LTP, muestran déficits en los paradigmas de miedo contextual condicionado, laberinto acuático de Morris y aprendizaje motor (Rotarod) (Rogers et al., 2011). No obstante, existen experimentos con resultados opuestos en los que la deficiencia del receptor CX₃CR1 facilita la memoria (Maggi et al., 2011; Reshef et al., 2014). En un experimento reciente, ratones a los que se les eliminó la microglía hipocampal mediante administración local de clodronato vieron disminuido su rendimiento en el laberinto de Barnes, un paradigma de aprendizaje espacial, que fue recuperado cuando la microglía repobló el hipocampo. En el mismo experimento, obtuvieron déficits en memoria espacial al eliminar la microglía por administración sistémica de un inhibidor del receptor CSF-1 (Torres et al., 2016), importante en el desarrollo y mantenimiento de las células microgliales (Chitu et al., 2016).

A través de la modulación que ejerce el estrés sobre las células microgliales se produce un detrimento en la memoria (Frank et al., 2007; Sugama et al., 2007). El déficit provocado por un estrés agudo sobre la memoria de trabajo, sede temporal de estímulos ausentes (Morgado, 2005), está asociado a una mayor producción de TNF- α por la microglía ramificada hipocampal, de manera que la administración de un inhibidor para la citoquina recupera la memoria (Ohgidani et al., 2016). En consonancia, el tratamiento con minociclina, un inhibidor de la funcionalidad microglial, mejora la memoria de trabajo perjudicada por un estrés crónico (Hinwood et al., 2012). Asimismo, el efecto que produce el estrés crónico sobre la morfología microglial, la plasticidad neuronal y su relación con la depresión es atenuado al obstaculizar la señalización mediada por CX₃CR1 (Milior et al., 2016). A pesar del creciente estudio de la función microglial en ausencia de patología, todavía son pocos los trabajos conductuales que estudian el papel de las células microgliales en aprendizaje y memoria, por lo que se necesita más investigación para vincular consistentemente memoria y microglía.

La microglía también podría estar involucrada en el deterioro cognitivo característico del envejecimiento o en las enfermedades neurodegenerativas cuya prevalencia aumenta con la edad (Wong, 2013). A edades avanzadas, las células microgliales de ratón cambian su morfología, muestran somas de diversos tamaños y procesos menos complejos (Sierra et al., 2007; Tremblay et al., 2012). También, en algunas áreas cerebrales, incluyendo el hipocampo de ratón (Mouton et al., 2002), aumentan en número (Wong, 2013). En la corteza de humanos ha sido reconocido aumento del cuerpo celular, pérdida de ramificaciones, fragmentación del citoplasma, etc. (Streit et al., 2004). A su vez, el

envejecimiento conduce a una distribución menos uniforme en la corteza (Tremblay et al., 2012) y a una funcionalidad afectada (disminución de la velocidad de movimiento, peor reacción ante una lesión e incluso puede promover neurodegeneración) (Damani et al., 2011; Kettenmann et al., 2013; Hefendehl et al., 2014). Además, la microglía de rata en cultivo sufre un rápido acortamiento de los telómeros, a diferencia de los astrocitos en los que ocurre más lentamente (Flanary y Streit, 2004). Todo ello contribuye a un debilitamiento de la conectividad y plasticidad sináptica.

Anormalidades en las conexiones sinápticas, el comportamiento y la capacidad cognitiva en el adulto podrían ser el resultado de la activación del perfil inmunitario de la microglía durante el desarrollo (Bilbo et al., 2006; Bilbo, 2010; Bitanirwe et al., 2010; Ito et al., 2010). Desórdenes psiquiátricos como los del espectro del autismo, el trastorno obsesivo-compulsivo y la esquizofrenia guardan relación con las células microgliales (Vargas et al., 2005; Hashimoto, 2008; Monji et al., 2009; Chen et al., 2010; Morgan et al., 2010).

I. 2.1.3 Uso de marcadores microgliales

El conocimiento de genes que se expresan en microglía nos permite el diseño de herramientas específicas para distinguir a las células microgliales del resto de tipos celulares, y analizar sus características morfológicas y fisiológicas como tamaño o estado activo. A continuación se describen algunos marcadores de interés:

La proteína Iba1 (del inglés, *Ionized Calcium Binding Adapter 1*) es un marcador microglial extensamente utilizado, codificada por el gen *iba1*, cuya expresión en el parénquima encefálico está restringida a la microglía (Ito et al., 1998). Esta proteína tiene un peso molecular de 17 kDa y participa en la homeostasis del Ca^{2+} (Imai et al., 1996; Imai y Kohsaka, 2002). La sobreexpresión de *Iba1* está asociada a la activación microglial, tal como ocurre tras axotomía del nervio facial (Ito et al., 2001), isquemia (Mori et al., 2000) y varias enfermedades nerviosas (Ohsawa et al., 2000).

Egr-1 (del inglés, *Early growth response-1*) es un gen de expresión inmediata temprana cuya expresión en neuronas varía en función de su actividad eléctrica. Sin embargo, la presencia de este factor de transcripción, EGR-1, también se observa en células microgliales (Butovsky et al., 2014; Matcovitch-Natan et al., 2016) con una expresión mínima en microglía inmadura y máxima en el ratón adulto (Maticovitch-Natan et al., 2016). En técnicas de inmunomarcaje, las diferencias en morfología, tamaño y localización nos permiten distinguir entre células microgliales y neuronas EGR-1+.

Una herramienta empleada en el reconocimiento de células microgliales, viable incluso en experimentos *in vivo*, consiste en el uso de un marcador fluorescente como EGFP (del inglés, *Enhanced Green Fluorescent Protein*), cuya secuencia codificante se coloca bajo el promotor de un gen específico de microglía como *iba1* (Hirasawa et al., 2005) o *cx3cr1* (Jung et al., 2000; Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). En estas construcciones

génicas se pierde una copia del gen microglial, lo que quizás tenga influencia sobre los resultados experimentales (Kettenmann et al., 2011).

I. 2.1.4 Técnicas de eliminación o disfunción de la microglía

El uso de herramientas que nos permiten la eliminación de células microgliales o la inhibición de su actividad nos ayuda a determinar los procesos fisiológicos en los que participan. Existen diversos métodos (revisados por Waisman et al., 2015), con ventajas e inconvenientes diferentes, que pueden agruparse en los siguientes apartados:

I. 2.1.4.1 Modelos de eliminación de genes

Consiste en ratones deficientes en microglía debido a una mutación sobre algún gen crucial para su desarrollo, como aquellos que codifican las proteínas PU.1, CSF-1R y TGF- β 1 (Ginhoux et al., 2010; Kierdorf et al., 2013; Butovsky et al., 2014; Chitu et al., 2016). Estos modelos genéticos permiten estudiar el papel de la microglía sobre el desarrollo, enfermedades neurodegenerativas o neuroinflamatorias y su implicación en la homeostasis del SNC (Waisman et al., 2015). En su contra, los animales rara vez alcanzan la edad adulta y presentan alteraciones fuera del sistema nervioso (Scott et al., 1994; McKercher et al., 1996). Por ejemplo, la deficiencia de TGF- β 1, además de generar cambios drásticos en el desarrollo de la microglía (Butovsky et al., 2014) provoca el desarrollo de una enfermedad autoinmune multiorgánica en edad temprana (Shull et al., 1992). Es necesario recalcar que los resultados obtenidos en animal adulto de modelos de escisión de genes, pueden deberse no necesariamente a la necesidad del gen en la madurez, sino a un defecto ocasionado en el desarrollo o a un déficit producido por la falta del gen en otro tipo celular o región sin considerar (Kandel et al., 2014).

I. 2.1.4.2 Modelos de eliminación génica condicional

Para solventar los problemas colaterales que conlleva la eliminación permanente de la microglía, existen herramientas genéticas o farmacológicas, por las cuales se elimina la microglía de forma transitoria. Los métodos de eliminación génica condicional se basan en el control espacial y temporal de la expresión de un determinado gen que codifica una proteína causante de disfuncionalidad o muerte celular en respuesta a determinadas condiciones, como la presencia de un sustrato exógeno específico. Esta técnica nos permite inactivar o eliminar a la microglía mediante la activación de la expresión de un gen concreto en las células microgliales. Por ejemplo, existe una línea de ratón que expresa el gen codificante para la enzima timidina quinasa bajo el promotor del gen *itgam* (CD11b), específico de células mieloides. Esta enzima transforma el ganciclovir en un producto tóxico. Por tanto, cuando estos ratones son tratados con ganciclovir, sus células mieloides CD11b⁺ son eliminadas rápidamente, incluyendo a la microglía (Heppner et al., 2005). El problema es que la eliminación de todas las células mieloides conduce a la muerte del animal. Por eso, para restringir la reacción tóxica al SNC, se administra ganciclovir intracerebroventricularmente (i.c.v.), aunque también desencadena la muerte

del ratón. Este método pese a que no afecta al número y morfología de las neuronas, suscita efectos colaterales como la infiltración de células periféricas a través de la barrera hematoencefálica y la activación temporal de los astrocitos (Grathwohl et al., 2009).

Otra herramienta genética es el uso de la recombinasa Cre, enzima que cataliza la recombinación entre dos secuencias llamadas loxP, de manera que si se colocan dos sitios loxP a ambos lados de un gen o exón esencial del gen, este es escindido tras la activación de la recombinasa (Feil et al., 2009). Para poder inducir la recombinación en un tiempo deseado, existen recombinasas Cre acopladas a los dominios de unión del receptor de estrógenos (CreER) que son activadas cuando se une el ligando tamoxifeno. La expresión de CreER bajo un promotor microglial, como el del gen *cx3cr1*, permite la manipulación selectiva de genes en microglía. Así, del cruce entre el ratón *cx3cr1^{CreER}* con otro que contiene los sitios loxP flanqueando el gen diana, se engendra una descendencia con una nueva construcción génica, que permite mediante el tratamiento con tamoxifeno, la escisión del gen en células microgliales. Por ejemplo, para la eliminación de la población microglial se utiliza el cruce entre ratones *cx3cr1^{CreER}* y ratones iDTR, los cuales contienen el gen codificante para el receptor de la toxina de la difteria (sigla en inglés: DTR) cuya transcripción sólo es posible tras la escisión vía Cre de una secuencia que impide su expresión (Buch et al., 2005). Así, en ratones *cx3cr1^{CreER} ;iDTR*, el tratamiento con tamoxifeno hace a la microglía vulnerable frente a la toxina de la difteria, por lo que la aplicación de la toxina desencadena la eliminación temporal de la población microglial, mientras el resto de tipos celulares son insensibles al tratamiento (Parkhurst et al., 2013). El problema es que el gen *cx3cr1* también se expresa en otras células mieloides y precursores fuera del encéfalo, en la médula espinal (Geissmann et al., 2010), aunque con un ciclo de vida más corto que el de la microglía. Otro inconveniente es el uso de tamoxifeno, capaz de actuar sobre el sistema inmunitario (Elloso et al., 2005). Asimismo, algunos trabajos han reconocido astrogliosis tras la eliminación de la microglía (Elmore et al., 2014; Bruttger et al., 2015). Finalmente, es preciso resaltar que la escisión de un gen no supone la eliminación simultánea de la proteína, por lo que es necesario conocer la vida media del ARNm y la proteína (Jahn et al., 2015).

1. 2.1.4.3 *Tratamiento farmacológico*

Consiste en la administración de una sustancia que interactúa con las células microgliales, provocando su eliminación o alguna disfuncionalidad. Por lo general es sencillo suministrarlo al animal y permite diferentes vías de administración en función de la farmacocinética de la sustancia utilizada. El fármaco PLX3397 inhibe al receptor CSF-1R y elimina el 99% de la población microglial. Tras el cese del tratamiento se necesita de 5 días para su repoblación (Elmore et al., 2014). Debido a su eficiencia, es una buena herramienta para estudiar las fuentes de renovación de la población microglial. Entre sus inconvenientes se encuentra la inhibición de tres quinasas FLT3, PDGFR y KIT (Chitu et al., 2012; Thompson et al., 2015), la alteración, cuando se administra sistémicamente, de la funcionalidad de otras poblaciones mieloides: macrófagos, células troncales hematopoyéticas, osteoclastos y mastocitos (Thompson et al., 2015), y progenitores

microgliales periféricos, como células Ly6C⁺ y CX₃CR1⁺, en médula espinal y sangre (Waisman et al., 2015). Además, el receptor CSF-1R también se expresa en neuronas (Chitu et al., 2016).

Otro tratamiento farmacológico ampliamente utilizado es la minociclina (Yrjänheikki et al., 1998; Tikka et al., 2001; Blum et al., 2004; Stirling et al., 2005; Familian et al., 2006; Griffin et al., 2006; Seabrook et al., 2006; Suzuki et al., 2010; Yoon et al., 2012; Ueno et al., 2013). Se trata de un antibiótico de la familia de las tetraciclinas, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, incluso en humanos (Yong et al., 2004). En 1998 se vio por primera vez que su administración inhibe la activación microglial en un modelo de isquemia en jerbos (Yrjänheikki et al., 1998). Mediante experimentos en cultivos, se confirmó que la inhibición de la actividad microglial era consecuencia de un efecto directo del fármaco (Tikka et al., 2001; Tikka y Koistinaho, 2001). Por su efecto neuroprotector es ampliamente utilizado en el estudio de diversas enfermedades como derrame cerebral, isquemia, neurodegeneración, lesiones cerebrales y de médula espinal. A pesar de la diversidad de desórdenes neurológicos en los que se estudia, es probable que todos ellos tengan un rasgo en común: la activación de la microglía y la consecuente liberación de sustancias neurotóxicas (Yong et al., 2004), como se ha descrito en Parkinson (Wu et al., 2002), esclerosis múltiple (Popovic et al., 2002), hemorragia intracerebral (Power et al., 2003) y lesión de médula espinal (Stirling et al., 2004).

El mecanismo de acción por el cual la minociclina afecta a la función de las células microgliales no ha sido esclarecido. Es sabido que reduce la migración microglial y disminuye la expresión de K_v1.3, un canal de potasio relacionado con la movilidad de la microglía (Kettenmann et al., 2011); además puede alterar los niveles de moléculas implicadas en la quimiotaxis, las quimioquinas (Stirling et al., 2005). Por otro lado, la aplicación de minociclina podría reducir la activación microglial a través de un mecanismo que depende de la proteína p38 MAPK (Tikka et al., 2001; Tikka y Koistinaho, 2001), quinasa relacionada con la transducción de señales inflamatorias e importante regulador de la función inmunitaria y la muerte celular (Stirling et al., 2005). Otros efectos han sido descritos en modelos de desórdenes neurológicos, por ejemplo una menor liberación de moléculas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α (Yrjänheikki et al., 1998, 1999; Lee et al., 2003; Lee, Yune, et al., 2004) y mayor liberación de moléculas antiinflamatorias como IL-10, que aumenta su expresión debido al suministro de minociclina tras una lesión de médula espinal (Lee et al., 2003). Además, en un estudio *in vitro* se mostró que la minociclina atenúa la respuesta inflamatoria, por inhibición de fosfolipasas A2, catalizador enzimático de la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, con la consecuente liberación de ácido araquidónico, sustrato de la síntesis de prostaglandinas, lipoxinas y leucotrienos (Pruzanski et al., 1992). También disminuye la expresión de la sintasa de óxido nítrico (Yrjänheikki et al., 1998) e inhibe las metaloproteinasas de la matriz (sigla en inglés: MMP) (Yong et al., 2004), implicadas en desmielinización, neurotoxicidad y neuroinflamación (Yong et al., 2001). Por otra parte, la aplicación del fármaco tras una lesión del sistema nervioso previene la apoptosis, en parte por la inhibición de enzimas involucradas como las caspasas (Stirling et al., 2005). Fuera del sistema nervioso, la

minociclina interviene sobre las células T (Kloppenburger et al., 1995, 1996). La dosis de minociclina empleada en los tratamientos en roedores oscila entre los 10 y los 100 mg/kg, siendo habitual el uso de 50 mg/kg. Su vida media es de 2-3 horas, muy inferior a su vida media en humanos (15 h), debido a la alta tasa metabólica del hígado en los roedores (Yong et al., 2004). La acidez de la minociclina (pH 5), aunque se neutralice antes de la administración, produce irritación abdominal cuando se inyecta en el peritoneo, generando estrés y liberación de corticoesteroides (Nessler et al., 2002), lo que podría ser responsable del efecto atribuido a la inhibición de la activación microglial (Yong et al., 2004).

I. 2.2 Astroglía

Los astrocitos representan un grupo de células gliales muy abundante y heterogéneo del SNC. En torno al 20-40% del número total de células del encéfalo de mamíferos son astrocitos, con una importante variabilidad entre áreas cerebrales y especies (Herculano-Houzel, 2014). Tal como indica su nombre, los astrocitos tienen forma de estrella y largos procesos que ocupan la mayor parte del área celular (Reeves et al., 2011) (**Fig.I.5A**). Estos procesos, que mantienen contactos con vasos sanguíneos y sinapsis, son capaces de extenderse y retraerse en una escala de tiempo de minutos (Haber et al., 2006) y aumentar su movilidad en respuesta a la actividad sináptica (Bernardinelli et al., 2014). Los astrocitos se originan a partir de las células de andamiaje de la migración de neuronas, las denominadas células gliales radiales, que pueden diferenciarse directamente en astrocitos o en precursores intermediarios (Hof et al., 2008; Schitine et al., 2015).

Tradicionalmente, en base a la morfología y distribución, la astroglía se clasifica en astrocitos protoplasmáticos, presentes en la materia gris con procesos muy ramificados, y astrocitos fibrosos, localizados en la materia blanca con procesos menos complejos, muy largos y delgados (Andriezen, 1893; Miller y Raff, 1984). No obstante, recientes estudios muestran que el perfil transcripcional de los astrocitos varía en función de la región cerebral, la etapa del desarrollo y el reconocimiento de señales ambientales, lo que sugiere una mayor diversidad de poblaciones (Oberheim et al., 2012).

De forma similar a la microglía, las células de astroglía se distribuyen en territorios bien delimitados, como se observa en el hipocampo, donde el solapamiento entre los procesos es del 5% (Bushong et al., 2002) (**Fig.I.4A** y **Fig.I.5A**). De esta manera, cada porción de dendrita y cada sinapsis localizada en el dominio de un astrocito solamente pueden ser contactadas por los procesos de dicho astrocito. Así, la extensión de una única dendrita puede atravesar diferentes territorios astrogliales, y distintos segmentos de dendritas procedentes de diferentes neuronas pueden coincidir en un mismo territorio (Papouin et al., 2017).

Una característica importante de los astrocitos es su alto nivel de interconectividad celular a través de uniones de tipo gap entre sus procesos, que consisten en poros que conectan los citoplasmas de dos astrocitos mediante la unión de dos hemicanales. Los hemicanales

o conexiones están constituidos por seis proteínas pertenecientes a la familia de las conexinas, siendo Cx43 y Cx30 las más abundantes en astrogliá (Pannasch y Rouach, 2013). Así, los astrocitos forman extensas redes por las que circulan iones y metabolitos con una masa inferior a 1,5 kDa (Dallérac et al., 2013). Estudios de difusión de marcadores inyectados en un único astrocito sugieren que no todos están interconectados (Houades et al., 2006), aunque si bien es cierto, hay que tener en cuenta que la difusión a través de la red está sometida a regulación por moléculas diversas (Pannasch y Rouach, 2013; Anders et al., 2014), como endotelinas, cannabinoides y neurotransmisores (Giaume et al., 2010).

I. 2.2.1 Funciones astrogliales

Los astrocitos han sido considerados como las principales células de soporte para el mantenimiento de las neuronas del SNC. En los últimos años, se ha descubierto que los astrocitos también participan en otras funciones. Entre las principales destacan la homeostasis de iones, agua y glutamato, la defensa frente al estrés oxidativo, el almacenamiento de energía, la formación de la cicatriz glial, la reparación de tejidos, síntesis y secreción de factores tróficos, organización de la barrera hematoencefálica, la modulación de la actividad sináptica mediante liberación de sustancias neuroactivas, el remodelado y participación en la formación de sinapsis, etc. (Bélanger et al., 2011; Schitine et al., 2015). Muchas de estas funciones desempeñadas por astrocitos dependen de la actividad neuronal. Para reconocer cambios en la actividad de las neuronas, así como señales procedentes de otros tipos celulares y variaciones en el ambiente, los astrocitos presentan canales iónicos de K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} (Barres, 1991; Verkhratsky y Steinhäuser, 2000), transportadores como el implicado en la recaptación de glutamato liberado en la sinapsis y variedad de receptores para neurotransmisores y neuromoduladores (receptores ionotrópicos y metabotrópicos de purinas y glutamato, receptor $GABA_A$, receptores nicotínicos y muscarínicos de acetilcolina, receptor de endocannabinoides CB1, receptor de serotonina $5-HT_{1A}$, receptores α y β de noradrenalina, receptor de dopamina D2, receptores que reconocen BDNF, IL- 1β , oxitocina, S100- β , la hormona de liberación de corticotropinas...). Si bien es cierto, la presencia de algunas moléculas sólo se han descrito a nivel funcional siendo necesario confirmar su expresión (Moraga-Amaro et al., 2014).

I. 2.2.1.1 Señales intracelulares de Ca^{2+} . Diversidad y funciones asociadas

Cuando un astrocito reconoce actividad neuronal, genera incrementos en el nivel de Ca^{2+} intracelular que pueden extenderse a lo largo de la red astrogliá como ondas de Ca^{2+} (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991). Distintos neurotransmisores y otras moléculas como neuromoduladores y hormonas inducen estas señales (Duffy y MacVicar, 1995; Bezzi et al., 1998; Shelton y McCarthy, 2000; Araque et al., 2002). Las señales de Ca^{2+} están implicadas en muchas de las funciones astrogliales que dependen de la actividad sináptica como la liberación de sustancias neuroactivas (Araque et al.,

2014), la regulación de la incorporación de neurotransmisores (Shigetomi et al., 2011), el control del diámetro de los vasos sanguíneos (Attwell et al., 2010), la regulación de la expresión génica, la incorporación de K^+ extracelular (Filosa et al., 2006), el movimiento de los procesos perisinápticos (Bernardinelli et al., 2014), la sincronización neuronal (Sasaki et al., 2014) y la liberación de componentes sinaptogénicos y factores tróficos (Eroglu y Barres, 2010; Clarke y Barres, 2013). No obstante, algunas de estas funciones también pueden llevarse a cabo por otros mecanismos independientes de las señales de Ca^{2+} .

El hecho de que un mismo fenómeno fisiológico, como el aumento de la concentración de Ca^{2+} , esté implicado en diferentes funciones insinúa la existencia de variables que van a diferenciar unas señales de Ca^{2+} de otras. Estas son la amplitud y la frecuencia de los picos de Ca^{2+} o el espacio confinado en el que se produce el incremento (un microdominio, la célula completa o incluso la extensión de la señal a lo largo de diferentes células de la red astrogliar) (Rusakov et al., 2014; Khakh y Sofroniew, 2015). Por ejemplo, la vasodilatación requiere de incrementos de Ca^{2+} en los pies vasculares, que son los procesos astrogliales que contactan con los vasos sanguíneos (Halassa y Haydon, 2010). Otra distinción importante es la fuente de la que procede el Ca^{2+} como son los almacenes internos del retículo endoplasmático que liberan Ca^{2+} tras la activación de receptores por inositol trifosfato o el Ca^{2+} procedente del espacio extracelular que atraviesa la membrana plasmática a través de los canales de receptores de potencial transitorio (sigla en inglés: TRP) (Malarkey et al., 2008; Shigetomi et al., 2013) (**Fig.I.6**). A su vez, el perfil transcripcional del astrocito podría influenciar sobre la expresión de elementos implicados en la transducción de las señales extracelulares en cambios sobre el nivel de Ca^{2+} citosólico. En definitiva, la señal de Ca^{2+} tiene múltiples patrones y cinéticas, las cuales dependen del sistema sináptico reconocido (Perea y Araque, 2005), el patrón y la frecuencia de su actividad (Pasti et al., 1997; Todd et al., 2010). Por ejemplo, una actividad sináptica de alta frecuencia o la suma de la actividad de varias aferencias neuronales induce una respuesta de Ca^{2+} global, mientras que una actividad sináptica de baja frecuencia produce una respuesta local confinada a pequeños microdominios celulares (Araque et al., 2014). Esto tiene especial relevancia en la gliotransmisión, es decir en la liberación por los astrocitos de sustancias neuroactivas llamadas gliotransmisores, ya que en función de la extensión de la señal de Ca^{2+} , el astrocito va a modular desde la propia actividad sináptica responsable de su activación hasta neuronas distantes contactadas por otro microdominio del astrocito o incluso por otra célula de la red (**Fig.I.5B**). De esta manera, el astrocito puede actuar como un puente en la comunicación intersináptica. La complejidad de las señales de Ca^{2+} en respuesta a la actividad neuronal, podría ser un indicio de la capacidad de la astrogliar para codificar la información reconocida (Araque et al., 2014).

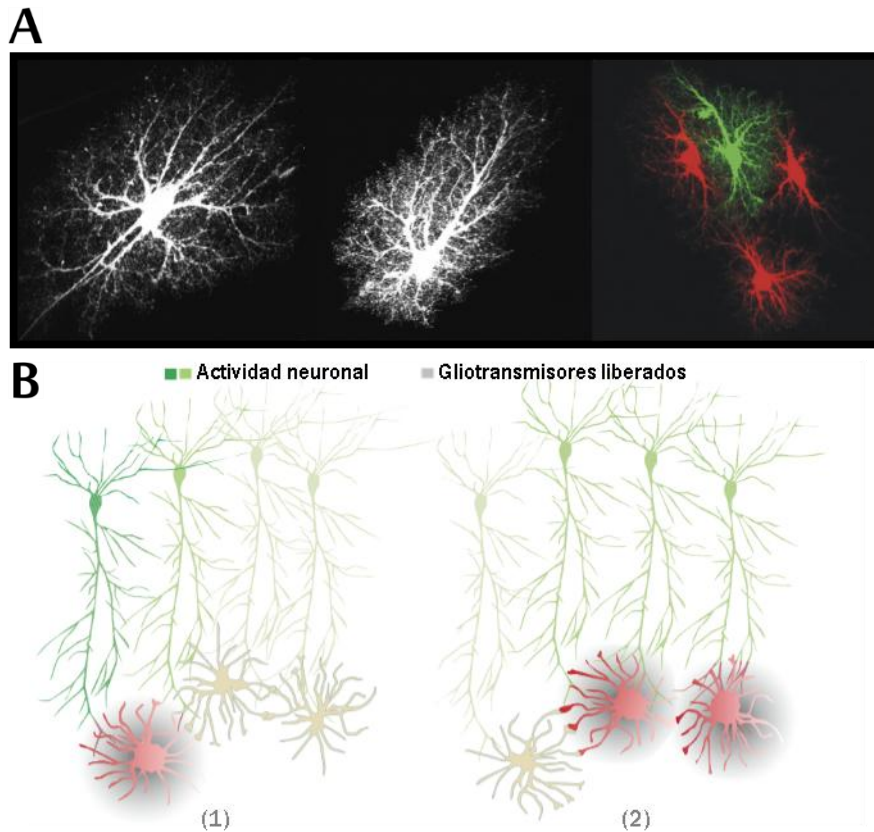


Figura I.5. Morfología, distribución de astrocitos y gliotransmisión de la red astroglial. (A) La morfología de los astrocitos es compleja. Mediante marcaje fluorescente de astrocitos de CA1 se puede observar el soma y varias ramificaciones principales de las que emergen miles de delgados procesos. El territorio ocupado por los astrocitos está bien definido, de manera que el solapamiento entre células vecinas (verde y rojo) es bastante pequeño y queda restringido a sus procesos. Modificado de Khakh y Sofroniew, 2015. (B) La actividad de las neuronas localizadas en el dominio de un astrocito puede desencadenar la liberación de gliotransmisores (como glutamato, D-serina, ATP, etc.) capaces de modular la actividad de las sinapsis de su territorio (1) o de otro adyacente si la respuesta astroglial se extiende a otra célula de la red (2). Así, la red astroglial puede coordinar redes neuronales por activar neuronas distales. Otras funciones astrogliales desencadenadas por la actividad neuronal son la regulación del nivel de K^+ extracelular y la recaptación de neurotransmisores, evitando así la activación inespecífica de células vecinas (no mostrado). Modificado de Pannasch y Rouach, 2013.

I. 2.2.1.2 Protección frente al estrés oxidativo y respuesta astroglial ante una lesión

El sistema nervioso es particularmente sensible al daño oxidativo. Paradójicamente las neuronas, las células con una mayor tasa oxidativa, presentan una menor protección *per se* contra el estrés oxidativo. Son los astrocitos los que cubren ese déficit. En estudios *in vitro*, cultivos de astrocitos muestran una mayor resistencia a agentes oxidantes como H_2O_2 que los cultivos de neuronas. Además, en cultivos mixtos de ambos tipos celulares, los astrocitos también protegen a las neuronas vecinas (Bélanger et al., 2011). Tanto astrocitos como neuronas sintetizan la molécula antioxidante más abundante en el

encéfalo, el tripéptido glutatión (GSH), sin embargo su síntesis en neuronas requiere de precursores transferidos por astrocitos (Dringen, 2000; Chen et al., 2001). Otro mecanismo conocido consiste en la transferencia de ácido ascórbico desde el astrocito a la neurona en respuesta a la actividad glutamatérgica, que a su vez favorece la incorporación de lactato frente al consumo oxidativo de glucosa (Castro et al., 2009).

Los astrocitos responden a diferentes formas de daño y enfermedad mediante modificaciones celulares, moleculares y funcionales conocidas como astrogliosis reactiva. Según su funcionalidad existen dos tipos de astrogliosis reactiva, los astrocitos formadores de la cicatriz y los astrocitos hipertróficos (Khakh y Sofroniew, 2015). Los primeros corresponden a astrocitos de nueva proliferación, que no ocupan un territorio individual discreto y que presentan un mayor solapamiento entre sus procesos (Wanner et al., 2013); construyen la cicatriz glial que separa el tejido dañado del tejido sin afectar (Burda y Sofroniew, 2014; Sofroniew, 2015). Los astrocitos preexistentes a la lesión sufren astrogliosis reactiva hipertrófica sin variar su localización, y continúan interactuando con las mismas células vecinas de antes de la lesión (Wilhelmsson et al., 2006). Estos procesos de astrogliosis son necesarios para confinar el tejido dañado y preservar la función del sistema nervioso tras el daño, pese a que en determinadas ocasiones pueden tener efectos negativos (Khakh y Sofroniew, 2015).

Otras funciones astrogliales están relacionadas indirecta o directamente con la modulación que ejerce la astrogliosis sobre la transmisión sináptica. Estas son algunas de ellas:

1. 2.2.1.3 *Soporte energético y regulación del nivel de K^+ extracelular*

Es sabido que el mantenimiento y restauración de gradientes iónicos en el sistema nervioso, así como la incorporación y restauración de neurotransmisores, supone un gran gasto de energía. El encéfalo que constituye un 2% de la masa corporal, necesita del 20% de oxígeno y del 25% de glucosa que consume el organismo humano (Magistretti, 2006). Los astrocitos son necesarios para satisfacer estos altos requerimientos energéticos de las neuronas. Tales requerimientos metabólicos son abastecidos no sólo por metabolismo oxidativo (respiración aerobia) en las neuronas, sino también por catabolismo sin necesidad de oxígeno (glucólisis) en los astrocitos. Esto se dedujo a partir del hecho de que cuando hay un aumento en la actividad cerebral, el incremento de flujo sanguíneo y del índice de consumo de glucosa no presenta una correlación directa con el consumo de oxígeno (Fox y Raichle, 1986; Fox et al., 1988).

Estudios en neurotransmisión glutamatérgica han descrito que a pesar de que la tasa oxidativa es mayor en las neuronas que en las células de astrogliosis (Lebon et al., 2002; Itoh et al., 2003; Bouzier-Sore et al., 2006), son estas últimas quienes incorporan mayor cantidad de glucosa tras un aumento de la actividad neuronal (Barros et al., 2009; Chuquet et al., 2010; Steinman et al., 2016). Esta mayor incorporación de glucosa en el astrocito

tiene una doble función, el aporte de sustrato energético a la neurona y la eliminación de glutamato extracelular. La glucosa en el astrocito genera lactato y adenosín trifosfato (ATP) mediante glucólisis. El lactato es incorporado por la neurona para su oxidación completa en las mitocondrias (Pellerin et al., 2007; Magistretti, 2009) y el ATP permanece en el astrocito para alimentar a la bomba de Na^+/K^+ ATPasa que expulsa a los iones de Na^+ que han sido importados con la entrada de glutamato extracelular (Magistretti y Chatton, 2005). Por tanto, la incorporación de glucosa está relacionada con la recaptación de glutamato, por lo que si se reduce la expresión del transportador de glutamato acoplado a sodio (sigla en inglés: GLT-1), el uso de glucosa se ve afectado (Cholet et al., 2001; Voutsinos-Porche et al., 2003; Porrás et al., 2004; Herard et al., 2005). De hecho, la privación de glucosa en rodajas de hipocampo supone un 50% de depresión en la transmisión sináptica que es recuperado cuando se incorpora el monosacárido en un único astrocito (Rouach et al., 2008).

El aporte metabólico que ejerce la astrogliá sobre las neuronas depende de actividad, de tal manera que un aumento en la actividad glutamatérgica suscita una demanda energética que estimula la vasodilatación mediada por astrocitos y el transporte de glucosa por la red astrogliá a través de uniones de tipo gap, desde las zonas de mayor concentración de glucosa (vasos sanguíneos) a las de menor concentración (foco de actividad) (Rouach et al., 2008).

El encéfalo aunque consume mucha energía apenas dispone de reservas. Los astrocitos constituyen el principal almacén, gracias a la glucogénesis. El glucógeno permite un fácil acceso a la glucosa y a diferencia de las reservas de grasa del organismo permite la obtención de ATP sin necesidad de oxígeno (Bélangier et al., 2011). El metabolismo del glucógeno está regulado por mecanismos neuronales (Allaman et al., 2000, 2003). Por ejemplo, ante un aumento de la demanda energética, la noradrenalina activa una vía de señalización astrogliá de AMPc, detonante de la rotura del glucógeno en glucosa, para posterior transformación en lactato y transferencia a neuronas (Sorg y Magistretti, 1991; Halassa y Haydon, 2010).

La transmisión de la señal eléctrica en las neuronas libera K^+ al espacio extracelular. Su eliminación es crucial para recuperar el potencial de membrana basal y permitir la excitación nerviosa. Desde 1965 se conoce la rápida incorporación del K^+ por las células astrogliáles (Hertz, 1965). Están implicados los canales de rectificación de entrada de K^+ (como K_{ir} 4.1, que sólo se expresa en los procesos), transportadores de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, canales de K^+ de dos poros (K2P) y la bomba de Na^+/K^+ ATPasa (Dallérac et al., 2013), siendo esta última la principal responsable (Larsen et al., 2014). La modificación de los niveles de K^+ extracelular modula la transmisión eléctrica, ya que variaciones en su concentración alejan o acercan el potencial de membrana neuronal al umbral de disparo del potencial de acción (Wang et al., 2012; Haydon y Nedergaard, 2015).

I. 2.2.1.4 *Recaptación y liberación de sustancias neuroactivas*

La membrana celular de los astrocitos presenta transportadores encargados de la incorporación de neurotransmisores liberados a la hendidura sináptica como glutamato (Anderson y Swanson, 2000; Olié et al., 2001), GABA (Schousboe, 2000) y glicina (Aroeira et al., 2014), evitando así que difundan a neuronas vecinas o que interfieran en futuras sinapsis; de esta manera, los astrocitos pueden modular la transmisión sináptica, controlando la vida media de los neurotransmisores. Además, el glutamato incorporado es metabolizado por la astrogliá generando glutamina que tras liberarla es incorporada por las neuronas para la síntesis de glutamato y GABA (Hertz y Zielke, 2004). Los terminales GABAérgicos presentan una reserva de glutamina muy limitada, por lo que necesitan del aporte del precursor por los astrocitos. La inhibición farmacológica de la glutamina sintetasa, encargada de la conversión del glutamato en glutamina en la astrogliá, afecta a la transmisión sináptica inhibitoria bajo condiciones de elevada actividad (Liang et al., 2006). Como consecuencia de la sobreexcitación resultante se pueden producir convulsiones (Bernard-Helary et al., 2000; Bernard-Hélarly et al., 2002) y perjudicar al procesamiento de la información, lo que se piensa que contribuye a un elevado número de desórdenes psiquiátricos (Lewis y Hashimoto, 2007). Dado que la astrogliá es la única fuente de glutamina de las neuronas GABAérgicas, los astrocitos tienen el potencial para controlar la actividad neuronal y el procesamiento de la información por modular las vías de inhibición (Halassa y Haydon, 2010).

Aparte de la incorporación y reciclaje de neurotransmisores, los astrocitos modulan de forma directa la transmisión sináptica, mediante la liberación de sustancias neuroactivas que provocan cambios funcionales y morfológicos en las sinapsis; son conocidas como gliotransmisores, entre los que se encuentran el glutamato, ATP, D-serina, GABA, adenosina y glicina, y otras moléculas como TNF- α , BDNF, taurina y glutatión (Moraga-Amaro et al., 2014). Los gliotransmisores son reconocidos por receptores neuronales que tras su activación regulan la liberación del neurotransmisor o modifican el potencial de membrana y por tanto la excitabilidad de la neurona y la transmisión sináptica (Kang et al., 1998; Fellin et al., 2004; Pascual et al., 2005; Perea y Araque, 2005, 2007, Panatier et al., 2006, 2011; Henneberger et al., 2010; Navarrete y Araque, 2010; Di Castro et al., 2011; Fossat et al., 2012). La acción de un único gliotransmisor puede desencadenar diferentes respuestas en función del circuito neuronal que lo reconozca, el subtipo de receptor y su localización en un terminal presináptico o postsináptico. Además, una misma población astrogliá puede liberar diferentes gliotransmisores, por lo que un mismo conjunto de astrocitos puede generar distintos efectos sobre el circuito (Araque et al., 2014).

La exocitosis neuronal de glutamato en sinapsis hipocámpales produce oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en el astrocito que puede desencadenar la liberación de glutamato (Porter y McCarthy, 1996). El glutamato astrogliá activa receptores metabotrópicos presinápticos induciendo mayor exocitosis de glutamato neuronal vía inositol trifosfato

(Fiacco y McCarthy, 2004), también se une a receptores de kainato presinápticos (Liu et al., 2004) y receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos (Fellin et al., 2004).

El gliotransmisor ATP puede regular la actividad sináptica directamente o a través de su producto metabólico adenosina (Dias et al., 2013). En las sinapsis entre neuronas de CA3 y las neuronas piramidales de CA1 vía colaterales de *Schaffer*, la liberación de glutamato activa receptores metabotrópicos en los astrocitos circundantes, provocando la liberación de ATP que suprime a las sinapsis glutamatérgicas vecinas, vía receptores neuronales P2Y o a través de su producto metabólico adenosina (Zhang et al., 2003). Además, el GABA de interneuronas activadas de CA1 estimula la liberación de ATP por los astrocitos vía receptores GABA_B, que tras la acción de ectonucleotidasas es transformado en adenosina, responsable de la depresión heterosináptica vía receptores A₁, como ha sido descrito bajo un protocolo de estimulación de alta frecuencia (Serrano et al., 2006). Por otro lado, es sugerido que el ATP también participa como señal mediadora de la propagación de las ondas de Ca²⁺ a lo largo de la red astrogial. El medio de cultivo de astrocitos que han exhibido ondas de Ca²⁺ contiene más ATP que el medio control; además, la transferencia del medio sobre astrocitos induce ondas de Ca²⁺ que son inhibidas por antagonistas de receptores purinérgicos (Guthrie et al., 1999).

La astroglia también libera moléculas relacionadas con inflamación que a su vez parecen intervenir en otros procesos como son IL-1 β (Sugama et al., 2011) y TNF- α (Omran et al., 2013). La escisión del gen que codifica la interleuquina afecta al rendimiento del roedor en el laberinto de Morris y en el paradigma de miedo condicionado (Avital et al., 2003). TNF- α regula la liberación de glutamato y la inserción de receptores AMPA en la membrana de neuronas hipocampales (Ogoshi et al., 2005); de hecho, ratones TNF- α ^{-/-} tienen afectada la memoria en el laberinto de Barnes (Camara et al., 2013). Pese al reconocimiento de la expresión de citoquinas en astroglia, conviene considerar la contaminación de los cultivos de astrocitos con células microgliales, posiblemente la principal fuente de citoquinas del SNC (Welser-Alves y Milner, 2013). Debido al uso de ratones *knockouts* no condicionales no podemos elucidar la relevancia de cada tipo celular en los trabajos mencionados. Otras moléculas como la taurina (Choe et al., 2012), el lactato (Brown y Ransom, 2007), componentes sinaptogénicos y factores tróficos (Eroglu y Barres, 2010; Clarke y Barres, 2013) son también liberadas por los astrocitos.

A pesar de la proximidad de los procesos gliales a los elementos sinápticos, la distancia que tiene que recorrer el neurotransmisor para ser reconocido por el astrocito es mayor que la distancia que lo separa de la neurona postsináptica, lo que supone que los niveles de neurotransmisor decrecen conforme nos alejamos de la hendidura sináptica hacia los astrocitos. Es sugerido que a pesar de la baja concentración de neurotransmisores a su alrededor, la astroglia es capaz de reconocer la actividad neuronal gracias a la expresión de receptores con una alta afinidad por el ligando y lenta desensibilización. Por ejemplo, el glutamato es mejor reconocido por el receptor metabotrópico mGluR5 que por el receptor AMPA que presenta baja afinidad y rápida desensibilización. También ha sido descrito el reconocimiento de la acetilcolina por receptores muscarínicos en lugar de

receptores nicotínicos que se inactivan más rápidamente. Asimismo, el neurotransmisor GABA activa receptores GABA_B en el astrocito. Por otro lado, en el cerebelo, se ha descrito la liberación del neurotransmisor fuera de la hendidura sináptica, directamente sobre el astrocito (Araque et al., 2014).

Dado que la comunicación neurona-astrocito es bidireccional (Santello et al., 2012), la detección de las señales astrogliales por las neuronas está sometida a las mismas limitaciones, es decir que el reconocimiento de los gliotransmisores por los receptores de la hendidura sináptica se ve dificultado por el decrecimiento en la concentración del transmisor con la distancia. Sin embargo, las neuronas disponen de receptores fuera de la sinapsis con un mejor acceso al gliotransmisor. Es el caso del glutamato glial que es reconocido por receptores metabotrópicos y NMDA de la neurona presináptica así como receptores NMDA postsinápticos que contienen la subunidad GluN2B. A su vez, la afinidad por el ligando de estos receptores es elevada y su desensibilización es lenta (Araque et al., 2014).

Otro mecanismo mediante el cual la astroglia modula la transmisión sináptica consiste en el control del volumen extracelular que rodea a la sinapsis. De este modo, la red astrogliar puede controlar los niveles de sustancias neuroactivas y su difusión (Piet et al., 2004; Nagelhus y Ottersen, 2013).

I. 2.2.1.4.1 Vías de liberación de gliotransmisores

La liberación de gliotransmisores se lleva a cabo por distintas vías, algunas de ellas reguladas por Ca²⁺ (**Fig.I.6**). Por ejemplo, se ha descrito la liberación de glutamato por exocitosis (Montana et al., 2006; Parpura y Zorec, 2010), mediante el transportador implicado en la recaptación de glutamato funcionando a la inversa (Szatkowski et al., 1990), a través de transportadores acoplados al transporte de iones (Kimelberg et al., 1990), vía receptor ionotrópico purinérgico (Duan et al., 2003), mediante antiportador de cistina/glutamato (Warr et al., 1999) y a través de hemicanales (Ye et al., 2003). Aún se necesita investigar bajo qué circunstancias participa una vía u otra. En cultivos de astrocitos se han detectado vesículas y lisosomas que contienen ATP (Coco et al., 2003; Zhang et al., 2007; Verderio et al., 2012) y vesículas con D-serina (Mothet et al., 2005; Bergersen et al., 2012; Martineau et al., 2013), además de vesículas con transportadores de glutamato (Bezzi et al., 2004; Montana et al., 2004; Zhang et al., 2004). Es posible que el ATP también sea liberado a través de hemicanales formados por conexinas 43 (Kang et al., 2008). De hecho, bloqueadores del hemicanal o *knockouts* para Cx43/Cx30 interrumpen la liberación de ATP al espacio extracelular (Torres et al., 2012).

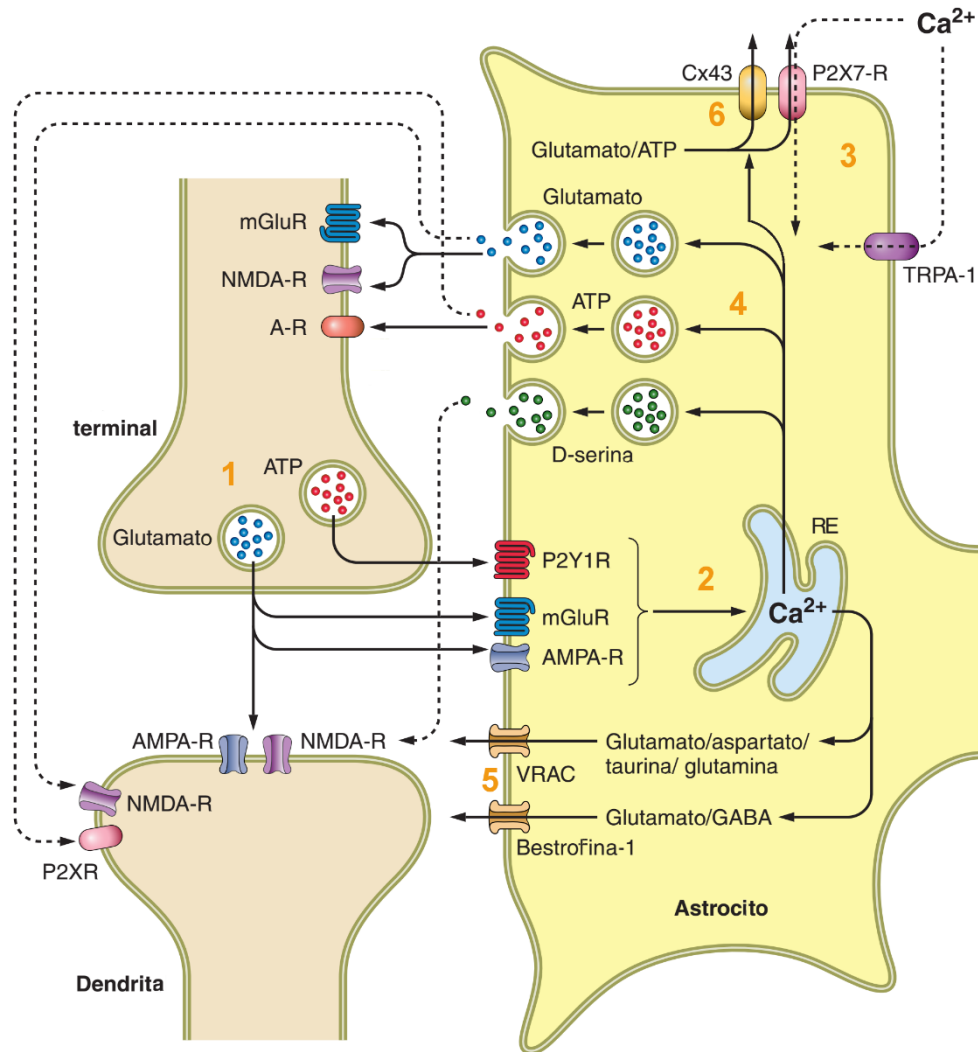


Figura I.6. Producción de señales de Ca^{2+} y gliotransmisión.

Esquema simplificado de la comunicación bidireccional entre una sinapsis y un proceso astroglial adyacente, en el que se representan los mecanismos que conducen a un incremento del Ca^{2+} intracelular y a la liberación de gliotransmisores. (1) La liberación de glutamato y ATP por el terminal nervioso presináptico conduce a la activación en astrocitos de receptores metabotrópicos de glutamato y ATP, y en algunos casos del receptor ionotrópico AMPA. (2) La activación conduce a la movilización hacia el citoplasma del Ca^{2+} contenido en los almacenes internos del retículo endoplasmático (RE). (3) No obstante, existen otra vías capaces de aumentar el nivel de Ca^{2+} citosólico como la entrada de Ca^{2+} extracelular vía receptores P2X y canales TRP. Es más, el estudio de los delgados procesos astrogliales ha revelado señales de Ca^{2+} independientes de los almacenes internos del soma, posiblemente originadas en parte por receptores ionotrópicos (Papouin et al., 2017). La señal de Ca^{2+} está implicada en funciones diversas incluyendo la liberación de gliotransmisores (p.e. glutamato, D-serina, ATP) mediante (4) exocitosis u (5) otros mecanismos regulados por Ca^{2+} como los canales de aniones bestrofina-1 y VRAC (del inglés, canales iónicos regulados por volumen), (6) hemicanales o sistemas independientes de Ca^{2+} como receptores purinérgicos P2X o el transportador de la recaptación de glutamato funcionando a la inversa (no mostrado). Los gliotransmisores liberados pueden actuar sobre receptores de los terminales presinápticos y postsinápticos, teniendo un mejor acceso a aquellos localizados fuera de la hendidura sináptica. Aun así la D-serina, al contrario que la glicina, parece unirse más a receptores NMDA sinápticos que extrasinápticos (Papouin et al., 2012). La expresión de receptores afines a gliotransmisores por otros tipos celulares como la microglía, amplía el grado de interacción de los astrocitos con sus células vecinas. La ilustración no distingue entre microdominios celulares. Modificado de Gunderson et al., 2015.

I. 2.2.2 Astroglía, comportamiento y memoria

A pesar del importante avance en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que sustentan las diferentes funciones astrogliales y su repercusión sobre la transmisión sináptica, recién hemos comenzado a desentrañar las consecuencias de la interacción astrocito-neurona en el comportamiento (Oliveira et al., 2015), como ejemplificaremos a continuación.

La astroglía está vinculada con la conducta de búsqueda de droga. La abstinencia en ratas consumidoras de cocaína provoca una disminución en la actividad del antiportador de cistina/glutamato en astrocitos del núcleo accumbens, área relacionada con el sistema de recompensa, lo que produce una disminución en los niveles de glutamato extracelular, causante de la recaída en el consumo. La activación del transportador por administración de N-acetilcisteína previene la recaída (Baker et al., 2003).

Estímulos visuales (Schummers et al., 2008; Chen et al., 2012), olfativos (Gurden et al., 2006) y táctiles (Takata et al., 2011) son reconocidos por los astrocitos; por ejemplo, la estimulación de una sola vibrisa de ratón genera 3 segundos más tarde una señal de Ca^{2+} en astrocitos localizados en el campo de barriles de la corteza somatosensorial. Para ello, se produce la activación de receptores metabotrópicos de glutamato, que vía proteína G activan a la fosfolipasa C, originando así inositol trifosfato, ligando de receptores del retículo endoplasmático, cuya activación provoca la salida de Ca^{2+} al citoplasma (Wang et al., 2006).

Como hemos visto anteriormente, la astroglía dispone de sistemas que le capacitan para modular la transmisión sináptica. El reconocimiento de neurotransmisores, mensajeros retrógrados (p.e. endocannabinoides) y neuromoduladores (p.e. acetilcolina, noradrenalina) estimulan la liberación de gliotransmisores, que al activar receptores de la neurona presináptica modifica la probabilidad de exocitosis, y al unirse a receptores de dentro y fuera del terminal postsináptico, altera el grado de activación de los receptores (p.e. D-serina - receptor NMDA), el grado de despolarización de la membrana y el número de receptores. De esta manera, la gliotransmisión junto con otros procesos astrogliales como la eliminación del K^+ , permiten la regulación de eventos de plasticidad sináptica por los astrocitos (Haydon y Nedergaard, 2015; De Pittà et al., 2016). Así, neuromoduladores derivados de astrocitos modifican la respuesta al protocolo de inducción de LTP. Por ejemplo, la activación de receptores neuronales metabotrópicos por glutamato astrogliar posibilita la LTP inducida por estimulación de la actividad colinérgica, a través de un mecanismo que implica la activación de receptores muscarínicos (mAChR) y la elevación del Ca^{2+} intracelular astrogliar (Navarrete et al., 2012). Por otro lado, el tratamiento con fluoroacetato, inhibidor del metabolismo astrogliar (Swanson y Graham, 1994), afecta a la LTP en CA1 a menos que se aplique D-serina exógena (Han et al., 2015). Dado que los mecanismos de plasticidad sináptica son el candidato principal en el que se apoyan los procesos de aprendizaje y memoria, cabe pensar en la posible implicación de la astroglía en esta faceta del comportamiento animal.

Además, es preciso resaltar que en el hipocampo de ratas, en torno al 60% de las sinapsis son directamente contactadas por astrocitos protoplasmáticos (Ventura y Harris, 1999; Witcher et al., 2007). Concretamente, el territorio ocupado por un astrocito del hipocampo de roedores contiene unas 140.000 sinapsis procedentes de 100 neuronas (Bushong et al., 2002) y entre 270.000 y 2 millones de sinapsis en el córtex humano (Oberheim et al., 2009), lo que otorga a la astroglia la posibilidad de modular miles de sinapsis en una región cerebral íntimamente ligada a la formación de la memoria explícita. Si bien es cierto, el número de sinapsis que ocupan el territorio de un astrocito y la distancia de sus procesos con respecto a los elementos sinápticos varía entre áreas y ante la presencia de una lesión (Khakh y Sofroniew, 2015). Asimismo, las espinas dendríticas contactadas por procesos astrogliales perisinápticos son más grandes que las no contactadas, indicio de un fortalecimiento ocasionado por los astrocitos (Bourne y Harris, 2008).

Por otro lado, a lo largo del circuito trisináptico hipocampal han sido reconocidas diferencias funcionales entre los astrocitos (Khakh y Sofroniew, 2015). En el giro dentado (GD), se producen dos tipos de señales de Ca^{2+} : focal y expandida. La primera provocada por la liberación espontánea de neurotransmisores y la segunda por potenciales de acción. Ambas señales son mediadas por los almacenes internos de Ca^{2+} regulados por inositol trifosfato en respuesta a ATP sináptico, pues antagonistas para el receptor $P2Y_1$ reduce ambos tipos de señal. Es sugerido que la señal de Ca^{2+} en astrocitos del GD regula la probabilidad de liberación de neurotransmisores sobre las células granulares (Di Castro et al., 2011). En cambio, en CA3 los astrocitos sólo responden ante ráfagas intensas de potenciales de acción evocados en los axones de las fibras musgosas, mostrando señales de Ca^{2+} que abarcan gran parte de la célula y que están mediadas por receptores $mGluR2/3$ (Haustein et al., 2014). Por consiguiente, estas señales globales no regulan sinapsis localmente, sino que ejercen su modulación a nivel de circuito, permitiendo la sincronización de la red neuronal (Sasaki et al., 2014). La astroglia de la subregión CA3 envuelve sinapsis completas, una particularidad infrecuente en el resto del tejido cerebral donde los astrocitos envainan principalmente el elemento postsináptico (p.e. una espina) (Papouin et al., 2017). En astrocitos de CA1, la estimulación mínima de las colaterales de *Schaffer* genera respuestas de Ca^{2+} en las ramificaciones, mediada por la activación del receptor metabotrópico $mGluR5$. Es propuesto que el incremento de Ca^{2+} provoca la liberación de ATP que transformado en adenosina se une a los receptores A_{2A} presinápticos regulando la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Panatier et al., 2011). Asimismo, la proximidad de los procesos astrogliales con las sinapsis en CA1 es mayor que en CA3 (Haustein et al., 2014).

A nivel conductual, bajo el paradigma de evitación pasiva, la formación de memoria duradera (MLP) requiere de la transferencia de lactato, procedente de la lisis del glucógeno en astrocitos, a las neuronas. La inyección intrahipocampal de un inhibidor de la glucogenolisis, 15 minutos antes o justo después de la sesión de entrenamiento, afecta a la formación de la MLP sin perjudicar a la MCP. El efecto es bloqueado si se coadministra el inhibidor con lactato exógeno. Además, la inhibición transitoria del

transportador responsable de la salida de lactato del astrocito, el transportador de monocarboxilato 4 (MCT4), o del transportador de entrada a la neurona, MCT2, corrobora el transporte entre ambos tipos celulares (Suzuki et al., 2011). Conclusiones similares se obtuvieron utilizando un paradigma de memoria espacial (Newman et al., 2011).

Dada la relevancia de la astroglia en el correcto funcionamiento del sistema nervioso, su disfunción está relacionada con desórdenes neurológicos. Varios estudios muestran como la alteración de proteínas relacionadas con la gliotransmisión (p.e. transportadores vesiculares) pueden causar desórdenes neurológicos y comportamientos anormales (Rossi et al., 2011; Verkhratsky et al., 2014). Por ejemplo, es sugerido que la mutación en astrocitos del gen que codifica el factor de transcripción MeCP2 (del inglés, *methyl-CpG binding protein 2*) inhibe la secreción de moléculas implicadas en desarrollo, posible causa del síndrome de Rett (Ballas et al., 2009). También, la esquizofrenia ha sido vinculada con una secreción deficiente del gliotransmisor D-serina (Basu et al., 2009; Labrie y Roder, 2010; Van Horn et al., 2013). Estudios sobre pacientes muestran mutaciones en genes relacionados con su síntesis (serina racemasa) y degradación (D-amino oxidasa) (Boks et al., 2007; Morita et al., 2007; Müller et al., 2011; Caldinelli et al., 2013). De hecho, el tratamiento con D-serina reduce los déficits cognitivos en pacientes esquizofrénicos (Labrie y Roder, 2010).

I. 2.2.3 Astroglia y D-serina

Uno de los transmisores que parece participar en la comunicación entre astrocitos y neuronas es la D-serina. Su descubrimiento fue excepcional pues se pensaba que en mamíferos sólo había L-aminoácidos (Hashimoto et al., 1992; Nagata et al., 1992). La D-serina es un coagonista endógeno del sitio de unión de glicina del receptor NMDA (Mothet et al., 2000), cuya unión facilita la activación de este. Así, su concentración en la hendidura sináptica controla el nivel de receptores NMDA disponibles para ser activados por el neurotransmisor (Oliet y Mothet, 2009). De hecho, la D-serina se localiza en astrocitos de áreas cerebrales que presentan altos niveles de receptores NMDA (Schell et al., 1997), lo que sugiere su participación en procesos en los que intervienen tales receptores (Danysz y Parsons, 1998): despolarización, influjo de Ca^{2+} , producción de GMPC, muerte neuronal, excitotoxicidad, LTP, aprendizaje y memoria (Nishikawa, 2011). La interacción astrocito-sinapsis mediada por D-serina ha sido descrita en varias regiones como hipotálamo (Pantatier et al., 2006) e hipocampo (Henneberger et al., 2010), y resulta esencial para un adecuado establecimiento de las conexiones sinápticas y regulación de la arquitectura dendrítica (Rabacchi et al., 1992; Sin et al., 2002; Espinosa et al., 2009; Balu y Coyle, 2012; Diniz et al., 2012). Además, la D-serina parece intervenir sobre la vasodilatación (Stobart et al., 2013).

La presencia de D-serina ha sido detectada en astrocitos (Schell et al., 1995), neuronas (Yasuda et al., 2001; Kartvelishvily et al., 2006; Williams et al., 2006) y microglía (Wu et al., 2004; Williams et al., 2006). Es sintetizada a partir de L-serina mediante la enzima

serina racemasa (Wolosker, Blackshaw, et al., 1999; Wolosker, Sheth, et al., 1999; De Miranda et al., 2002), cuya expresión es similar a la del aminoácido (Nishikawa, 2011), siendo localizada en astrocitos (Scianni et al., 2013) y neuronas (Kartvelishvily et al., 2006). La eliminación génica de la serina racemasa produce un marcado descenso en el nivel de D-serina (Inoue et al., 2008; Basu et al., 2009; Labrie, Fukumura, et al., 2009). Aun así, otros sistemas podrían estar implicados (Nishikawa, 2011).

La liberación de D-serina por astrocitos parece ocurrir por exocitosis de manera dependiente de Ca^{2+} . De hecho, la toxina del tétano, bloqueadora de la exocitosis, o inhibidores de ATPasas vesiculares suprimen su liberación. Además, vesículas contenedoras de VAMP2/3 y VGLUT2 son colocadas con D-serina (del inglés, proteína de membrana asociada a vesícula y transportador vesicular de glutamato respectivamente) (Mothet et al., 2005; Martineau et al., 2013). En cultivo de astrocitos, la activación por ligando o agonistas de receptores AMPA, kainato y receptores metabotrópicos de glutamato incrementa la exocitosis de D-serina (Mothet et al., 2005). Otros mecanismos podrían estimular la liberación de D-serina. Por ejemplo, el bloqueo o eliminación de los canales TRPA1 reduce la LTP dependiente de receptores NMDA por afectar a la liberación de D-serina astroglial (Shigetomi et al., 2013).

Algunos estudios consideran a la D-serina como un elemento crítico en los procesos de LTP y LTD que dependen de receptores NMDA (Yang et al., 2003; Malenka y Bear, 2004; Panatier et al., 2006; Henneberger et al., 2010; Rebola et al., 2010; Fossat et al., 2012). Así, el nivel de D-serina afecta a la capacidad de un estímulo neuronal para inducir plasticidad. Por ejemplo, en el núcleo supraóptico del hipotálamo de roedores vírgenes, los procesos astrogliales se encuentran próximos a las neuronas por lo que el nivel de D-serina en la vecindad de los receptores NMDA es relativamente alto, lo que favorece la LTP. En cambio, en progenitores lactantes, se favorece la LTD dado que la cobertura de las neuronas por los procesos astrogliales es inferior y como consecuencia el nivel de D-serina es menor (Panatier et al., 2006).

Siendo conocida la relación entre plasticidad y los procesos de aprendizaje y memoria (Bliss y Collingridge, 1993; Martin et al., 2000), cabe esperar la participación del gliotransmisor en el establecimiento de memorias. Varios estudios relacionan el D-aminoácido con memoria espacial (Morris et al., 1986; Zhang, Gong, et al., 2008; Basu et al., 2009), memoria de orden de eventos (DeVito et al., 2011), memoria de reconocimiento de objetos (Bado et al., 2011; Vargas-Lopes et al., 2011) y miedo condicionado (Han et al., 2015). Además, la D-serina podría estar implicada en el deterioro cognitivo desarrollado durante el envejecimiento (Mothet et al., 2006), quizás por una disminución en los niveles de D-serina con la edad y por consiguiente, una menor actividad del receptor NMDA (Potier et al., 2010). La participación de la D-serina en memoria no sólo está relacionada con plasticidad mediada por receptores NMDA (Henneberger et al., 2010; Shigetomi et al., 2013) sino también con otros procesos relacionados con la formación de memorias duraderas (MLP) como son la sinaptogénesis (Diniz et al., 2012) y la neurogénesis hipocampal adulta (Sultan et al., 2013).

I. 2.2.4 Marcaje de astrocitos

Los astrocitos pueden ser identificados mediante diversos marcadores como la proteína ácida fibrilar glial (sigla en inglés: GFAP), proteína de unión a calcio S100- β , glutamina sintetasa, el transportador glutamato-aspartato (en inglés: GLAST) y el transportador de glutamato 1 (en inglés: GLT-1) (Schitine et al., 2015). Estudios de expresión por *microarray* han sugerido nuevos marcadores (Bachoo et al., 2004) como la enzima aldehído deshidrogenasa 1 L1 (Aldh1L1) (Cahoy et al., 2008). Aunque el inmunomarcaje de GFAP es muy utilizado, su expresión varía con la región del encéfalo, siendo por ejemplo detectable en la mayoría de astrocitos del hipocampo y escasa en la astrogliá del tálamo (Khakh y Sofroniew, 2015). Además, su expresión en muchos astrocitos es imperceptible mediante inmunohistoquímica en tejido sano, pero sí ante un agravio en el SNC, responsable de un aumento en la expresión de GFAP (Khakh y Sofroniew, 2015). El marcaje de GFAP sólo revela un 15% del volumen astrogliá, por lo que no permite observar la totalidad de la complejidad morfológica (Bushong et al., 2002) que conforman los delgados procesos astrogliáes, imperceptibles por la microscopía convencional. Sólo las técnicas de última generación están superando parcialmente esta limitación (Papouin et al., 2017).

II. OBJETIVOS

A lo largo de las dos últimas décadas, se ha producido un progreso significativo en la definición de la microglía y más aún de los astrocitos como elementos reguladores de la transmisión sináptica, así como en la identificación de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes. En cambio, el estudio de cómo la interacción neuroglial repercute en un nivel de organización superior, el comportamiento animal, se encuentra en su fase inicial. Por ello, en el presente trabajo, nos proponemos la consecución del siguiente objetivo general:

Verificar la participación de las células gliales de microglía y astrogía en el procesamiento de la información de reconocimiento de objetos.

Para su resolución nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

I. Definir la intervención de la microglía en el aprendizaje, consolidación y reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos.

II. Determinar el papel de la microglía hipocampal en la activación de las neuronas principales del hipocampo durante la consolidación y reconsolidación de información de reconocimiento de objetos.

III. Establecer la participación de los astrocitos, como fuente del transmisor D-serina, en las fases del procesamiento de la información de reconocimiento de objetos sensibles a minociclina.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1 SUJETOS EXPERIMENTALES

Utilizamos ratones machos (*Mus musculus*, cepa Swiss) de entre 5-6 semanas de edad, adquiridos de un distribuidor oficial (Centro de Producción Animal de la Universidad de Sevilla, España o *Jamvier*, Francia). Manipulamos los ratones de acuerdo a la Legislación de la Unión Europea (2010/63/EU) y española (BOE 67/8509-12, 1988 y BOE 34/11370-421, 2013) vigentes en materia de obtención, transporte, cuidado y manipulación de animales de experimentación, y con la aprobación del comité ético de la Universidad Pablo de Olavide. Previamente a los experimentos, habituamos los animales a las condiciones estándar de estabulación, continuamente controladas (ciclo luz/oscuridad de 12 horas, temperatura, ventilación y humedad). Los ratones permanecieron en jaulas conjuntas (4-5 ratones por jaula) provistos de comida y agua *ad libitum* durante todo el periodo de estabulación.

III. 2 ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

D-serina (D-Ser; Sigma-Aldrich): aminoácido endógeno de isomería D. Es un gliotransmisor, coagonista del receptor de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Se administró de manera sistémica (i.p.), disuelta en solución salina autoclavada (0,9% de NaCl en agua), a una dosis de 75 mg/kg.

Minociclina (Mino; Sigma-Aldrich): antibiótico de segunda generación de la familia de las tetraciclinas, caracterizadas por tener cuatro anillos en su estructura molecular (Thaker et al., 2010). Es ampliamente utilizada como herramienta farmacológica para inhibir la activación y proliferación de la microglía (Yrjänheikki et al., 1998; Tikka et al., 2001; Blum et al., 2004; Stirling et al., 2005; Familian et al., 2006; Griffin et al., 2006; Seabrook et al., 2006; Yoon et al., 2012).

Para inhibir la funcionalidad de la microglía, administramos la minociclina de manera sistémica o local:

- Administración sistémica: la minociclina disuelta en agua destilada (*Milli-Q*) a una concentración de 10 mg/mL, se suministró de forma intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 50 mg/kg.
- Administración local: suministramos bilateralmente en el hipocampo un volumen de 0,5 μ L de minociclina 20 μ M disuelta en salino. Administramos el fármaco a 0,2 μ L/minuto con una jeringa de microinyección (Hamilton), que introducimos 10 mm en una cánula-guía de la misma longitud cuyo extremo estaba situado en el hipocampo. Antes de extraer la jeringa, la mantuvimos durante 1 minuto en la cánula para evitar el reflujo del fármaco al retirarla. El procedimiento de implantación de cánulas se describe a continuación.

En los experimentos en los que se coadministró sistémicamente minociclina y D-serina, realizamos inyecciones separadas con las mismas dosis anteriormente descritas para cada fármaco.

III. 2.1 Implantación de cánulas

Anestesiámos los ratones mediante inyección i.p. de una disolución de hidrato de cloral (Applichem) al 4% en solución salina autoclavada, a una dosis de 10 μ L por gramo de masa corporal. Una vez que la anestesia hizo efecto, colocamos al ratón en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments) e implantamos una cánula de acero en el hipocampo dorsal de cada hemisferio, mediante las siguientes coordenadas con respecto al punto de referencia Bregma: anteroposterior (AP) = -2,2 mm, lateral (ML) = \pm 1,5 mm y profundidad (V, con respecto a la superficie del encéfalo) = -1,1 mm.

Las cánulas se inmovilizaron con una base de cianocrilato y cemento dental (Duralay. Dental Mfg.Co.) fijada mediante un tornillo implantado en el cráneo. Finalmente suturamos la piel del animal, aplicamos pomada cicatrizante (Blastoestimulina) y mediante exposición a una luz emisora de calor se favoreció la recuperación del ratón. Las cánulas se implantaron con un alambre de acero inoxidable en su interior para impedir su obstrucción durante el procedimiento.

III. 3 PARADIGMA DE COMPORTAMIENTO COGNITIVO

III. 3.1 Reconocimiento de objetos

Ante la conocida preferencia innata de los ratones por explorar un objeto novedoso frente a un objeto familiar ejecutamos el siguiente protocolo. En una caja rectangular (55 x 40 x 40 cm) de plástico con un color neutro, iluminada uniformemente, colocamos al animal durante 5 minutos para su habituación. Acto seguido, en la sesión de entrenamiento, instalamos dos objetos idénticos de plástico para su examen durante 15 minutos. Estas condiciones aseguran la adquisición y consolidación de la información. Los objetos se distribuyeron manteniendo una distancia equidistante con respecto a las paredes de la caja y el punto central (**Fig.III.1**).

Estudio de la adquisición y consolidación de la memoria. Para evaluar la formación de la memoria se realizó un test de 10 minutos de duración, en el que sustituimos uno de los objetos del entrenamiento por otro diferente. De esta manera, generamos la distinción entre familiar (objeto repetido) y novedad (objeto desconocido). El tiempo que transcurre entre el entrenamiento y el test se seleccionó en función de la fase del procesamiento de la información que quisimos analizar. En el estudio de la adquisición, el test de memoria a corto plazo (MCP) se realizó 1 hora después del final de la sesión de entrenamiento, mientras que en el experimento de consolidación, el test de memoria a largo plazo (MLP) se realizó 24 horas post-entrenamiento. Durante este tiempo, entre las sesiones de entrenamiento y de test, el animal permaneció en su jaula de estabulación (**Fig.III.1A**).

Estudio de la reconsolidación de la memoria. En el experimento de reconsolidación, 48 horas después del entrenamiento, se procedió a una segunda sesión de 10 minutos (reactivación) con los mismos objetos del entrenamiento (reactivación sin novedad) o sustituyendo uno de los objetos por otro nuevo (reactivación con novedad). Tras 24 horas, efectuamos el test de MLP con un objeto explorado en el entrenamiento y la reactivación (familiar) y un objeto diferente (novedoso) (**Fig.III.1B**). Además, si la sesión de reactivación incluyó novedad, un grupo de animales fue sometido a un test de MLP distinto, con el objeto novedoso de la reactivación (ahora familiar) y un objeto aún sin explorar (novedoso).

Todos los ensayos se grabaron con una videocámara para su posterior análisis, en el que contabilizamos manualmente el tiempo que el ratón examinó de forma activa cada objeto. Consideramos que un ratón analiza activamente un objeto cuando dirige su nariz hacia él desde una pequeña distancia (< 1,5 cm) y/o toca el objeto con la nariz o las vibrisas. La exploración relativa del objeto novedoso respecto al familiar la calculamos mediante el siguiente índice de discriminación: $ID = (t_{\text{nuevo}} - t_{\text{familiar}}) / (t_{\text{nuevo}} + t_{\text{familiar}})$. Así, un ID cercano a 0 refleja una exploración equitativa de ambos objetos, un ID negativo señala preferencia por el objeto familiar y un ID positivo indica una mayor exploración del objeto nuevo. Para asegurar la ausencia de pistas olfativas, limpiamos los objetos y la caja con etanol al 70% en agua entre un sujeto y otro. Los objetos se diferencian en forma y color.

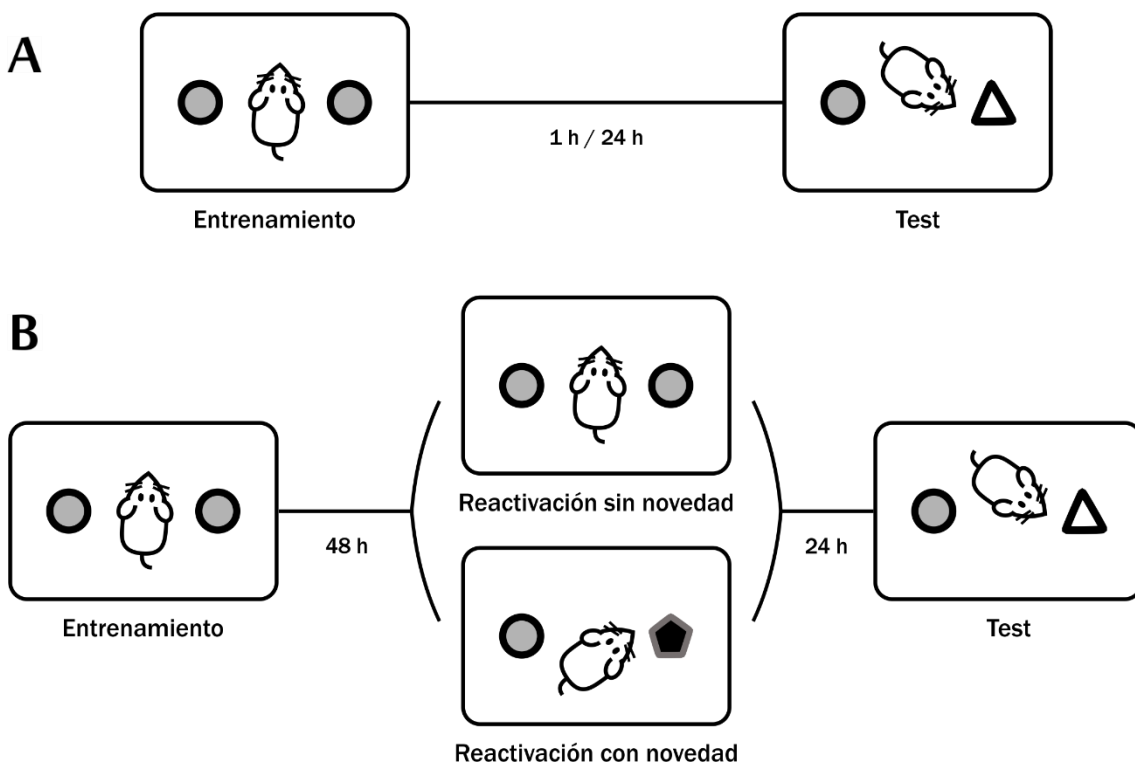


Figura III.1. Protocolo de reconocimiento de objetos.

(A) Aprendizaje y consolidación. Tras un entrenamiento de 15 minutos (15') con dos objetos iguales, se realizó el test de MCP o MLP, 1 h o 24 h después del entrenamiento respectivamente. En el test, uno de los dos objetos se cambia por un objeto novedoso. (B) Reconsolidación. Tras

un entrenamiento de 15' con dos objetos iguales, se realizó una sesión de reactivación con los mismos objetos (sin novedad) o sustituyendo un objeto familiar por uno novedoso (con novedad). 24 h después se hizo el test con un objeto previamente explorado y otro desconocido. Como control de la reactivación, un grupo de ratones entrenados no fue sometido a reactivación. Los test de MCP, MLP y la sesión de reactivación duraron 10' cada uno.

III. 3.1.1 Listado de experimentos conductuales de reconocimiento de objetos

Experimento 1

Efecto de la administración sistémica de minociclina sobre el aprendizaje y la consolidación. Administramos minociclina o vehículo justo después (0 h), 2 horas o 6 horas después del final de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos. Tras acabar el entrenamiento, 1 o 24 horas después, realizamos una sesión de exploración reemplazando un objeto por otro nuevo, con el objetivo de examinar de forma independiente la MCP y la MLP respectivamente.

Experimento 2

Efecto de la administración local de minociclina sobre el aprendizaje y la consolidación. Administramos minociclina o vehículo en el hipocampo justo después (0 h) del final de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos. 1 hora después, reemplazamos un objeto por otro nuevo con la intención de evaluar la MCP. Al día siguiente realizamos el test de MLP, tras sustituir el objeto novedoso de la sesión anterior por otro nuevo.

Experimento 3

Efecto de la administración sistémica de minociclina sobre la reconsolidación. Dos días después de la sesión de entrenamiento, administramos minociclina o vehículo justo después (0 h) de una sesión de reactivación, donde los ratones exploraron durante 10 minutos los mismos objetos del entrenamiento. 24 horas más tarde, reemplazamos un objeto por otro nuevo, con el objetivo de evaluar la MLP post-reactivación (PR-MLP).

Efecto de la minociclina sobre la incorporación de nueva información a una memoria previamente almacenada (reconsolidación con novedad). Dos días después de la sesión de entrenamiento, administramos minociclina o vehículo justo después (0 h) de una sesión de reactivación, en la que sustituimos un objeto del entrenamiento por otro nuevo. 24 horas después, reemplazamos uno de los dos objetos (familiar o novedoso) por un objeto nuevo, con el propósito de evaluar la PR-MLP.

Experimento 4

Efecto de la coadministración sistémica de minociclina y D-serina sobre la consolidación. Justo después (0 h) del final de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos,

administramos uno de los cuatro tratamientos: D-serina más minociclina, D-serina, minociclina o vehículo. Tras 24 horas, reemplazamos un objeto por otro nuevo, con la finalidad de examinar la MLP. Además, se comparó el efecto sobre la consolidación de la administración a distintos tiempos de D-serina (0, 2 o 4 horas post-entrenamiento) tras haber administrado minociclina justo después del entrenamiento.

Experimento 5

Efecto de la coadministración sistémica de minociclina y D-serina sobre la reconsolidación con novedad. Dos días después de la sesión de entrenamiento, administramos uno de los cuatro tratamientos: D-serina más minociclina, D-serina, minociclina o vehículo, justo después (0 h) de una sesión de reactivación, en la que reemplazamos un objeto del entrenamiento por otro nuevo. 24 horas más tarde, evaluamos la PR-MLP tras sustituir el objeto novedoso de la sesión de reactivación por otro nuevo.

III. 4 ESTUDIO DE LOS CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN EL HIPOCAMPO TRAS UNA TAREA CONDUCTUAL DE EXPLORACIÓN DE OBJETOS

Para estudiar los cambios moleculares que se producen en el hipocampo tras la exposición a nueva información, sometimos a los ratones a la libre exploración de un ambiente rico. En una caja rectangular (55 x 40 x 40 cm) de plástico con un color neutro, iluminada uniformemente, con la arena cubierta de serrín y con siete objetos diferentes en color, tamaño y forma, colocamos al ratón durante 15 minutos. Se trata de una tarea similar al entrenamiento de reconocimiento de objetos, pero los estímulos que recibe el animal son mayores, por lo que las modificaciones que se producen en el SNC podrían verse amplificadas. Con el propósito de analizar los cambios bioquímicos ocasionados durante el proceso de consolidación, desencadenado por la sesión de exploración, extrajimos tras perfusión intracardiaca los encéfalos de los ratones, repartidos en diferentes grupos, cada uno con un tiempo de sacrificio respecto al final de la sesión de ambiente rico: 0'5, 1, 3, 6 o 24 horas (**Fig.III.2A**). En algunos experimentos sólo hubo un tiempo de sacrificio: 1,5 horas post-exploración.

Para el análisis de las modificaciones que tienen lugar en el hipocampo durante los procesos de consolidación y reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos, empleamos un esquema procedimental similar. En el estudio de la consolidación, sometimos los ratones a una sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos como se describió anteriormente (dos objetos iguales, 15'). Al finalizar la sesión, se devolvieron a su caja de estabulación y tras 1,5 horas los sacrificamos para extirparles el encéfalo (**Fig.III.2B**). En el estudio de la reconsolidación, los ratones realizaron una sesión de entrenamiento como la anterior y fueron devueltos a la jaula de estabulación; 48 horas después dividimos los animales en tres grupos, uno permaneció en la jaula, otro

lo sometimos a una sesión de reactivación sin novedad y el tercero a una sesión de reactivación con novedad. Tras 1,5 horas en las que los ratones permanecieron en su jaula de estabulación, sacrificamos los animales y le extrajimos el encéfalo (**Fig.III.2C**). En todos los diseños experimentales, un grupo de ratones permaneció sin estimular, en la caja de estabulación.

Tras el aislamiento del tejido, analizamos la expresión génica de determinados marcadores en hipocampo disecado y/o el inmunomarcaje de células hipocampales en secciones de medio hemisferio previamente fijado.

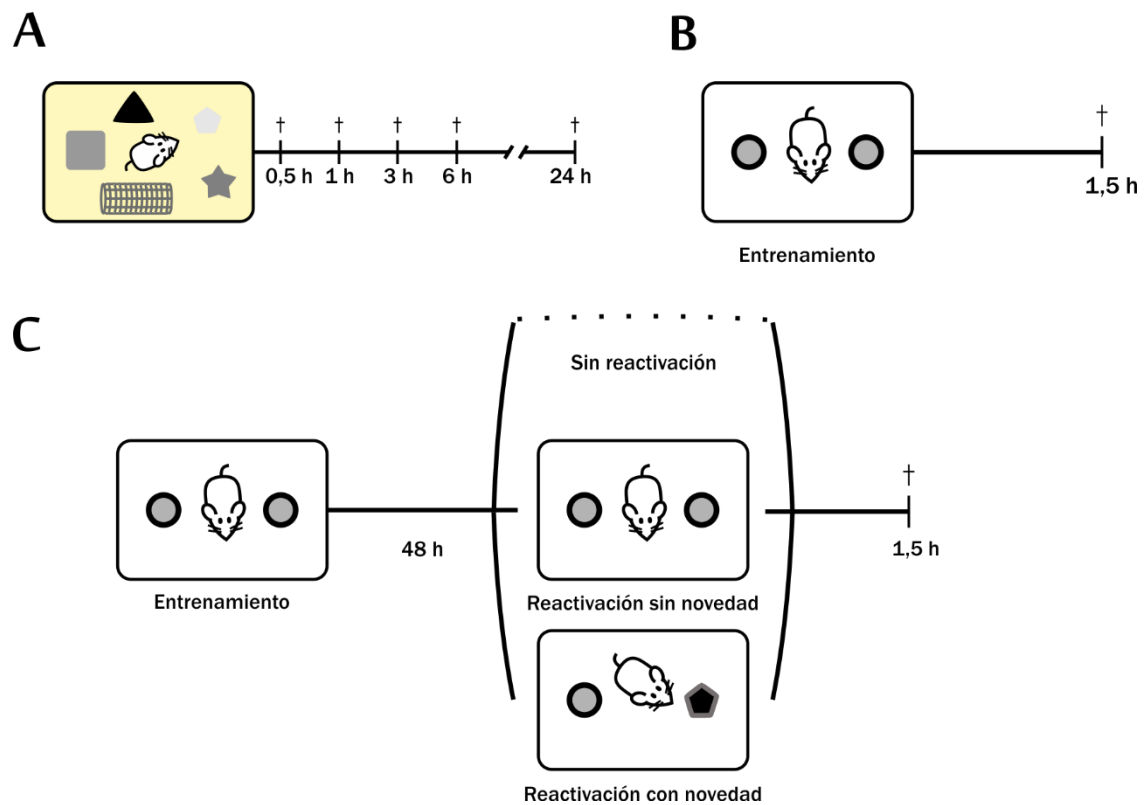


Figura III.2. Protocolos conductuales para el estudio de los cambios bioquímicos que se producen en el hipocampo durante el proceso de formación de memorias duraderas inducido por la exploración de un ambiente rico, una sesión de entrenamiento o una sesión de reactivación de reconocimiento de objetos.

(A-C) Esquemas procedimentales para el análisis ulterior de las modificaciones que se originan en el encéfalo tras una tarea conductual (cada cruz indica el tiempo de sacrificio con respecto al final de la sesión). Tras la extracción del tejido, se analizó expresión génica y/o inmunomarcaje en el hipocampo. (A) Diagrama de extracción del encéfalo a diferentes tiempos durante el proceso de consolidación desencadenado por la exploración de un ambiente rico (AR). Una variante fue utilizada, con un solo tiempo de sacrificio, 1,5 h post-AR (no mostrado). (B) Diagrama de extracción del encéfalo durante el proceso de consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos inducido por una sesión de entrenamiento. (C) Diagrama de extracción del encéfalo durante el proceso de reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos inducido por una sesión de reactivación.

III. 5 SACRIFICIO DE ANIMALES Y EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO

Cuando la extracción de tejido no fue necesaria, sacrificamos los animales por dislocación cervical. Para extirpar el encéfalo, anestesiarnos los ratones mediante suministro i.p. de una disolución de hidrato de cloral (Applichem) al 4% en solución salina autoclavada, a una dosis de 10 μ L por gramo de masa corporal. Una vez el ratón estuvo completamente anestesiado, perfundimos de forma intracardiaca 40 mL de solución salina fría con una jeringa de 20 mL y una aguja de 22G de grosor. El escape de la sangre se produjo aplicando un corte en la aurícula derecha del corazón. Seguidamente, procedimos a la decapitación y aislamiento del encéfalo. Un hemisferio de cada animal se fijó para histología por inmersión en una solución de paraformaldehído (4% en solución salina) durante 48 horas a 4°C. Para su crioprotección, tras retirar la solución de fijación, sumergimos el tejido en sacarosa (30% en PBS, Applichem) y lo mantuvimos a 4°C hasta alcanzar el equilibrio. Por otro lado, disecamos el hipocampo del otro hemisferio y lo conservamos a -80°C hasta el momento de su homogeneización para aislar el ARN.

III. 6 CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

III. 6.1 Extracción de ARN

Aislamos el ARN de los hipocampos conservados a -80°C mediante su homogeneización en un disociador (Gentle MACS Dissociator, Miltenyi Biotec) con un programa de extracción de ARN para tejido congelado. En primer lugar, tratamos los tubos de extracción con NaOH 0,1 M (Applichem) durante al menos 30 minutos, para degradar posibles restos de ácidos nucleicos. Tras retirar la disolución de NaOH, enjuagamos los tubos con agua (*Milli-Q*) autoclavada. Después de introducir cada hipocampo en su correspondiente tubo, vertimos 1 mL de tampón de extracción (Extraction Kit Easy-Blue™; Intron Biotechnology) siguiendo la relación de 1 mL por cada 50-100 mg de tejido y procedimos a su homogeneización. El volumen del resto de reactivos se calculó en base a 1 mL de tampón de extracción. Una vez obtenido el homogenado añadimos 1 μ L de glucógeno (20 mg/mL, Thermo Scientific) para favorecer la posterior precipitación del pellet de ARN; además, agregamos 200 μ L de triclorometano (Panreac Química S.A.U.). Durante 15 segundos, agitamos los tubos en un vórtex. Tras 10 minutos con las muestras en reposo, centrifugamos (12000 rpm, 4°C, 15') logrando una separación de fases. Transferimos la fase superior (acuosa) a un tubo *ependorf* donde adicionamos 0,5 mL de 2-propanol (Applichem). Mezclamos por inversión 2-3 veces y dejamos reposar las muestras (10') a temperatura ambiente. A continuación, centrifugamos (12000 rpm, 4°C, 10') y eliminamos el sobrenadante, quedándonos con el precipitado que corresponde al ARN. Lavamos el pellet con 1 mL de etanol (Applichem) al 75% en agua (*Milli-Q*) autoclavada. Tras invertir 2-3 veces centrifugamos (12000 rpm, 4°C, 5') y retiramos el alcohol. Añadimos etanol absoluto y mezclamos por inversión. Repetimos la

centrifugación y desecharmos el etanol. Finalmente, secamos el pellet de ARN resultante bajo una lámpara y mediante una micropipeta lo resuspendimos en agua (*Milli-Q*) autoclavada, con un volumen variable (20-30 μL) en función del tamaño del precipitado. El ARN obtenido se conservó a -20°C .

III. 6.2 Cuantificación de ARN

Haciendo uso de un espectrofotómetro (MaestroNano Spectrophotometer; MaestroGen Inc.) obtuvimos el valor de concentración de ARN ($\text{ng}/\mu\text{L}$) y la relación de absorbancias a 260 nm (ARN) y 280 nm (proteínas), indicadora del grado de pureza de cada una de nuestras muestras de ARN. Para la medición, realizamos el blanco con el agua que utilizamos al resuspender los precipitados de ARN. Posteriormente, cuantificamos cada muestra usando un volumen de 1,5 μL .

III. 6.3 Retrotranscripción

Para analizar la expresión génica se necesita previamente retrotranscribir el ARN purificado en ADN complementario (ADNc). Preparamos las reacciones para cada muestra de ARN, utilizando un tubo de kit comercial liofilizado (RevoScript Reverse Transcriptase PreMix Random Primer; iNtRON Biotechnology, INC.). Cada tubo incluye todos los componentes requeridos para la reacción (dNTPs, hexanucleótidos al azar o en inglés *random primers*, tampón, inhibidor de ARNasas y retrotranscriptasa). Conociendo la concentración de cada muestra, agregamos el volumen correspondiente para aportar 1 μg de ARN y completamos con agua estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 μL . La reacción de retrotranscripción se realizó en un bloque térmico (BIOER) bajo las condiciones indicadas por el fabricante del kit: 1 hora a 50°C (síntesis de ADNc) y 5 minutos a 95°C (inactivación de la retrotranscriptasa). El ADNc obtenido se conservó a -20°C .

III. 6.4 Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa

La amplificación de distintos marcadores gliales y del gen constitutivo *Act β* (β -actina) se llevó a cabo de manera independiente en un termociclador (T-gradient thermoblock, Biometra; Cultek S.L.) con 10 μL de Taq Green 2x (Thermo Scientific), 0,32 μL de cada cebador (25 μM), 1 μL del ADNc correspondiente y 8,36 μL de agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 20 μL . Sólo en el caso del gen *s100 β* empleamos tubos con Taq liofilizada (FastMix / Frenche™, Intronbio), 0,32 μL de cada cebador, 1 μL de ADNc y 18,36 μL de agua sin nucleasas para alcanzar un volumen total de 20 μL .

Las reacciones con Taq Green 2x se acometieron con el siguiente programa: desnaturalización inicial y activación de la Taq polimerasa ($95^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}$); n ciclos de amplificación (desnaturalización: $95^{\circ}\text{C} - 20^{\circ}$; anillamiento a temperatura específica para cada gen: 30° ; extensión: $72^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}$); y extensión final $72^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}$.

Para la amplificación de *s100β* con Taq FastMix se ejecutó este programa: desnaturalización inicial y activación de la Taq polimerasa (95°C - 5"); n ciclos de amplificación (desnaturalización: 95°C - 30"; anillamiento: 62°C - 40"; extensión: 72°C - 1"); y extensión final (72°C - 5").

Tomamos alícuotas del producto de PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) cada 5 ciclos de amplificación, desde el ciclo 20 al 40. Realizamos la cuantificación relativa en aquellas alícuotas donde la reacción no hubo alcanzado el estado de saturación. Mediante el término RT-PCR hacemos referencia a la suma de la retrotranscripción y la amplificación.

En la **tabla III.1** se muestra la información sobre las diferentes parejas de cebadores (Integrated DNA Technologies, IDT) empleadas.

Tabla III.1. Cebadores utilizados en el análisis de expresión génica por PCR semicuantitativa. Incluye la sigla en inglés del gen, una breve descripción, las secuencias para los cebadores directo (en inglés: *forward*, F) y reverso (en inglés: *reverse*, R), la temperatura de anillamiento y el tamaño en pares de bases de la secuencia amplificada (pb).

Gen	Descripción	Cebador	Secuencia 5'- 3'	T (°C)	Tamaño (pb)
<i>Iba1</i>	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado1 (marcador microglial)	F	GTCCTTGAAGCGAATGCTGG	58	157
		R	CATTCTCAAGATGGCAGATC		
<i>Gfap</i>	Proteína ácida fibrilar de glía (marcador astrogliar)	F	TCCTGGAACAGCAAAACAAG	58	224
		R	CAGCCTCAGGTTGGTTTCAT		
<i>Srr</i>	Serina racemasa (enzima de síntesis de D-serina)	F	GTATACTGTGACCCAAGTGACG	58	286
		R	TAGACTGGTAGCAGTCATCTGC		
<i>s100β</i>	Proteína de unión a calcio (factor soluble de origen astrogliar)	F	TGCCCTCATTGATGTCTTCCA	62	101
		R	GAGAGAGCTCGTTGTTGATAAGCT		
<i>Actβ</i>	Isoforma de la familia de la actina (β-actina) (marcador de expresión constitutiva)	F	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA	62	349
		R	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG		

III. 6.5 Electroforesis de ADN

El producto de PCR obtenido para cada muestra en los diferentes ciclos, se visualizó en un gel de agarosa mediante el siguiente protocolo de electroforesis:

Preparamos una disolución a una concentración de agarosa (nzytech) adecuada al tamaño del fragmento amplificado (normalmente un 2%) disuelta en tampón TBE (Tris-Base 89 mM, iNtRON Biotechnology; Ácido bórico 89 mM, Panreac Química S.A.U; EDTA 1 mM pH 8, Applichem). La calentamos en un microondas hasta disolver la agarosa. Cuando cesó la emisión de vapores, añadimos bromuro de etidio (Serva GmbH) a una concentración final de 0,5 mM. Vertemos la solución en el molde de la cubeta, colocamos el peine para obtener los pocillos de carga y esperamos a que baje su temperatura para que polimerice. Retiramos el peine, transferimos el gel a la cubeta y lo cubrimos con tampón TBE. Cargamos las muestras (2,5 µL) en cada uno de los pocillos sin necesidad de añadir tampón de carga, ya que viene incluido en los kits de Taq polimerasa utilizados. En un pocillo cargamos un marcador de tamaño, para obtener bandas de tamaño conocido en un rango de 50 - 1500 pares de bases (FastRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific). Conectamos la cubeta a una fuente eléctrica con un voltaje constante, hasta que las muestras hayan migrado lo suficiente para detectar el tamaño del amplicón

por comparación con las bandas del marcador. De esta manera, verificamos la correcta amplificación del fragmento deseado. Para ver las bandas, expusimos el gel a luz ultravioleta mediante un transiluminador (Major Science) para que el bromuro de etidio intercalado en el ADN emitiera luz. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ADN. Para posterior análisis de la intensidad de las bandas en el ordenador, fotografiamos los geles con una cámara digital (Canon PowerShot G12).

III. 6.6 Cuantificación relativa de ADN

Utilizamos el programa libre *ImageJ* que nos permite medir la intensidad de cada banda al ejecutar la instrucción *Analyze/Measure*. Previamente en *Analyze/Set Measurements* marcamos la casilla *Mean gray value*. Descargamos *ImageJ* en la siguiente dirección web: <https://imagej.nih.gov/ij/>.

Para cada muestra, tomamos el valor de densitometría óptica de la banda con respecto al valor del fondo. El número obtenido es proporcional a la cantidad de ARNm transcrito para el gen amplificado. Por último, relativizamos los niveles de expresión con respecto al valor obtenido para el gen de expresión constitutiva *Actβ*.

III. 7 HISTOLOGÍA

Con un microtomo de congelación (Leica SM 2000R, Leica Microsystems) cortamos el hemisferio de cada ratón, ya fijado y crioprotegido, en secciones coronales de 50 μm de grosor que repartimos en 6 series en placas multipocillos (4 filas de 6 pocillos por placa). Previamente, rellenamos las placas con solución anticongelante preparada con 30% de glicerina, 30% de etilenglicol, 20% de tampón fosfato (PB2x: Na_2HPO_4 dodecahidratado 0,16 M, Applichem, y NaH_2PO_4 dihidratado 0,04 M, Panreac, en agua destilada) y 20% de agua destilada. Los cortes se conservaron a -20°C hasta su posterior uso en alguno de los siguientes protocolos:

III. 7.1 Tinción de Nissl

Esta técnica que revela detalles citológicos y citoarquitectónicos, a través del marcaje de los ácidos nucleicos de todas las células (núcleos de neuronas y células gliales) y la sustancia de Nissl (ribosomas libres y asociados a membrana), se utilizó para comprobar la correcta colocación bilateral de las cánulas-guía sobre el hipocampo. El protocolo consta de los siguientes pasos:

Tras la eliminación del anticongelante con tampón fosfato salino (PBS: solución de PB 0,01 M y NaCl 0,15 M en agua), montamos los cortes en portaobjetos previamente gelatinizados con una solución de montaje (0,5% de gelatina, Panreac Química S.A.U. y 25% de etanol en agua). Tras dejarlos secar al menos 24 horas, sumergimos los portaobjetos durante 40 segundos en azul de toluidina al 0,1% en tampón acético-acetato a pH ácido (3-4). Posteriormente, hicimos dos lavados de 1 minuto en agua destilada.

Para la deshidratación de los cortes, sometimos los portaobjetos a una batería de alcoholes de concentración creciente: 70% etanol (Applichem) en agua destilada (1'), 90% etanol en agua destilada (1') y etanol absoluto (1'). Aclaremos los cortes en xilol (1') y cubrimos cada portaobjetos con DPX (Sigma-Aldrich) y un cubreobjetos. Tras varios días de secado, retiramos el exceso de DPX con una cuchilla y limpiamos con etanol al 70%. Las preparaciones se conservaron a temperatura ambiente hasta ser fotografiadas.

III. 7.2 Inmunohistoquímica

Esta técnica se utiliza para estudios precisos de morfología, localización y expresión de antígenos. Gracias a la unión específica de un anticuerpo con su antígeno, podemos marcar moléculas concretas presentes en las células, identificando tales uniones mediante un anticuerpo secundario, que en presencia de un sustrato produce una reacción química, causante de una coloración visible.

Empleamos el siguiente protocolo para cortes flotantes en agitación: eliminamos el anticongelante mediante 3 lavados en PBS de 5 minutos cada uno (3 veces, 5'). Permeabilizamos el tejido con 3 inmersiones de 8 minutos en Tritón X-100 al 0,5% en PBS (PBS-T, Panreac Química S.A.U.). Eliminamos el detergente con PBS (2 veces, 8'). Para la inactivación de la peroxidasa endógena, se incubaron los cortes (20') en una solución con un 25% de agua destilada, 25% de PB2x, 50% de etanol absoluto y 1,66% de H₂O₂. Posteriormente, lavamos con PBS (2 veces, 10') y equilibramos el tejido con PBS-T (2 veces, 10'). Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario, se incubaron los cortes (1 h) con una solución de bloqueo: 10% de gelatina (Panreac Química S.A.U) y 10% de suero fetal bovino (PAA Laboratories GMBH) en PBS-T.

Durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente y durante al menos 12 horas a 4°C, incubamos los cortes con el correspondiente anticuerpo primario a la dilución adecuada (**Tabla III.2**) en una solución con un 10% de gelatina y 3% de suero fetal bovino en PBS-T. Tras 30 minutos a temperatura ambiente, eliminamos el exceso de anticuerpo primario por inmersión en PBS-T (4 veces, 10'). Acto seguido, incubamos las muestras (1 h) con el anticuerpo secundario acoplado a biotina a una dilución 1:500, en una solución con un 10% de gelatina y 3% de suero fetal bovino en PBS-T. Retiramos el exceso de anticuerpo secundario lavando con PBS-T (3 veces, 8') y eliminamos el detergente con PBS (3 veces, 5').

Para amplificar la reacción de la peroxidasa, incubamos los cortes con una solución avidina-estreptavidina-peroxidasa (kit comercial ABC, Vector Laboratories Inc.) durante 1 hora. Por recomendación del fabricante, preparamos la solución al menos 20 minutos antes de usarla, en una proporción 3:3 (µL) de los reactivos A y B por mililitro de PBS. Lavamos el exceso con PBS-T (3 veces, 8') y eliminamos el detergente con PBS (3 veces, 5'). Revelamos el marcaje por inmersión de los cortes en solución de revelado; para c-Fos: 16,6 µL de solución de diaminobencidina (DAB, 30 mg/mL, Sigma-Aldrich) y 0,3 µL de H₂O₂ por cada mililitro de PBS, más 0,1% de sulfato de níquel. Para el antígeno

EGR-1, disolvimos una pastilla de DAB y otra de urea de un kit comercial (SIGMAFAST, Sigma) por cada 15 mL de agua destilada. Además, para intensificar el marcaje añadimos un 0,1% de sulfato de níquel. Transcurrido el tiempo preciso para obtener la coloración, interrumpimos la reacción mediante lavados con PBS (4-5 veces). La solución de revelado sobrante se inactivó con lejía antes de desecharla.

Montamos los cortes en portaobjetos tras inmersión en solución de montaje. Después del secado de al menos 24 horas, sumergimos cada portaobjetos en xilol (5^o) y los cubrimos con DPX y un cubreobjetos. Tras varios días de secado, retiramos el DPX sobrante con una cuchilla y limpiamos las preparaciones con etanol al 70% en agua. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente.

Tabla III.2. Anticuerpos empleados en inmunohistoquímica. Incluye la sigla en inglés del antígeno, una breve descripción, la dilución empleada de los anticuerpos, su huésped de generación, la casa comercial y su referencia.

Anticuerpo	Antígeno	Descripción	Dilución	Huésped	Casa comercial	Referencia
Primario	c-Fos	Factor de transcripción (familia de genes tempranos)	1:1000	Conejo	Santa Cruz	Sc-52
Primario	EGR-1	Factor de transcripción (marcador microglial en el adulto)	1:1000	Conejo	Santa Cruz	Sc-189
Secundario	IgG-Conejo		1:500	Burro	Thermo Scientific	31821

III. 7.3 Inmunofluorescencia

Esta técnica nos permite el marcaje de un antígeno concreto presente en el tejido, gracias a la unión específica de un anticuerpo y a la detección de la unión con un anticuerpo acoplado a fluoresceína. Mediante la exposición del tejido a una longitud de onda de 488 nm, la fluoresceína se excita y exhibe fluorescencia en los sitios de unión anticuerpo-antígeno.

Para el marcaje de los astrocitos GFAP+ desarrollamos el siguiente protocolo sobre cortes flotantes en agitación (modificado de Ruiz et al., 2011):

Eliminamos el anticongelante con tres lavados en PBS de 1 minuto cada uno (3 veces, 1^o). Durante 1 hora sumergimos los cortes con tritón X-100 al 1% en PBS (PBS-T 1%, Applichem) para permeabilizar el tejido. Con la finalidad de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario, incubamos 1 hora con solución de bloqueo: 5% de seroalbúmina bovina (sigla en inglés: BSA, Sigma-Aldrich) en PBS-T 1%. Durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego 12 horas a 4°C, incubamos los cortes con el anticuerpo primario anti-GFAP (1:1000, **Tabla III.3**) diluido en 1% BSA disuelto en PBS-T 1%. Tras 30 minutos a temperatura ambiente, retiramos el exceso de anticuerpo con PBS-T al 0,1% (6 veces, 10^o). Durante 1 hora incubamos con el anticuerpo secundario biotilado (1:500, Vector) en PBS-T 0,1% y BSA 1%. Tras seis lavados de 10 minutos con PBS-T 0,1%, incubamos durante 1 hora con fluoresceína-estreptavidina (1:400, BD) en PBS-T 0,1%. Después de tres inmersiones en PBS-T 0,1%, montamos los cortes en un

portaobjetos con glicerol 50% en agua (Panreac Química S.A.U.). Cubrimos cada portaobjetos, sellando el cubreobjetos con laca de uñas. Para evitar la pérdida de fluorescencia de las muestras, las preparaciones se conservaron a 4°C en ausencia de luz.

Tabla III.3. Anticuerpos empleados en inmunofluorescencia. Incluye la sigla en inglés del antígeno, una breve descripción, la dilución empleada de los anticuerpos, su huésped de generación, la casa comercial y su referencia.

Anticuerpo	Antígeno	Descripción	Dilución	Huésped	Casa comercial	Referencia
Primario	GFAP	Proteína ácida fibrilar de glía (marcador astrogial)	1:1000	Rata	Calbiochem	345860
Secundario	IgG-Rata		1:500	Cabra	Vector	BA-9400

III. 7.4 Captura y análisis de imagen

Mediante una cámara Leica DC500 acoplada a un microscopio óptico Leica DMRB RFY HC fotografiamos las preparaciones de inmunohistoquímica (IHQ); mientras que las imágenes de las preparaciones de inmunofluorescencia (IF), las tomamos con un microscopio confocal de fluorescencia Leica SPE DM 2500.

El análisis de las imágenes de IHQ se realizó con el programa libre *ImageJ* mientras que las fotografías de IF se analizaron con su variante *Fiji*, por su mayor compatibilidad con el formato de archivo de las imágenes de IF. Ambos programas están disponibles en la red: <http://imagej.net/Downloads>.

El número de células c-Fos+ en la capa granular del giro dentado y en el *stratum pyramidale* de CA3 y CA1 se contabilizó con la instrucción *Analyze/Analyze particles*, restringiendo los parámetros de circularidad entre 0,6 y 1. Previamente utilizamos las herramientas *Process/Filters/Mean*, *Image/Adjust/Threshold* para resaltar las células marcadas del resto de la imagen y delimitamos las células adheridas entre sí para poder distinguirlas mediante *Process/Binary/Convert to Mask*, *Process/Binary/Fill Holes*, *Process/Binary/Watershed*. Con objeto de contener en una sola imagen la capa granular completa del giro dentado, efectuamos un barrido fotográfico sobre la región y fusionamos el conjunto de imágenes con el programa *Photoshop* (*Archivo/Automatizar/Photomerge*).

Para medir el área de las células microgliales EGR-1+ en el *stratum radiatum* de CA1, delimitamos manualmente cada célula con la herramienta *polygon selections* y ejecutamos la instrucción *Analyze/Measure*, que nos devuelve el área y los parámetros que estén seleccionados en *Analyze/Set Measurements*. Además, contabilizamos el número de células microgliales cuyos tamaños estaban comprendidos en diferentes intervalos de áreas, y lo dividimos por el número total de microglía inmunomarcada para hallar el porcentaje de microglía EGR-1+ en cada intervalo (frecuencia relativa). La comparación de la proporción de células en cada intervalo de área entre ratones no estimulados y animales sometidos a una sesión comportamental (p.e. entrenamiento), nos dio una idea

aproximada sobre el porcentaje de microglía que varía de tamaño en respuesta a la conducta.

En el microscopio confocal, tomamos fotografías del *stratum radiatum* de CA1 en diferentes planos de profundidad (16 secciones separadas por 2 μm). Para medir el área de los astrocitos GFAP+, agrupamos las diferentes secciones en una proyección máxima, delimitamos manualmente cada célula con la herramienta *polygon selections* y ejecutamos la instrucción *Analyze/Measure* que nos devuelve el valor del área.

III. 8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Analizamos los datos obtenidos mediante el complemento inerSTAT-a v1.3 (Mario H. Vargas) para el programa *Microsoft Excel* en el sistema operativo *Windows XP*. Los datos son expresados como la media \pm error estándar de la media. Para comparar la media entre dos grupos utilizamos el test de la t de *Student* para datos no emparejados. Para comparar más de dos medias, empleamos el ANOVA de una vía y en caso de rechazo de la hipótesis nula, utilizamos el test de la t de *Student* para cada par de grupos. Consideramos que la diferencia entre medias es significativa cuando el valor de *p* obtenido es inferior a 0,05.

IV. RESULTADOS

IV. 1 ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE LA MICROGLÍA EN EL HIPOCAMPO TRAS LA EXPLORACIÓN DE NUEVA INFORMACIÓN

IV. 1.1 Análisis de la expresión génica en el hipocampo del marcador microglial *iba1* a diferentes tiempos tras la exposición a un ambiente rico

La formación de memorias duraderas requiere de cambios transcripcionales para que la información perdure (Abel y Lattal, 2001; Alberini y Kandel, 2015). Estas modificaciones en la expresión han sido ampliamente estudiadas en las neuronas. Con el objetivo de conocer si la activación del sistema nervioso debido a la exploración de un ambiente rico afecta a la expresión génica en microglía, analizamos la transcripción de *iba1*, un gen de expresión específica microglial en el SNC (Ito et al., 1998), cuya sobreexpresión está asociada con la activación microglial (Mori et al., 2000; Ohsawa et al., 2000; Ito et al., 2001). Así que, sacrificamos los ratones a diferentes tiempos tras una sesión de exploración de un ambiente rico, aislamos el hipocampo y extrajimos el ARN total. El análisis de la expresión de *iba1* por RT-PCR semicuantitativa, reflejó un incremento significativo de la expresión entre las 1 y 3 horas post-exploración respecto a los ratones que permanecieron en la jaula de estabulación (grupo NAR; $F(5, 23) = 6,71, p < 0,001$; para 1 h: $[t(7) = 2,98, p = 0,018]$, y para 3 h: $[t(7) = 2,31, p = 0,049]$; **Fig.IV.1**).

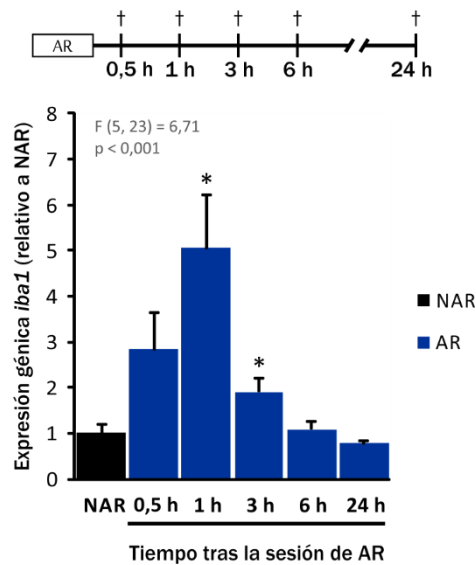


Figura IV.1. La exploración de un ambiente novedoso aumenta la expresión del marcador microglial *iba1* en el hipocampo.

El diagrama muestra los tiempos a los que se sacrificaron los ratones (indicados con una cruz) con respecto al final de la exploración de un ambiente rico (AR). La gráfica representa los niveles de expresión de *iba1* obtenidos por RT-PCR semicuantitativa. Los grupos de exploración (columnas azules) están relativizados con respecto al grupo no estimulado (NAR, columna negra), el cual recibe el valor 1. $N = 4$ y 5 ratones para el grupo NAR y el resto de grupos respectivamente. * Comparación estadística con respecto al grupo NAR. * $p < 0,05$.

IV. 1.2 Análisis del área de células microgliales en el hipocampo tras la exposición a un ambiente rico en presencia y ausencia de minociclina

El aumento de tamaño celular de la microglía sugiere cambios en su actividad (Vega-Avelaira et al., 2013; Zhang et al., 2016). Para comprobar si durante la formación de memorias duraderas se producen variaciones en la actividad microglial, cuantificamos el tamaño de las células microgliales en el *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo, tras la exploración de un ambiente rico. En base a los tiempos de mayor expresión de *iba1*, sacrificamos los ratones 1,5 horas después del final de la sesión de exploración y realizamos una inmunohistoquímica (IHQ) para la proteína EGR-1 en secciones cerebrales que contenían hipocampo dorsal. Aunque EGR-1 es un factor de transcripción expresado en neuronas en respuesta a cambios de actividad, se ha descrito su presencia en microglía durante la edad adulta (Butovsky et al., 2014; Matcovitch-Natan et al., 2016) (**Fig.IV.2A**). El promedio del área celular microglial en los animales que exploraron un AR fue superior al del grupo de ratones que permaneció en la jaula de estabulación ($\text{área}_{\text{veh-AR}} = 0,0446 \pm 0,0008$ frente al $\text{área}_{\text{veh-NAR}} = 0,0398 \pm 0,0016$ unidades arbitrarias (U.A.), [t (8) = 2,32, p = 0,045]; **Fig.IV.2B**). Además, con el propósito de conocer si la administración sistémica de minociclina, un conocido inhibidor de la activación microglial (Yrjänheikki et al., 1998; Tikka et al., 2001; Blum et al., 2004; Stirling et al., 2005; Familian et al., 2006; Griffin et al., 2006; Seabrook et al., 2006; Suzuki et al., 2010; Yoon et al., 2012; Ueno et al., 2013; Alcocer-Gómez et al., 2016), provoca alguna alteración con respecto al grupo tratado con vehículo, se suministró minociclina o vehículo justo después de la exploración (diagrama en **Fig.IV.2B**). La administración de minociclina impidió el aumento de tamaño en respuesta a la exploración de objetos ($\text{área}_{\text{veh-AR}} = 0,0446 \pm 0,0008$ frente al $\text{área}_{\text{Mino-AR}} = 0,0376 \pm 0,0013$ U.A., [t (7) = 4,38, p = 0,001]; **Fig.IV.2B**). La representación de la frecuencia relativa acumulada de células microgliales para diferentes intervalos de área mostró en ratones tratados con vehículo un pequeño desplazamiento de la curva hacia áreas mayores en respuesta a la sesión de AR, lo que sugiere que sólo un pequeño porcentaje de la microglía aumentó de tamaño o se activó (**Fig.IV.2C**). En concreto, un 19,78% de células ubicadas en el intervalo [0-0,04) se desplazó hacia un intervalo de áreas superiores, [0,04-0,1), en respuesta a la exploración. Por el contrario, la administración de minociclina bloqueó el desplazamiento, confirmando la acción inhibidora del fármaco sobre la activación de la microglía. Es más, en ratones tratados con minociclina, un 10,13% de células ubicadas en el intervalo [0,04-0,08) fueron desplazadas a un intervalo de área menor, (0-0,04), tras la exploración del AR. De modo que, en los ratones estimulados, aquellos que fueron tratados con minociclina presentaron un 28,22% menos de células en el intervalo de mayor área, [0,04-0,1), respecto a los ratones administrados con vehículo.

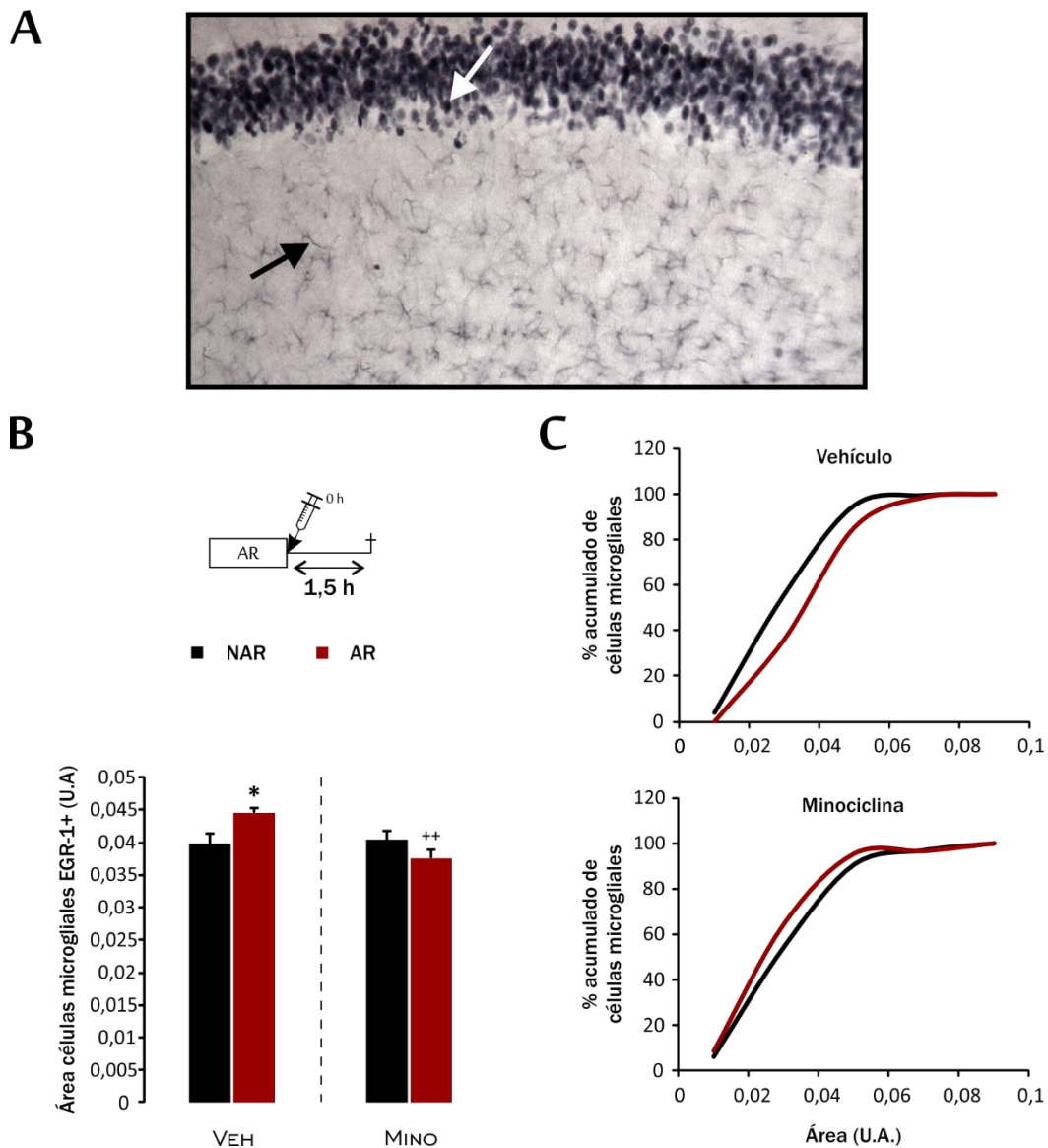


Figura IV.2. La exploración de un ambiente novedoso produce un incremento en el área microglial en CA1, que es bloqueado por la administración de minociclina.

(A) La microfotografía muestra el marcaje de EGR-1 en la región CA1 del hipocampo, donde se distinguen dos poblaciones de células EGR-1+: neuronas del *stratum pyramidale* (flecha blanca) y microglía del *stratum radiatum* (flecha negra). (B) El esquema muestra el tiempo en el que se sacrificaron los ratones (indicado con una cruz) con respecto al final de la exploración de un ambiente rico (AR). La gráfica representa el área promedio de células microgliales EGR-1+ en unidades arbitrarias (U.A.) en la región CA1 del hipocampo para ratones expuestos a AR o no (NAR), en ambos grupos farmacológicos indicados al pie de la gráfica. (C) Porcentaje acumulado del número de células microgliales EGR-1+ respecto al total en los distintos intervalos de área celular. N = al menos 4 ratones, dos cortes por animal. * Comparación estadística con respecto al grupo NAR dentro de un mismo grupo farmacológico. + Comparación estadística entre animales expuestos a un AR de diferentes grupos farmacológicos. Un símbolo: $p < 0,05$, dos símbolos: $p < 0,01$.

IV. 2 PAPEL DE LA MICROGLÍA EN LA ADQUISICIÓN Y FORMACIÓN DE LA MEMORIA DURADERA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

IV. 2.1 Análisis de la adquisición y formación de la memoria duradera tras la administración sistémica de minociclina justo después de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos

El aprendizaje y la consolidación pueden considerarse procesos secuenciales: primero se adquiere la información para posteriormente almacenarla. Para establecer la posible participación de la microglía en los procesos de aprendizaje y memoria se utilizó un paradigma de conducta que depende del hipocampo: el reconocimiento de objetos (Cohen et al., 2013; Cohen y Stackman Jr., 2015). Comprobado el efecto de la minociclina como inhibidor de la activación microglial (**Fig.IV.2**), administramos el fármaco sistémicamente justo después de acabar una sesión de exploración con dos objetos idénticos (entrenamiento). El test de memoria a corto plazo (MCP), señal de aprendizaje, se realizó 1 hora después de la sesión de entrenamiento (diagrama en **Fig.IV.3A**), mientras que el test de memoria a largo plazo (MLP) se ejecutó 24 horas después del entrenamiento (diagrama en **Fig.IV.3B**). Ambos grupos farmacológicos (vehículo y minociclina) presentaron en la sesión de entrenamiento índices de discriminación (ID) cercanos a cero ($ID = 0,02 \pm 0,03$ y $-0,02 \pm 0,02$ para ratones tratados con vehículo y minociclina respectivamente; **Fig.IV.3A**), reflejo de una exploración equitativa de ambos objetos. En cambio, en el test de MCP, ambos grupos exhibieron preferencia por el objeto novedoso ($ID = 0,14 \pm 0,02$ y $0,16 \pm 0,03$ para ratones tratados con vehículo y minociclina respectivamente) con índices significativamente superiores respecto a los del entrenamiento ($[t(8)_{ENT-MCP} = 3,39, p = 0,008]_{Veh}$; $[t(8)_{ENT-MCP} = 4,47, p = 0,002]_{Mino}$). La comparación entre ambos grupos farmacológicos no reveló diferencias significativas (**Fig.IV.3A**).

Cuando evaluamos la formación de memoria duradera en el test de MLP, la administración de minociclina justo después del entrenamiento provocó que los ratones tuvieran bajos índices de discriminación comparado con los ratones a los que inyectamos vehículo ($ID = 0,25 \pm 0,04$ y $0,01 \pm 0,05$ para los ratones tratados con vehículo y minociclina respectivamente, $[t(17) = 3,36, p = 0,003]$; **Fig.IV.3B**).

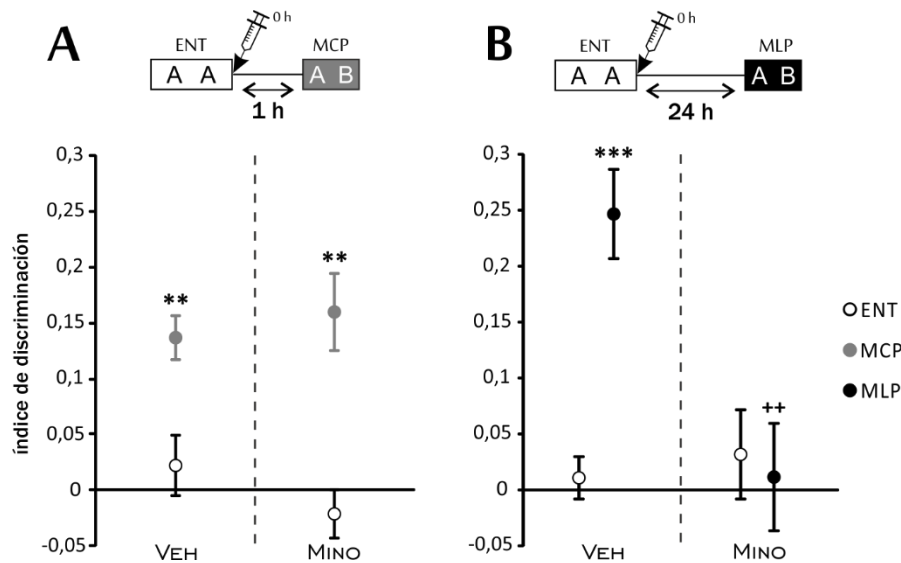


Figura IV.3. La administración sistémica de minociclina tras el entrenamiento afecta a la formación de la memoria duradera sin afectar a la adquisición de información.

(A) Diagrama procedimental y representación gráfica del índice de discriminación (ID) en la sesión de entrenamiento (ENT) y el test de memoria a corto plazo (MCP) en ratones tratados con minociclina (Mino) o vehículo (Veh) al acabar el entrenamiento. (B) Diagrama procedimental y gráfica del ID en la sesión de entrenamiento y el test de memoria a largo plazo (MLP) en ratones tratados con minociclina o vehículo al acabar el entrenamiento. En todos los casos, N = al menos 5 ratones en cada tratamiento. En cada esquema procedimental, las letras A y B simbolizan los diferentes objetos utilizados. * Comparación del test con respecto a la sesión de entrenamiento para un mismo grupo farmacológico. + Comparación entre grupos farmacológicos para una misma sesión. Dos símbolos: $p < 0,01$; tres símbolos: $p < 0,001$.

IV. 2.2 Determinación de la demanda temporal de la actividad microglial en la formación de la memoria duradera de reconocimiento de objetos

Para determinar cuando la activación microglial es necesaria para la formación de memorias duraderas, administramos minociclina a distintos tiempos tras el entrenamiento (justo después, 2 o 6 horas después del entrenamiento) y comparamos el efecto con respecto a los ratones a los que inyectamos vehículo (diagrama en Fig.IV.4). El tratamiento con minociclina disminuyó significativamente la formación de la memoria duradera, sólo cuando la administramos a 0 o 2 horas tras el entrenamiento (p.e. para la administración a las 2 horas, los ID son $0,25 \pm 0,05$ y $-0,03 \pm 0,05$, correspondientes a ratones tratados con vehículo y minociclina respectivamente, [t (12) = 3,91, $p = 0,002$]). Por el contrario, el suministro de minociclina a las 6 horas no alteró la formación de memorias duraderas (ID = $0,22 \pm 0,06$ y $0,21 \pm 0,06$ para ratones tratados con vehículo y minociclina respectivamente, [t (10) = 0,12, $p = 0,91$]).

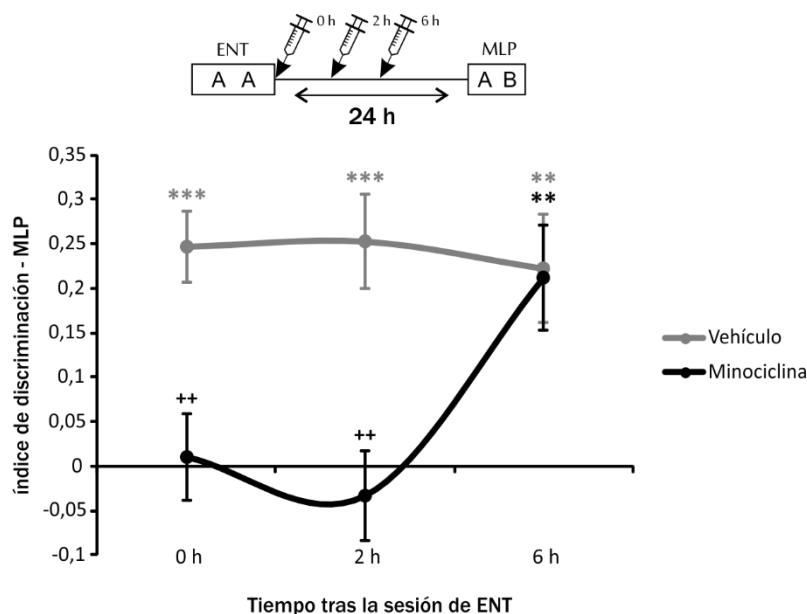


Figura IV.4. La administración sistémica de minociclina afecta a la formación de la memoria duradera al menos en las 2 horas siguientes a la sesión de entrenamiento.

Diagrama procedimental. Cada jeringa indica los diferentes tiempos de administración de minociclina o vehículo tras el final de la sesión de entrenamiento (ENT). Las letras A y B simbolizan los diferentes objetos utilizados. La gráfica representa el índice de discriminación (ID) en el test de memoria a largo plazo (MLP) en ambos grupos farmacológicos. N = al menos 4 ratones por tiempo de administración en cada tratamiento. * Comparación estadística del test de MLP con respecto a la sesión de entrenamiento (IDs no mostrados) para un mismo tiempo de administración y grupo farmacológico. + Comparación del test de MLP entre grupos farmacológicos para un mismo tiempo de administración. Dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

IV. 2.3 Análisis de la adquisición y formación de la memoria duradera tras la administración intrahipocampal de minociclina justo después de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos

Dado que el hipocampo es un área relevante para la correcta ejecución del paradigma de reconocimiento de objetos (Cohen et al., 2013; Cohen y Stackman Jr., 2015), y puesto que la exploración de información novedosa modifica el estado activo de la microglía hipocampal, medido como un incremento de la expresión de *iba1* (Fig.IV.1) y del tamaño celular (Fig.IV.2), quisimos averiguar si la inhibición de la activación de la microglía del hipocampo reproduce los efectos de la administración sistémica de minociclina. Para ello, colocamos cánulas-guía sobre el hipocampo dorsal (Fig.IV.5A) y administramos minociclina o vehículo justo después de la sesión de entrenamiento (diagrama en Fig.IV.5B). Mientras que la inyección intrahipocampal de vehículo no afectó a los procesos de aprendizaje y memoria ($ID_{ENT} = -0,01 \pm 0,03$, $ID_{MCP} = 0,21 \pm 0,07$ y $ID_{MLP} = 0,22 \pm 0,09$, [$t(5)_{ENT-MCP} = 3,20$, $p = 0,02$], [$t(6)_{ENT-MLP} = 2,46$, $p = 0,04$]), la administración local de minociclina bloqueó la formación de memoria duradera sin alterar la adquisición de información ($ID_{ENT} = -0,02 \pm 0,04$, $ID_{MCP} = 0,29 \pm 0,09$ y $ID_{MLP} = 0,03 \pm 0,04$, [$t(5)_{ENT-MCP} = 3,49$, $p = 0,01$], [$t(6)_{ENT-MLP} = 0,84$, $p = 0,43$]; Fig.IV.5B).

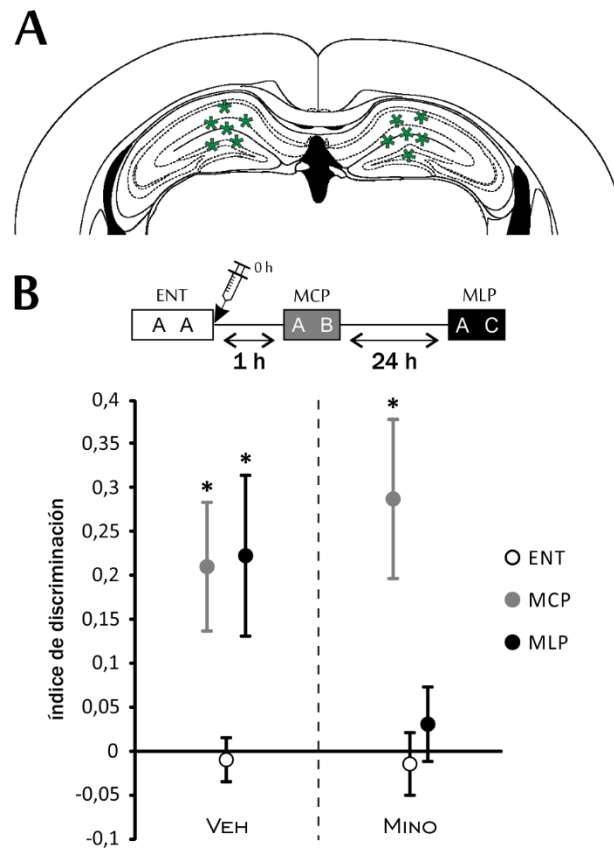


Figura IV.5. La administración local de minociclina en el hipocampo afecta a la formación de la memoria duradera sin afectar a la adquisición de información.

(A) Imagen representativa de la sección coronal de encéfalo de ratón a la altura anteroposterior media en la que se aplicó el fármaco (asteriscos) bilateralmente, mediante cánulas intrahipocampales. Modificado del atlas anatómico (Paxinos y Franklin, 2001). (B) Diagrama procedimental y representación gráfica del índice de discriminación (ID) en la sesión de entrenamiento (ENT) y los test de memoria a corto y largo plazo (MCP y MLP respectivamente) en ratones tratados localmente con minociclina (Mino) o vehículo (Veh) al acabar el entrenamiento. N = 4 ratones en cada tratamiento. En el esquema procedimental, las letras A, B y C simbolizan los diferentes objetos utilizados. * Comparación estadística de los test de MCP y MLP con respecto a la sesión de entrenamiento para un mismo grupo farmacológico. * $p < 0,05$.

IV. 3 PAPEL DE LA MICROGLÍA EN LA RECONSOLIDACIÓN DE MEMORIAS DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

IV. 3.1 Análisis de la reconsolidación de la memoria tras la administración sistémica de minociclina justo después de la sesión de reactivación sin novedad de reconocimiento de objetos

La consolidación y la reconsolidación son procesos con características compartidas pero presentan ciertas diferencias (Alberini, 2005), por lo que quisimos determinar si la inhibición de la activación microglial con minociclina provoca sobre la reconsolidación el mismo déficit observado en el proceso de consolidación.

Para ello, dos días después del entrenamiento, sometimos los ratones a una sesión de reactivación de 10 minutos con los mismos objetos utilizados en el entrenamiento (RA sin novedad). Tras su finalización, les inyectamos minociclina o vehículo. Al día siguiente, evaluamos la reconsolidación en un test post-reactivación de MLP (PR-MLP) donde sustituimos un objeto familiar por uno nuevo (diagrama en **Fig.IV.6A**). Como control del efecto de la sesión de reactivación, un grupo de ratones no fue reactivado (diagrama en **Fig.IV.6B**). Los resultados fueron parejos en ambos grupos farmacológicos reactivados: tiempos de exploración similares para ambos objetos en las sesiones de ENT y RA ($ID_{Veh-ENT} = -0,01 \pm 0,03$, $ID_{Veh-RA} = -0,04 \pm 0,03$; $ID_{Mino-ENT} = -0,04 \pm 0,03$, $ID_{Mino-RA} = 0,03 \pm 0,04$), y preferencia por el objeto nuevo en el test de PR-MLP ($ID_{Veh-PRMLP} = 0,21 \pm 0,04$, $[t(29)_{ENT-PRMLP} = 4,32, p < 0,001]_{Veh}$; $ID_{Mino-PRMLP} = 0,25 \pm 0,05$, $[t(25)_{ENT-PRMLP} = 5,62, p < 0,001]_{Mino}$; **Fig.IV.6A**). La ausencia de reactivación no causó diferencias entre ambos grupos (**Fig.IV.6B**), lo que sugiere que la administración de minociclina 48 horas post-entrenamiento no tiene efecto sobre la formación de memorias duraderas en presencia o ausencia de la sesión de reactivación sin novedad.

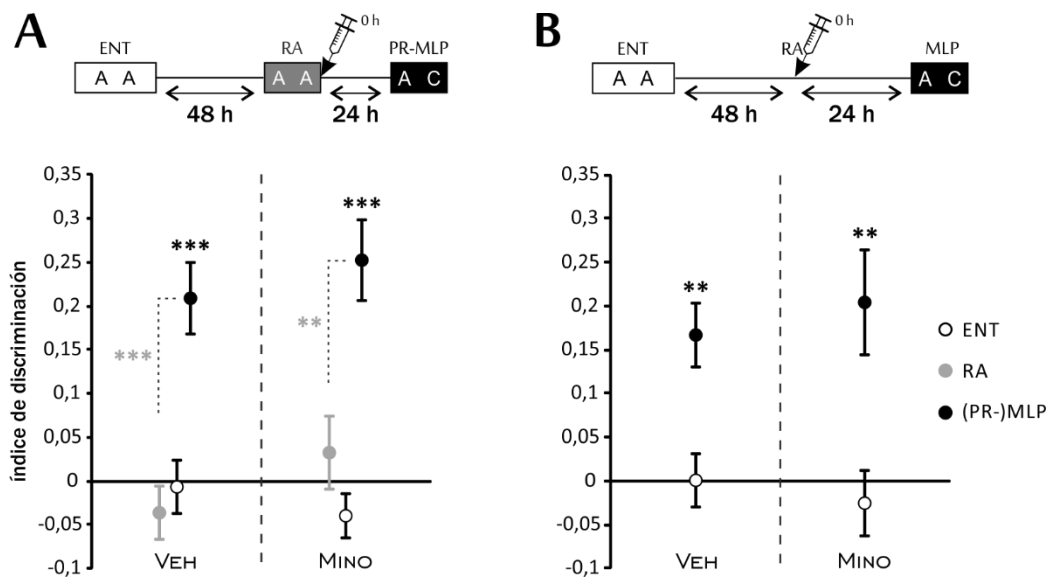


Figura IV.6. La administración sistémica de minociclina tras la reactivación sin novedad no afecta a la reconsolidación.

(A) Diagrama procedimental y gráfica del índice de discriminación (ID) en las sesiones de entrenamiento (ENT), reactivación (RA) y test post-reactivación de memoria a largo plazo (PR-MLP), en ratones tratados con minociclina (Mino) o vehículo (Veh) al acabar la RA. (B) Diagrama procedimental y gráfica del ID en el entrenamiento y el test de MLP para ratones no reactivados, tratados con minociclina o vehículo 48 horas después del entrenamiento. En todos los casos, N = al menos 8 ratones en cada tratamiento. En cada esquema procedimental, las letras A y C simbolizan los diferentes objetos utilizados. * Comparación estadística de la RA y el test con respecto a la sesión de entrenamiento dentro de un mismo grupo farmacológico o significación entre el test y la sesión de RA (línea discontinua). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

IV. 3.2 Análisis de la reconsolidación de la memoria tras la administración sistémica de minociclina justo después de la sesión de reactivación con novedad de reconocimiento de objetos

Es conocido el papel de la reconsolidación en la incorporación de nueva información sobre una memoria previamente consolidada (Alberini, 2005; Lee, 2010). Para comprobar si la minociclina afecta a la actualización de las memorias, reprodujimos el experimento anterior, reemplazando un objeto familiar por uno nuevo en la sesión de reactivación (diagrama en **Fig.IV.7A**).

En las sesiones previas a la administración (entrenamiento y reactivación), como era de esperar, no hubo diferencias entre ambos grupos farmacológicos, vehículo y minociclina ($ID_{Veh-ENT} = -0,04 \pm 0,04$, $ID_{Veh-RA} = 0,24 \pm 0,05$, $[t(16) = 4,37, p < 0,001]$; $ID_{Mino-ENT} = -0,08 \pm 0,03$, $ID_{Mino-RA} = 0,22 \pm 0,06$, $[t(15) = 4, p < 0,001]$; **Fig.IV.7A**). Sin embargo, la administración de minociclina al finalizar la sesión de reactivación generó índices significativamente más bajos en el test de PR-MLP con respecto al grupo tratado con vehículo ($ID_{Veh-PRMLP} = 0,22 \pm 0,04$, $ID_{Mino-PRMLP} = 0 \pm 0,06$, $[t(16) = 3,12, p = 0,007]$; **Fig.IV.7A**).

Un grupo de ratones fue sometido al mismo protocolo pero eliminando la sesión de reactivación (diagrama en **Fig.IV.7B**). En este nuevo diseño experimental, la administración de minociclina 2 días después del entrenamiento no perjudicó a la formación de la MLP respecto al grupo tratado con vehículo ($ID_{Veh-MLP} = 0,26 \pm 0,06$, $ID_{Mino-MLP} = 0,21 \pm 0,04$, $[t(13) = 0,55, p = 0,59]$), lo que sugiere que la sesión de RA con novedad es requerida para la inhibición de la formación de la memoria duradera causada por el suministro de minociclina 48 horas tras el entrenamiento (**Fig.IV.7B**).

Para determinar si la sesión de reactivación con novedad desencadena un nuevo almacenamiento de información, reprodujimos el experimento inicial pero con un test distinto de PR-MLP en el que utilizamos un objeto nuevo y el objeto novedoso de la reactivación, ahora familiar (diagrama en **Fig.IV.7C**). Utilizando este protocolo, los ratones a los que administramos vehículo exhibieron preferencia por el objeto nuevo tanto en la sesión de reactivación como en el test de PR-MLP ($ID_{Veh-ENT} = -0,05 \pm 0,05$, $ID_{Veh-RA} = 0,27 \pm 0,07$ y $ID_{Veh-PRMLP} = 0,18 \pm 0,04$, $[t(13)_{ENT-RA} = 3,74, p = 0,002]$, $[t(10)_{ENT-PRMLP} = 2,77, p = 0,02]$). En cambio, la administración de minociclina al finalizar la sesión de reactivación provocó un detrimento sobre la reconsolidación, mostrando un índice significativamente inferior con respecto al control ($ID_{Veh-PRMLP} = 0,18 \pm 0,04$, $ID_{Mino-PRMLP} = -0,04 \pm 0,03$, $[t(8) = 4,47, p < 0,001]$; **Fig.IV.7C**). Al eliminar la sesión de reactivación con novedad, ambos objetos del test resultan desconocidos por lo que fueron explorados equitativamente, sin distinción entre grupos farmacológicos ($ID_{Veh-MLP} = -0,09 \pm 0,03$, $ID_{Mino-MLP} = -0,09 \pm 0,06$, $[t(9) = 0,01, p = 0,99]$; **Fig.IV.7D**). De modo que, la administración de minociclina 48 horas después del entrenamiento sólo tuvo efecto sobre la retención de la memoria en presencia de una sesión de reactivación con información novedosa.

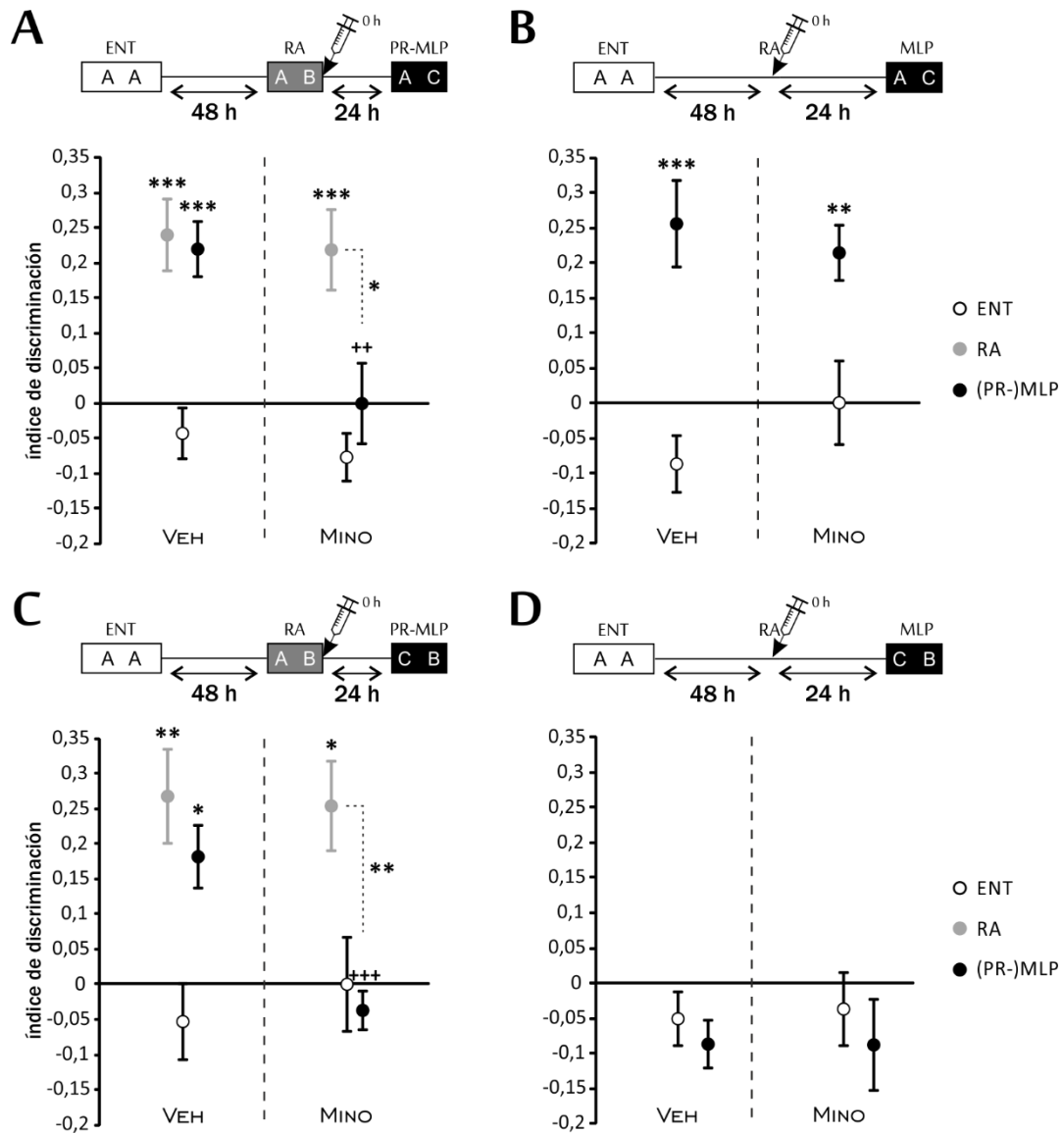


Figura IV.7. La administración sistémica de minociclina tras la reactivación con novedad afecta a la reconsolidación.

(A) Diagrama procedimental y gráfica del índice de discriminación (ID) en las sesiones de entrenamiento (ENT), reactivación (RA) con novedad y test post-reactivación de memoria a largo plazo (PR-MLP), en ratones tratados con minociclina (Mino) o vehículo (Veh) al acabar la RA. Las sesiones de ENT, RA y PR-MLP comparten un mismo objeto: A. (B) Diagrama procedimental y gráfica del ID en las distintas sesiones, en ausencia de RA para el caso anterior. (C) Diagrama procedimental y gráfica del ID en las sesiones de ENT, RA con novedad y PR-MLP, en ratones tratados con Mino o Veh al acabar la RA. El objeto novedoso en la RA, B, es el objeto familiar en el test de PR-MLP. (D) Diagrama procedimental y gráfica del ID en las distintas sesiones, en ausencia de RA para el caso anterior. En todos los casos, N = al menos 4 ratones en cada tratamiento. En cada esquema procedimental las letras A, B y C simbolizan los diferentes objetos utilizados. Se administró Mino o Veh justo al finalizar la sesión de RA (paneles A y C) o 48 h después del entrenamiento cuando no hubo RA (paneles B y D). * Comparación estadística de la RA y el test con respecto al entrenamiento dentro de un mismo grupo farmacológico o significación entre el test y la sesión de RA (línea discontinua). + Comparación estadística entre grupos farmacológicos para una misma sesión. Un símbolo: $p < 0,05$, dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

IV. 4 EFECTO DE LA MINOCICLINA SOBRE LA ACTIVACIÓN NEURONAL EN EL HIPOCAMPO DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

IV. 4.1 Efecto de la administración sistémica de minociclina sobre la expresión de c-Fos durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos

Las proteínas codificadas por genes de expresión neuronal inmediata temprana están vinculadas con la formación de memorias duraderas (Robertson, 1992; Abraham et al., 1993; Kaczmarek, 1993; Dragunow, 1996). La inducción de la expresión de estos genes depende de la actividad neuronal, por lo que el reconocimiento en una célula de estas proteínas nos indica un cambio en la actividad basal de la neurona. Para determinar si el déficit en el establecimiento de la MLP, provocado por la inhibición microglial, está relacionado con una alteración de la actividad neuronal, analizamos el efecto de la administración de minociclina o vehículo sobre la densidad de neuronas hipocampales inmunomarcadas para c-Fos en ratones sacrificados 1,5 horas después de una sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos (diagrama en **Fig.IV.8A**). Como control de la expresión basal de c-Fos, un grupo de ratones de cada situación farmacológica no realizó la sesión de entrenamiento.

Los ratones a los que suministramos vehículo tras el entrenamiento mostraron un incremento en el número de neuronas c-Fos+ en todas las regiones del circuito hipocampal estudiadas (GD, CA3 y CA1) en respuesta a la sesión de entrenamiento. En cambio, los animales a los que inyectamos minociclina exhibieron un menor grado de inducción en las células piramidales de las subregiones CA3 y CA1 tras la sesión de entrenamiento (CA3: densidad_{Veh-ENT} = $7,06 \pm 0,74$, densidad_{Mino-ENT} = $4,78 \pm 0,27$ céls/U.A. de área, [t (4) = 2,90, p = 0,03]; CA1: densidad_{Veh-ENT} = $9,05 \pm 1,22$, densidad_{Mino-ENT} = $4,94 \pm 0,54$ céls/U.A. de área, [t (5) = 2,72, p = 0,04]; **Fig.IV.8B**).

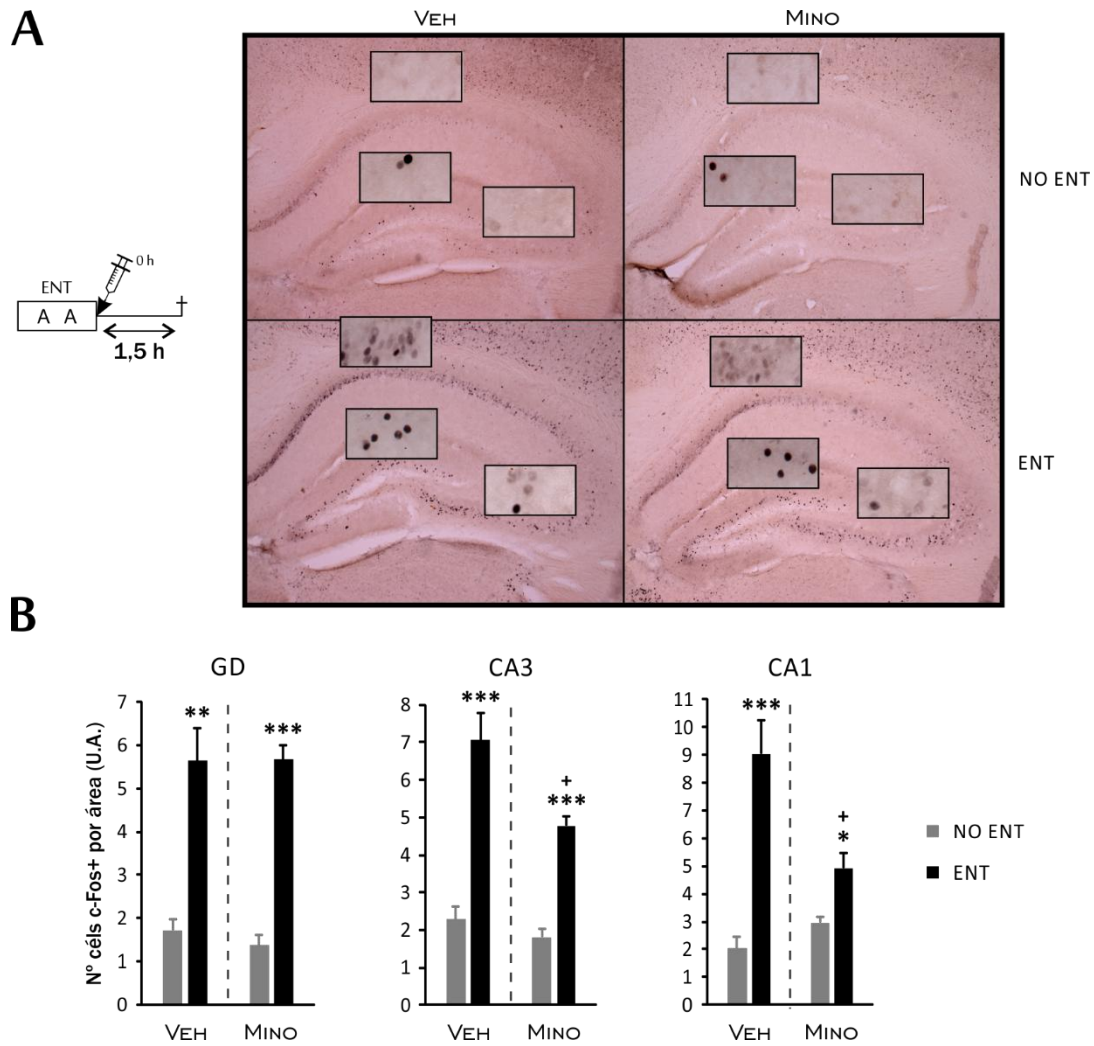


Figura IV.8. La administración sistémica de minociclina tras el entrenamiento reduce la inducción de la expresión de c-Fos en las áreas CA3 y CA1 del hipocampo.

(A) Diagrama del protocolo experimental. La cruz indica el tiempo al que se sacrificaron los ratones con respecto al final de la sesión de entrenamiento (ENT). La letra A simboliza el objeto utilizado. La imagen muestra microfotografías representativas del marcaje de c-Fos en el hipocampo. Los insertos son microfotografías a mayor aumento en el giro dentado (GD), CA3 y CA1. (B) Cuantificación del número de neuronas c-Fos+ por área (U.A.) en GD, CA3 y CA1 de ratones entrenados o no (No ENT), para ambos grupos farmacológicos indicados al pie de cada gráfica. N = al menos 3 ratones, dos cortes por animal. * Comparación estadística entre animales no entrenados y entrenados dentro de un mismo grupo farmacológico. + Comparación estadística entre animales entrenados de diferentes grupos farmacológicos. Un símbolo: $p < 0,05$, dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

IV. 5 EFECTO DE LA MINOCICLINA SOBRE LA ACTIVACIÓN NEURONAL Y EL ÁREA MICROGLIAL EN EL HIPOCAMPO DURANTE LA RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

IV. 5.1 Efecto de la administración sistémica de minociclina sobre la expresión de c-Fos durante la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos

Para estudiar el efecto de la inhibición de la microglía en la activación neuronal tras la reactivación de memorias, dos días después del final de la sesión de entrenamiento, administramos minociclina o vehículo a ratones sin reactivar y a ratones reactivados con o sin novedad. 1,5 horas más tarde, cuantificamos la expresión de c-Fos en el hipocampo mediante IHQ (diagrama en **Fig.IV.9A**). Como control de la expresión basal de c-Fos, un grupo de ratones de cada situación farmacológica permaneció en su caja de estabulación. Los ratones reactivados con o sin novedad tratados con vehículo, incrementaron el número de neuronas c-Fos+ en todas las regiones del circuito hipocampal estudiadas (GD, CA3 y CA1; **Fig.IV.9**). Es destacable que en las subregiones CA3 y CA1, la reactivación con novedad provocó un incremento en la expresión de c-Fos significativamente superior al producido por la reactivación sin novedad. En cambio, los ratones a los que administramos minociclina tras la reactivación con novedad exhibieron un menor grado de inducción en las células piramidales de CA3 y CA1 (CA3: densidad_{Veh-AA_AB} = $5,87 \pm 0,53$, densidad_{Mino-AA_AB} = $3,26 \pm 0,50$ céls/U.A. de área, [t (4) = 3,43, p = 0,01]; CA1: densidad_{Veh-AA_AB} = $8,86 \pm 0,86$, densidad_{Mino-AA_AB} = $5,27 \pm 0,51$ céls/U.A. de área, [t (4) = 3,07, p = 0,03]; **Fig.IV.9B**).

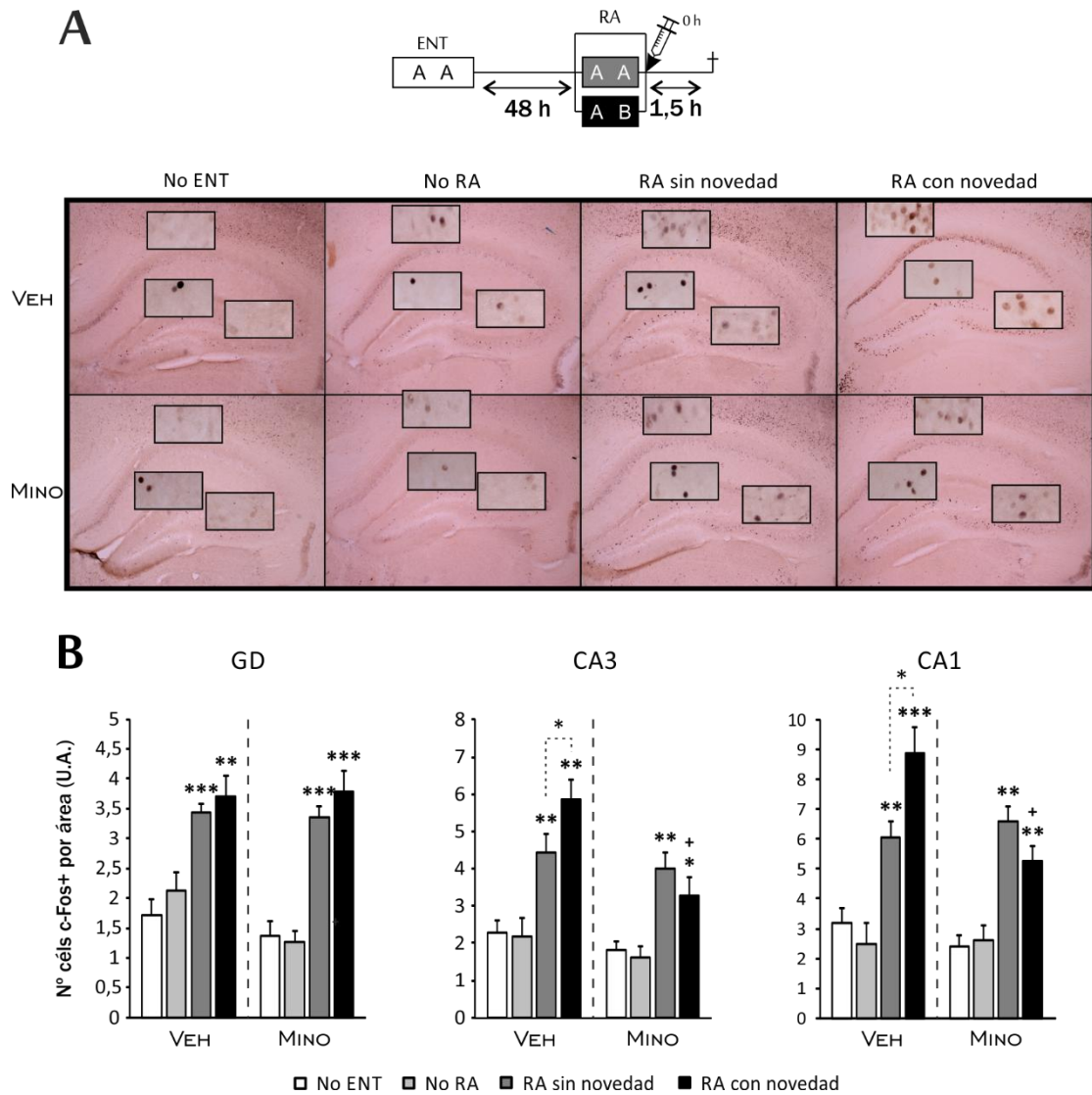


Figura IV.9. La administración sistémica de minociclina tras la reactivación con novedad reduce la inducción de la expresión de c-Fos en las áreas CA3 y CA1 del hipocampo.

(A) Diagrama del protocolo experimental. La cruz indica el tiempo al que se sacrificaron los ratones con respecto al final de la sesión de reactivación (RA). Las letras A y B simbolizan los diferentes objetos utilizados. La imagen muestra microfotografías representativas del marcaje de c-Fos en el hipocampo. Los insertos son microfotografías a mayor aumento en el giro dentado (GD), CA3 y CA1. (B) Cuantificación del número de neuronas c-Fos+ por área (U.A.) en GD, CA3 y CA1 en las distintas condiciones experimentales, para ambos grupos farmacológicos indicados al pie de cada gráfica. N = al menos 3 ratones, dos cortes por animal. * Comparación estadística con respecto a los animales no estimulados (No ENT) dentro de un mismo grupo farmacológico o significación entre ambos grupos de reactivación (línea discontinua). + Comparación estadística entre animales reactivados con novedad de diferentes grupos farmacológicos. Un símbolo: $p < 0,05$, dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

IV. 5.2 Efecto de la administración sistémica de minociclina sobre el área de células microgliales durante la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos

Como vimos anteriormente, durante la consolidación se produce un incremento en el área microglial vulnerable a minociclina (**Fig.IV.2**). Para comprobar si la reconsolidación modifica el tamaño de las células microgliales, aislamos el encéfalo 1,5 horas post-reactivación y medimos el área de la microglía marcada contra EGR-1 en la región de CA1, donde se produjo una mayor reducción de la inducción de c-Fos tras la reconsolidación a causa del tratamiento con minociclina (**Fig.IV.9**).

Los ratones que recibieron vehículo al finalizar la sesión de reactivación sólo manifestaron un incremento significativo en el área microglial EGR-1+ cuando la reactivación contenía novedad ($\text{área}_{\text{Veh-NoENT}} = 0,0399 \pm 0,0027$ frente al $\text{área}_{\text{Veh-AA}_{AB}} = 0,0540 \pm 0,0031$ U.A., [t (4) = 3,45, p = 0,02]; **Fig.IV.10A**). El tamaño celular de la microglía EGR-1+ de los animales no reactivados o reactivados sin novedad fue similar al de los ratones no estimulados. Por otro lado, con la intención de verificar si el incremento de tamaño celular, ocasionado por la reactivación con novedad sobre la microglía, era sensible a minociclina, administramos este fármaco justo al acabar las distintas versiones de reactivación (diagrama en **Fig.IV.10A**). En todos los casos en los que administramos minociclina, el área promedio de la microglía EGR-1+ fue similar al de los ratones no reactivados ($\text{área}_{\text{Veh-AA}_{AB}} = 0,0540 \pm 0,0031$, $\text{área}_{\text{Mino-AA}_{AB}} = 0,0434 \pm 0,0016$ U.A., [t (4) = 3,05, p = 0,03]; **Fig.IV.10A**). Al calcular la frecuencia relativa acumulada para los diferentes intervalos de área celular, observamos un desplazamiento hacia intervalos mayores en respuesta a la reactivación con novedad, que fue bloqueado por el tratamiento con minociclina (**Fig.IV.10B**). Concretamente, un 37,26% de células con áreas comprendidas en el intervalo (0-0,06) en ratones que permanecieron en la caja fue localizado en un intervalo superior, [0,06-0,1), en ratones reactivados con novedad del grupo control. El tratamiento con minociclina tras la reactivación con novedad, supuso un menor desplazamiento hacia áreas superiores: un 13,22% de células con áreas localizadas en (0-0,04) fueron desplazadas al intervalo [0,04-0,06) tras la reactivación con novedad. Así, en los ratones reactivados con novedad, aquellos que fueron tratados con minociclina presentaron un 32,58% menos de células en el intervalo de mayor área, [0,06-0,1), con respecto a los ratones inyectados con vehículo. Por otro lado, la reactivación sin novedad también implicó un desplazamiento hacia intervalos de áreas superiores, pero en un porcentaje de células menor y sin apenas variación entre ambos grupos farmacológicos (vehículo: 12,32%; minociclina: 7,47%), de manera que sólo una diferencia de 3,18% en el porcentaje de células ubicadas en [0,06-0,1) distinguió a ambos tratamientos.

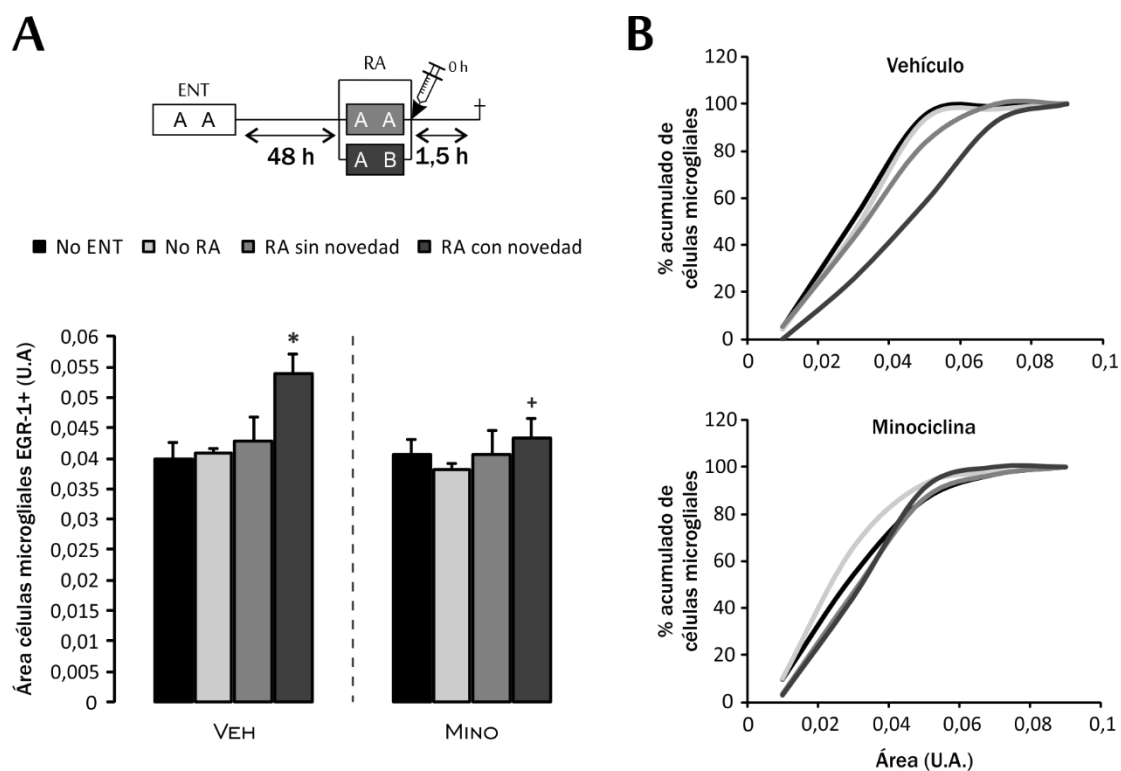


Figura IV.10. La administración sistémica de minociclina inhibe el aumento de tamaño microglial en CA1 que se produce tras la reactivación con novedad.

(A) Esquema del protocolo experimental. La cruz indica el tiempo al que se sacrificaron los ratones con respecto al final de la sesión de reactivación (RA). Las letras A y B simbolizan los diferentes objetos utilizados. La gráfica representa el área promedio de células microgliales EGR-1+ en unidades arbitrarias (U.A.) en la región CA1 del hipocampo en las distintas condiciones experimentales, para ambos grupos farmacológicos indicados al pie de la gráfica. (B) Porcentaje acumulado del número de células microgliales EGR-1+ respecto al total en los distintos intervalos de área celular. N = al menos 3 ratones, dos cortes por animal. * Comparación estadística con respecto a los animales no estimulados (No ENT) dentro de un mismo grupo farmacológico. + Comparación estadística entre animales reactivados con novedad de diferentes grupos farmacológicos. Un símbolo: $p < 0,05$.

IV. 6 ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE LA ASTROGLÍA EN EL HIPOCAMPO TRAS LA EXPLORACIÓN DE NUEVA INFORMACIÓN

IV. 6.1 Análisis de la expresión génica en el hipocampo de diferentes marcadores astroglicales a distintos tiempos tras la exposición a un ambiente rico

Los astrocitos contribuyen activamente en el control de la transmisión sináptica, participando como tercer componente de la sinapsis junto con los elementos presináptico y postsináptico (Araque et al., 1999; Halassa et al., 2007). Con el objetivo de ver si se producen cambios transcripcionales en los astrocitos durante la formación de memorias duraderas, analizamos la transcripción de distintos marcadores astroglicales tras la

exposición a nueva información (AR). Así pues, aislamos el hipocampo de ratones sacrificados a diferentes tiempos tras la exploración de un ambiente rico, y comparamos la expresión génica de *gfap*, *s100β* y el gen codificante de la enzima serina racemasa (*srr*) con respecto a los ratones no estimulados (NAR; diagrama en **Fig.IV.11**). Los tres marcadores exhibieron un incremento en la expresión a 1 hora post-AR siendo significativo para *s100β* y *srr* (*s100β*: $F(5, 21) = 14,42$, $p < 0,001$, para 1 hora: $[t(6) = 3,96$, $p = 0,005]$; *srr*: $F(5, 18) = 3,42$, $p = 0,02$, para 1 hora: $[t(5) = 3,05$, $p = 0,02]$). Sólo en el caso de *s100β*, el incremento se mantuvo en tiempos posteriores: 3 y 6 horas, aunque en menor magnitud ($[t(5) = 4,93$, $p = 0,003]_{3h}$, $[t(6) = 2,69$, $p = 0,03]_{6h}$; **Fig.IV.11**).

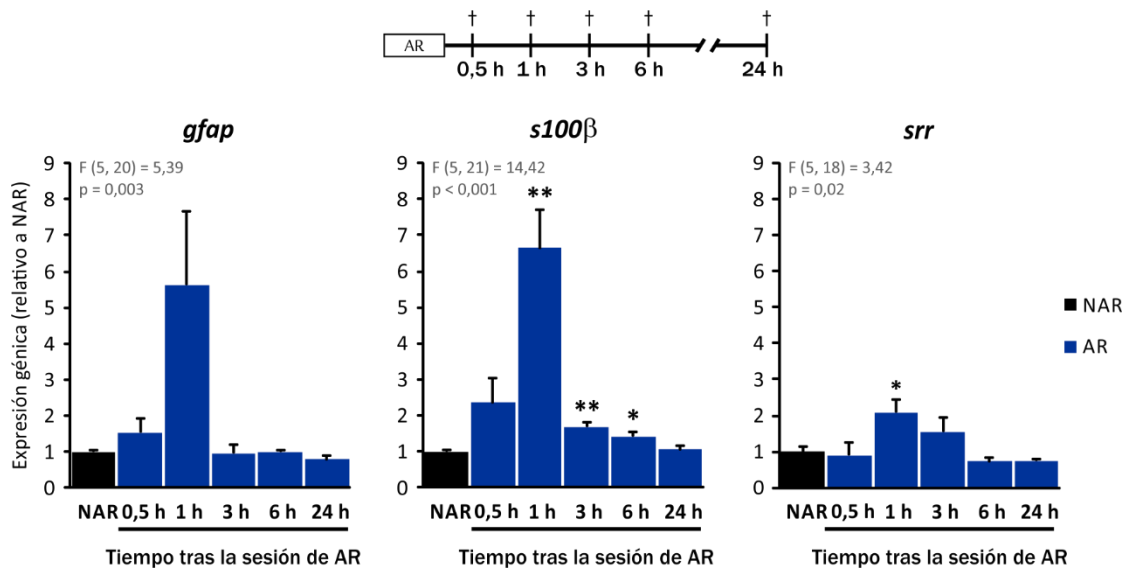


Figura IV.11. La exploración de un ambiente novedoso aumenta la expresión de varios marcadores astrogiales en el hipocampo.

El diagrama muestra los tiempos a los que se sacrificaron los ratones (indicados con una cruz) con respecto al final de la exploración de un ambiente rico (AR). Las gráficas representan los niveles de expresión génica obtenida por RT-PCR semicuantitativa. Los grupos de exploración (columnas azules) están relativizados con respecto al grupo no estimulado (NAR, columna negra), el cual recibe el valor 1. $N =$ al menos 3 ratones por grupo. *Gfap*: proteína ácida fibrilar de glía, *s100β*: proteína soluble de unión a calcio y *srr*: serina racemasa. * Comparación estadística con respecto al grupo NAR. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

IV. 6.2 Análisis del área de astrocitos en el hipocampo tras la exposición a un ambiente rico

La hipertrofia en células astrogiales es indicativo de un cambio de actividad en los astrocitos ante lesiones cerebrales (Khakh y Sofroniew, 2015). Para determinar si durante la formación de memorias duraderas se producen cambios en el área astrogial, cuantificamos el tamaño de los astrocitos GFAP+ en la región CA1 del hipocampo tras la exploración de un ambiente rico. Para ello, sacrificamos los ratones 1,5 horas después del final de la sesión de exploración y realizamos inmunofluorescencia (IF) para el marcador astrogial GFAP en secciones cerebrales que contenían hipocampo dorsal. El promedio del área celular astrogial de los ratones que exploraron un ambiente rico fue

superior al del grupo de ratones que permaneció en la jaula de estabulación (área_{AR} = 280,60±16,31 frente al área_{NAR} = 231,81±11,12 U.A., [t (5)= 2,57, p = 0,04]; **Fig.IV.12**).

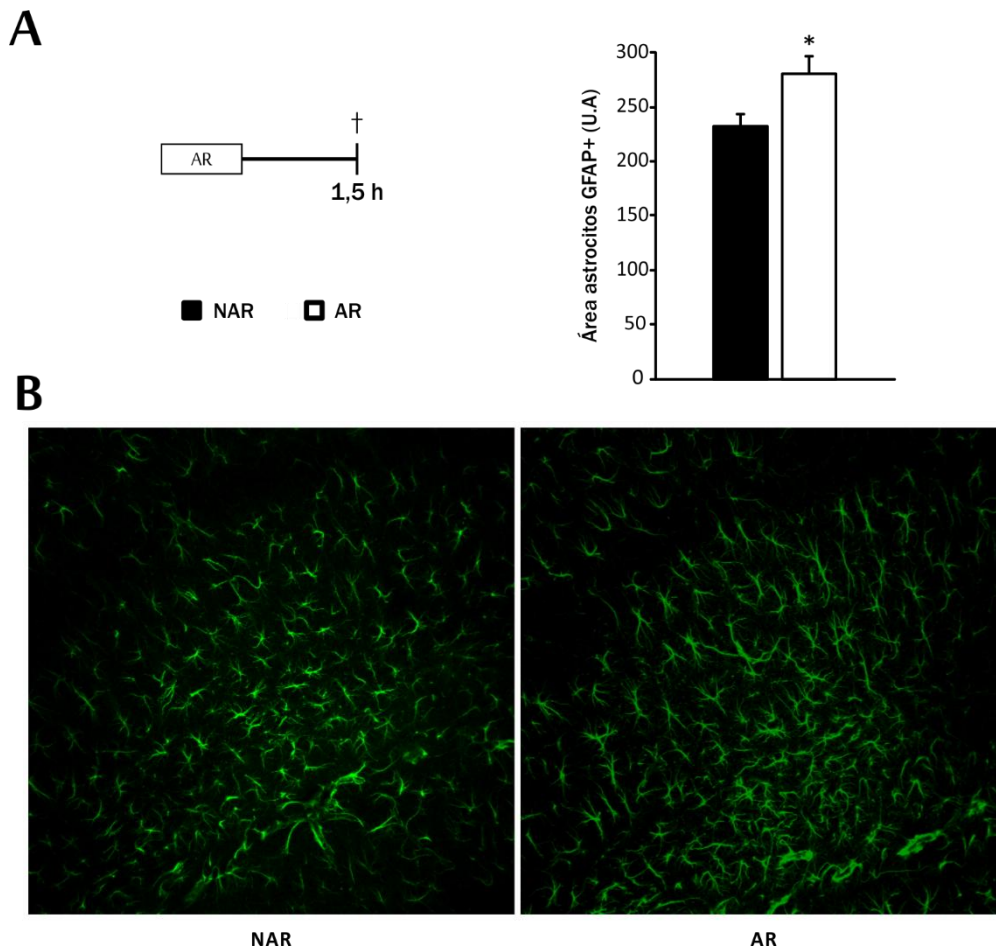


Figura IV.12. La exploración de un ambiente novedoso produce un incremento en el área astrogial en CA1.

(A) El esquema muestra el tiempo en el que se sacrificaron los ratones (indicado con una cruz) con respecto al final de la exploración de un ambiente rico (AR). La gráfica representa el área promedio de astrocitos GFAP+ en unidades arbitrarias (U.A.) en el *stratum radiatum* de CA1 del hipocampo para ratones expuestos a AR o no (NAR). (B) La microfotografía muestra la inmunofluorescencia para GFAP en la región CA1 del hipocampo en ambas situaciones comportamentales. N = al menos 3 ratones, un corte por animal. * Comparación estadística con respecto al grupo NAR. * p < 0,05.

IV. 7 ACCIÓN DE LA D-SERINA SOBRE EL EFECTO NEGATIVO DE LA MINOCICLINA EN LA FORMACIÓN Y LA RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

IV. 7.1 Análisis de la formación de la memoria duradera tras la coadministración sistémica de D-serina y minociclina justo después de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos

Habiendo observado un cambio en el estado activo de los astrocitos del hipocampo tras una tarea cognitiva (**Fig.IV.11** y **Fig.IV.12**), y ante las evidencias publicadas sobre la participación de la astrogliá en el establecimiento de memorias (Moraga-Amaro et al., 2014; Steinman et al., 2016), quisimos establecer el posible papel de los astrocitos como mediador de la interacción microglía-neurona en la formación de la memoria duradera. Para ello, coadministramos D-serina, un gliotransmisor liberado principalmente por astrocitos, implicado en plasticidad sináptica y memoria (Yang et al., 2003; Panatier et al., 2006; Henneberger et al., 2010; Bado et al., 2011), junto a minociclina justo después de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos. Mientras que la administración sistémica de minociclina bloqueó la consolidación ($ID_{Veh-MLP} = 0,26 \pm 0,06$, $ID_{Mino-MLP} = -0,02 \pm 0,03$, [t (13) = 4,39, $p < 0,001$]), la coinyección de D-serina y minociclina restauró la formación de la memoria al nivel del grupo control ($ID_{Veh-MLP} = 0,26 \pm 0,06$, $ID_{Mino+Dser-MLP} = 0,22 \pm 0,05$, [t (9) = 0,52, $p = 0,61$]; **Fig.IV.13**).

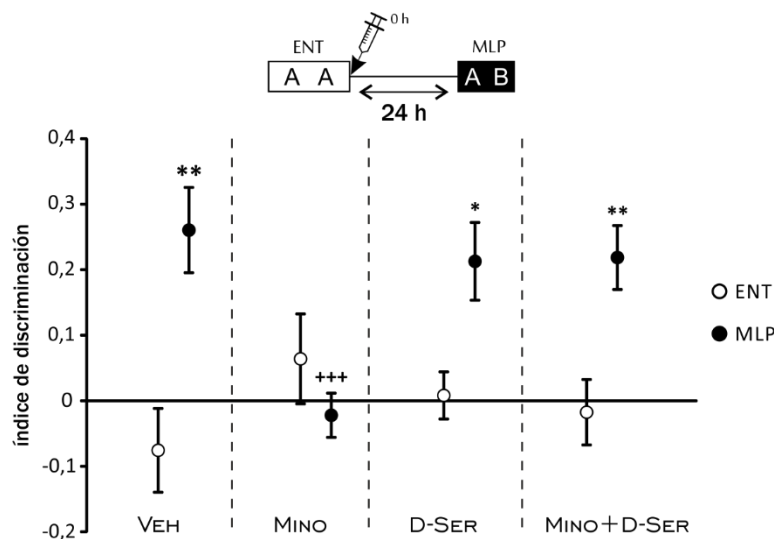


Figura IV.13. La administración sistémica de D-serina revierte la deficiencia en la formación de memoria duradera inducida por la administración de minociclina.

Diagrama procedimental y representación gráfica del índice de discriminación (ID) en la sesión de entrenamiento (ENT) y el test de MLP para los cuatro grupos farmacológicos indicados al pie de la gráfica. N = al menos 5 ratones en cada tratamiento. En el esquema procedimental las letras A y B simbolizan los diferentes objetos utilizados. * Comparación del test de MLP con respecto a la sesión de entrenamiento para un mismo grupo farmacológico. + Comparación estadística con respecto al test de MLP del grupo vehículo. Un símbolo: $p < 0,05$, dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

IV. 7.2 Determinación del requerimiento temporal para que la D-serina revierta el efecto negativo de la minociclina sobre la formación de la memoria duradera de reconocimiento de objetos

Con el propósito de establecer la ventana de tiempo aproximada en la que la D-serina revierte el efecto negativo de la minociclina sobre la formación de la memoria duradera, administramos D-serina al terminar el entrenamiento (0 h), a las 2 horas o a las 4 horas tras el entrenamiento, para estudiar su efecto sobre el déficit cognitivo causado por la minociclina suministrada justo al acabar el entrenamiento (diagrama en **Fig.IV.14**). La coadministración de D-serina justo después o 2 horas después del entrenamiento, bloqueó el efecto inhibitorio de la minociclina sobre la formación de la memoria ($ID_{\text{Mino}_0\text{h-MLP}} = -0,02 \pm 0,03$, $ID_{\text{Mino}_0\text{h+Dser}_0\text{h-MLP}} = 0,22 \pm 0,05$, [t (14) = 4,23, p = 0,002]; $ID_{\text{Mino}_0\text{h-MLP}} = -0,02 \pm 0,03$, $ID_{\text{Mino}_0\text{h+Dser}_2\text{h-MLP}} = 0,25 \pm 0,04$, [t (13) = 4,83, p < 0,001]; **Fig.IV.14**). Sin embargo, cuando coadministramos D-serina 4 horas después del entrenamiento, los ratones presentaron un ID intermedio entre los grupos de administración de vehículo y minociclina, con una diferencia significativa con respecto a los ratones a los que inyectamos minociclina ($ID_{\text{Mino}_0\text{h-MLP}} = -0,02 \pm 0,03$, $ID_{\text{Mino}_0\text{h+Dser}_4\text{h-MLP}} = 0,11 \pm 0,03$, [t (12) = 2,33, p = 0,048]). El hecho de que la coadministración de D-serina a las 4 horas produjera una reversión incompleta sobre el déficit cognitivo, sugiere que para restaurar el efecto negativo de la minociclina sobre el establecimiento de memorias, se necesita de la señalización del gliotransmisor D-serina durante un tiempo inferior a 4 horas tras el entrenamiento. Por otro lado, la administración aislada de D-serina no alteró la consolidación, independientemente del tiempo de administración.

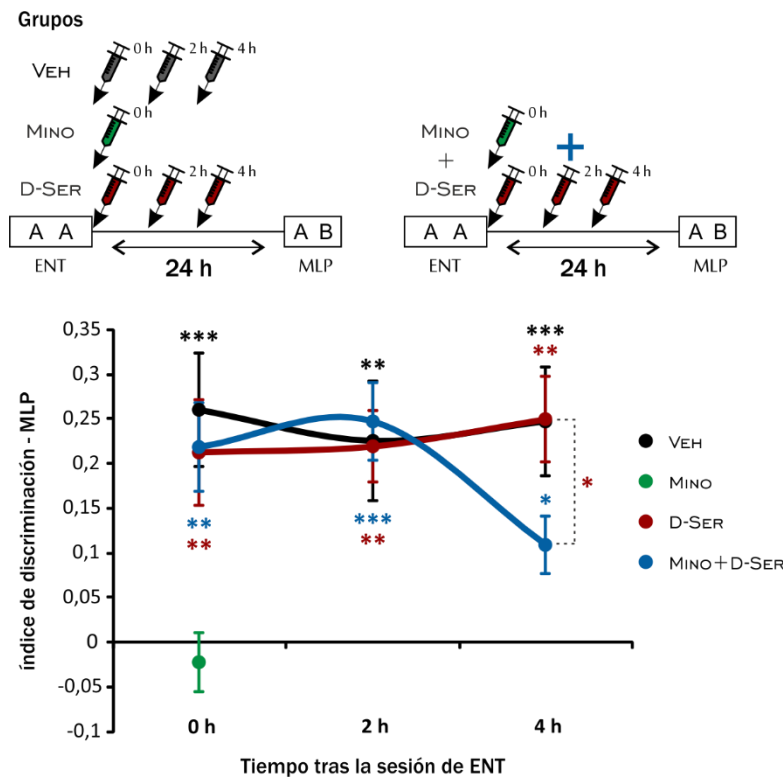


Figura IV.14. La administración sistémica de D-serina revierte la deficiencia inducida por minociclina sobre la formación de memoria duradera en una ventana temporal inferior a las 4 horas.

Diagrama procedimental. Cada jeringa indica los diferentes tiempos de administración de vehículo (Veh) minociclina (Mino), D-serina (D-Ser) o minociclina y D-serina (Mino+D-Ser) tras el final de la sesión de entrenamiento (ENT). En la coadministración de minociclina y D-serina, la minociclina tuvo un tiempo de administración fijo (0 h) y la D-serina variable (0 h, 2 h o 4 h). Las letras A y B simbolizan los diferentes objetos utilizados. La gráfica representa el índice de discriminación (ID) en el test de memoria a largo plazo (MLP) para los cuatro grupos farmacológicos. N = al menos 4 ratones por tiempo de administración en cada tratamiento. * Comparación estadística con respecto al test de MLP del grupo Mino_0h o significación entre D-Ser_4h y Mino_0h+D-Ser_4h (línea discontinua). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

IV. 7.3 Análisis de la reconsolidación de la memoria tras la coadministración sistémica de D-serina y minociclina justo después de la sesión de reactivación con novedad de reconocimiento de objetos

Dado que la D-serina revirtió el déficit en la formación de memoria duradera causado por la minociclina, analizamos el efecto del gliotransmisor sobre el deterioro provocado por la minociclina en la actualización de la memoria. Para ello, todas las administraciones farmacológicas se hicieron sistémicamente justo al terminar la sesión de reactivación con novedad (diagrama en **Fig.IV.15A**). Aunque la D-serina no generó por sí sola ningún efecto sobre la actualización de memorias ya almacenadas, la administración conjunta de D-serina y minociclina eliminó el déficit que la minociclina produjo sobre la reconsolidación ($ID_{Mino-PRMLP} = 0,02 \pm 0,05$, $ID_{Mino+Dser-PRMLP} = 0,23 \pm 0,04$, $[t(17) = 2,37$, $p = 0,03]$; **Fig.IV.15A**).

Los animales no sometidos a la sesión de reactivación, tratados con cada una de las combinaciones farmacológicas 48 horas después del entrenamiento, no mostraron alteraciones en la formación de la memoria (**Fig.IV.15B**).

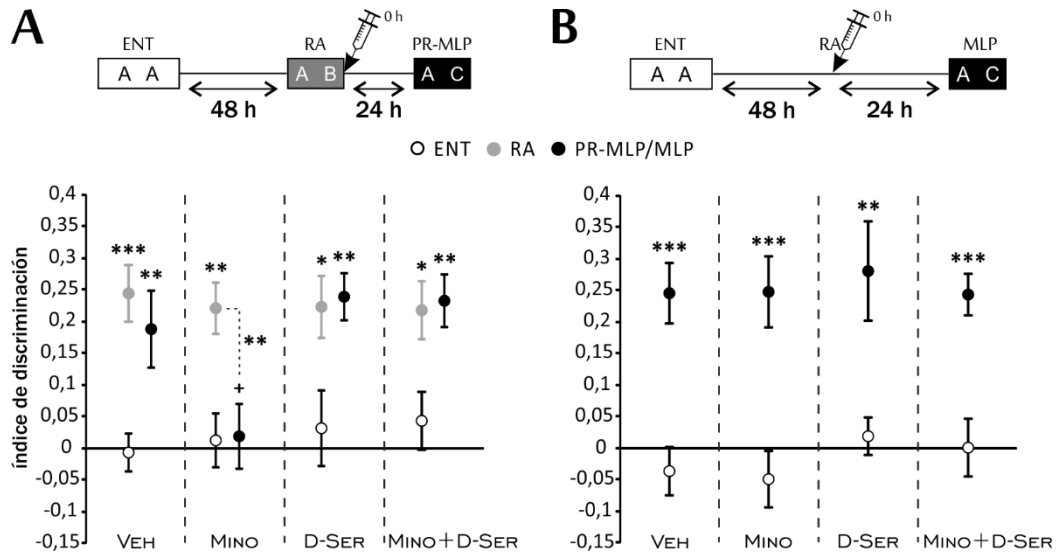


Figura IV.15. La administración sistémica de D-serina revierte la deficiencia inducida por minociclina sobre la actualización de memorias previamente consolidadas.

(A) Diagrama procedimental y gráfica del índice de discriminación (ID) en las sesiones de entrenamiento (ENT), reactivación (RA) con novedad y test post-reactivación de memoria a largo plazo (PR-MLP), para los cuatro grupos farmacológicos indicados al pie de la gráfica. (B) Diagrama procedimental y gráfica del ID en las sesiones de entrenamiento y test de MLP para los animales no reactivados de los cuatro grupos farmacológicos indicados al pie de la gráfica. En todos los casos, N = al menos 4 ratones en cada tratamiento. En cada esquema procedimental, las letras A, B y C simbolizan los diferentes objetos utilizados. Se administró cada tratamiento farmacológico justo después de la sesión de RA (panel A) o 48 h después del entrenamiento cuando no hubo RA (panel B). * Comparación estadística de la RA y el test con respecto al entrenamiento dentro de un mismo grupo farmacológico o significación entre el test y la sesión de RA (línea discontinua). + Comparación estadística con respecto al test del grupo vehículo. Un símbolo: $p < 0,05$, dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

IV. 8 EFECTO DE LA COADMINISTRACIÓN DE D-SERINA Y MINOCICLINA SOBRE LA ACTIVACIÓN NEURONAL Y EL ÁREA MICROGLIAL EN EL HIPOCAMPO DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

IV. 8.1 Efecto de la coadministración sistémica de D-serina y minociclina sobre la expresión de c-Fos durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos

Los experimentos anteriores sugieren que el deterioro cognitivo que produce la inhibición de la activación microglial, podría estar relacionado con una disminución de la activación neuronal en CA3 y CA1. Por ello, quisimos comprobar si la reversión que produce la coadministración de D-serina sobre el déficit en el establecimiento de memorias duraderas inducido por minociclina, es acompañado de la normalización en la expresión de c-Fos tras el entrenamiento. Con este fin, realizamos IHQ para c-Fos en encéfalos de ratones sacrificados 1,5 horas después de finalizar una sesión de entrenamiento, tras la cual se les suministró vehículo, minociclina, D-serina o minociclina junto con D-serina (diagrama en **Fig.IV.16A**). La minociclina mitigó significativamente el aumento de la expresión de c-Fos que depende del entrenamiento en las áreas CA3 y CA1 del hipocampo (p.e. en CA1: densidad_{Veh-ENT} = $9,75 \pm 0,81$, densidad_{Mino-ENT} = $5,93 \pm 0,60$ céls/U.A. de área, [t (10) = 3,52, p = 0,003]). La coadministración de D-serina y minociclina restableció la expresión de c-Fos que depende del entrenamiento a los niveles de los ratones entrenados tratados con vehículo en ambas subregiones (p.e. en CA1: densidad_{Veh-ENT} = $9,75 \pm 0,81$, densidad_{Mino+Dser-ENT} = $10,19 \pm 0,71$ céls/U.A. de área, [t (8) = 0,32, p = 0,76]; **Fig.IV.16B**). Por último, los ratones entrenados y tratados con D-serina mostraron niveles de c-Fos similares a los del grupo entrenado y tratado con vehículo a lo largo del circuito trisináptico (p.e. en CA1: densidad_{Veh-ENT} = $9,75 \pm 0,81$, densidad_{Dser-ENT} = $9,50 \pm 0,44$ céls/U.A. de área, [t (8) = 0,19, p = 0,85]).

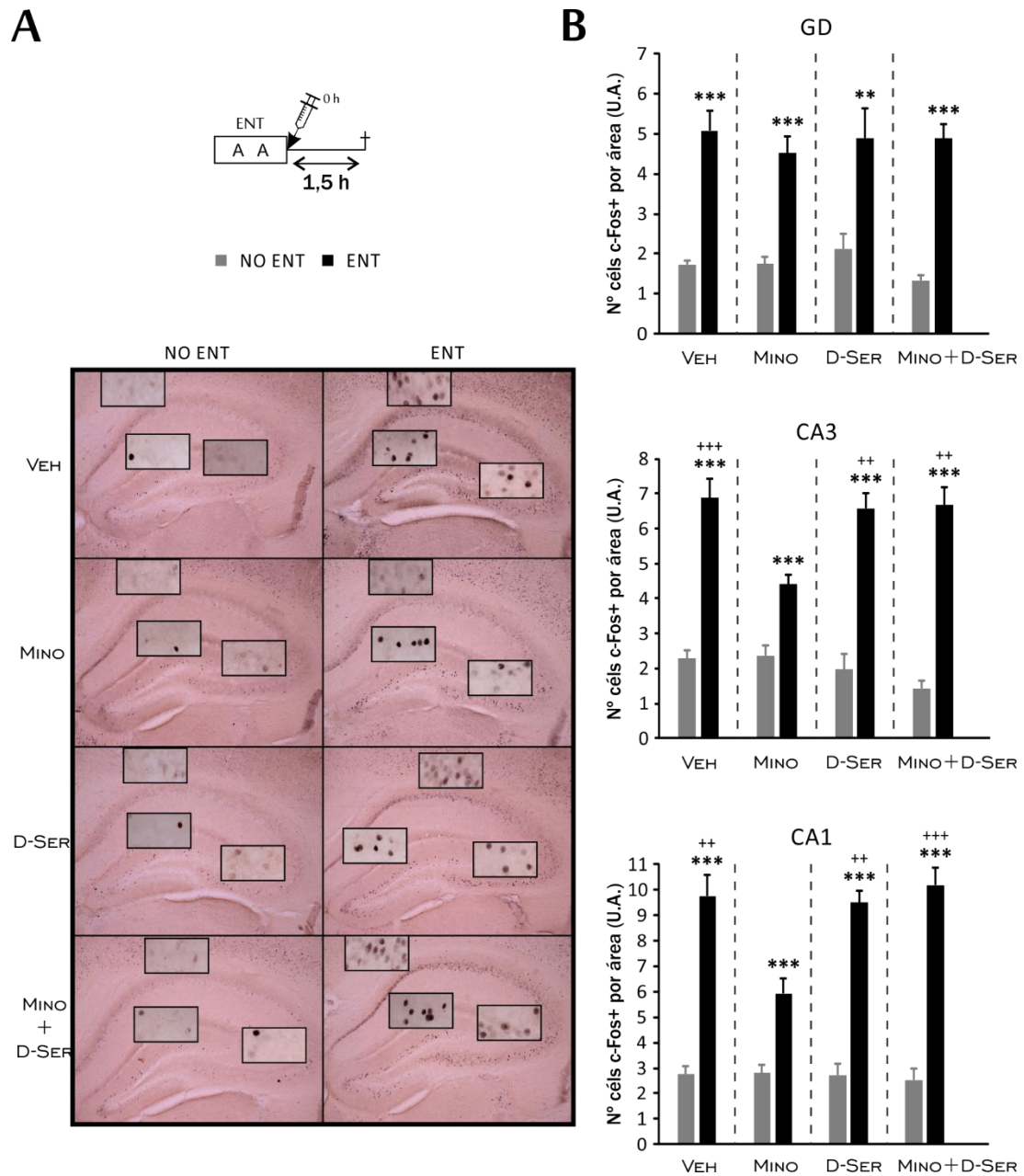


Figura IV.16. La deficiencia de la expresión de c-Fos en las áreas CA3 y CA1 del hipocampo provocada por la minociclina tras el entrenamiento es revertida por la coadministración sistémica de D-serina.

(A) Diagrama del protocolo experimental. La cruz indica el tiempo al que se sacrificaron los ratones con respecto al final de la sesión de entrenamiento (ENT). La letra A simboliza el objeto utilizado. La imagen muestra microfotografías representativas del marcaje de c-Fos en el hipocampo. Los insertos son microfotografías a mayor aumento en el giro dentado (GD), CA3 y CA1. (B) Cuantificación del número de neuronas c-Fos+ por área (U.A.) en GD, CA3 y CA1 de ratones entrenados o no (No ENT), para los cuatro grupos farmacológicos indicados al pie de cada gráfica. N = al menos 3 ratones, dos cortes por animal. * Comparación estadística entre animales no entrenados y entrenados dentro de un mismo grupo farmacológico. + Comparación estadística con respecto a los animales entrenados del grupo minociclina. Dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

IV. 8.2 Efecto de la coadministración sistémica de D-serina y minociclina sobre el área de células microgliales durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos

Según los resultados descritos en la sección IV.1.2, la minociclina bloquea el incremento del tamaño celular de la microglía positiva para EGR-1 en CA1, que se produce tras una sesión similar al entrenamiento de reconocimiento de objetos (**Fig.IV.2**). Así que, quisimos saber si la D-serina coadministrada con minociclina justo después del entrenamiento era capaz de revertir este efecto del tratamiento con minociclina. Para ello, realizamos IHQ para EGR-1 en encéfalos de ratones sacrificados 1,5 horas después de finalizar una sesión de entrenamiento, tras la cual suministramos uno de los diferentes tratamientos farmacológicos (diagrama en **Fig.IV.17A**).

Al comparar los cuatro grupos de administración, observamos que sólo en aquel al que inyectamos vehículo, el área microglial incrementó en respuesta al entrenamiento ($\text{área}_{\text{veh-NoENT}} = 0,0384 \pm 0,0013$, $\text{área}_{\text{veh-ENT}} = 0,0446 \pm 0,0006$ U.A., [t (12) = 3,84, p = 0,002]). El bloqueo que ejerce la minociclina sobre el incremento de tamaño provocado por el entrenamiento ($\text{área}_{\text{Mino-NoENT}} = 0,0399 \pm 0,0011$, $\text{área}_{\text{Mino-ENT}} = 0,0370 \pm 0,0012$ U.A., [t (16) = 1,70, p = 0,11]) no fue revertido por la coadministración con D-serina ($\text{área}_{\text{Mino+Dser-NoENT}} = 0,0391 \pm 0,0017$, $\text{área}_{\text{Mino+Dser-ENT}} = 0,0405 \pm 0,0026$ U.A., [t (5) = 0,48, p = 0,64]). Además, la administración de D-serina inhibió el incremento del área microglial que depende del entrenamiento ($\text{área}_{\text{Dser-NoENT}} = 0,0383 \pm 0,0016$, $\text{área}_{\text{Dser-ENT}} = 0,0403 \pm 0,0037$ U.A., [t (4) = 0,60, p = 0,56]; **Fig.IV.17A**).

Para mostrar una visión global de los diferentes tamaños celulares de microglía EGR-1+ que conforman cada grupo, representamos la frecuencia relativa acumulada para los diferentes intervalos de área. Observamos que el desplazamiento de la curva hacia áreas mayores tras el entrenamiento fue bloqueado por la acción de la minociclina, y atenuado tras la inyección de D-serina o la coadministración de ambas sustancias (**Fig.IV.17B**). Al calcular el porcentaje de células que cambió de intervalo de área en respuesta al entrenamiento, observamos que en los grupos tratados con vehículo o D-serina hay un desplazamiento desde el intervalo (0-0,04) hacia áreas mayores, [0,04-0,1), aunque en proporciones muy diferentes (vehículo: 21,19%; D-serina: 7,02%). También, en los ratones tratados con D-serina más minociclina se produjo un desplazamiento (15,25%) pero hacia un intervalo de menor magnitud [0,04-0,06); a su vez, el porcentaje de células ubicadas en [0,06-0,1) descendió un 8,5% tras el entrenamiento. Por otro lado, en los ratones tratados con minociclina, aquellos que permanecieron en su jaula presentaron un 11,74% de células en [0,04-0,08), que en los ratones entrenados ocuparon un intervalo de áreas más pequeñas, (0-0,04). De manera que, para los ratones entrenados, aquellos que fueron tratados con minociclina o D-serina presentaron un 28,57% y un 16,29% menos de células en [0,04-0,1) respecto los ratones administrados con vehículo; los ratones entrenados y administrados con D-serina más minociclina también presentaron un porcentaje inferior (15,23%) pero en un intervalo más restringido [0,06-0,1).

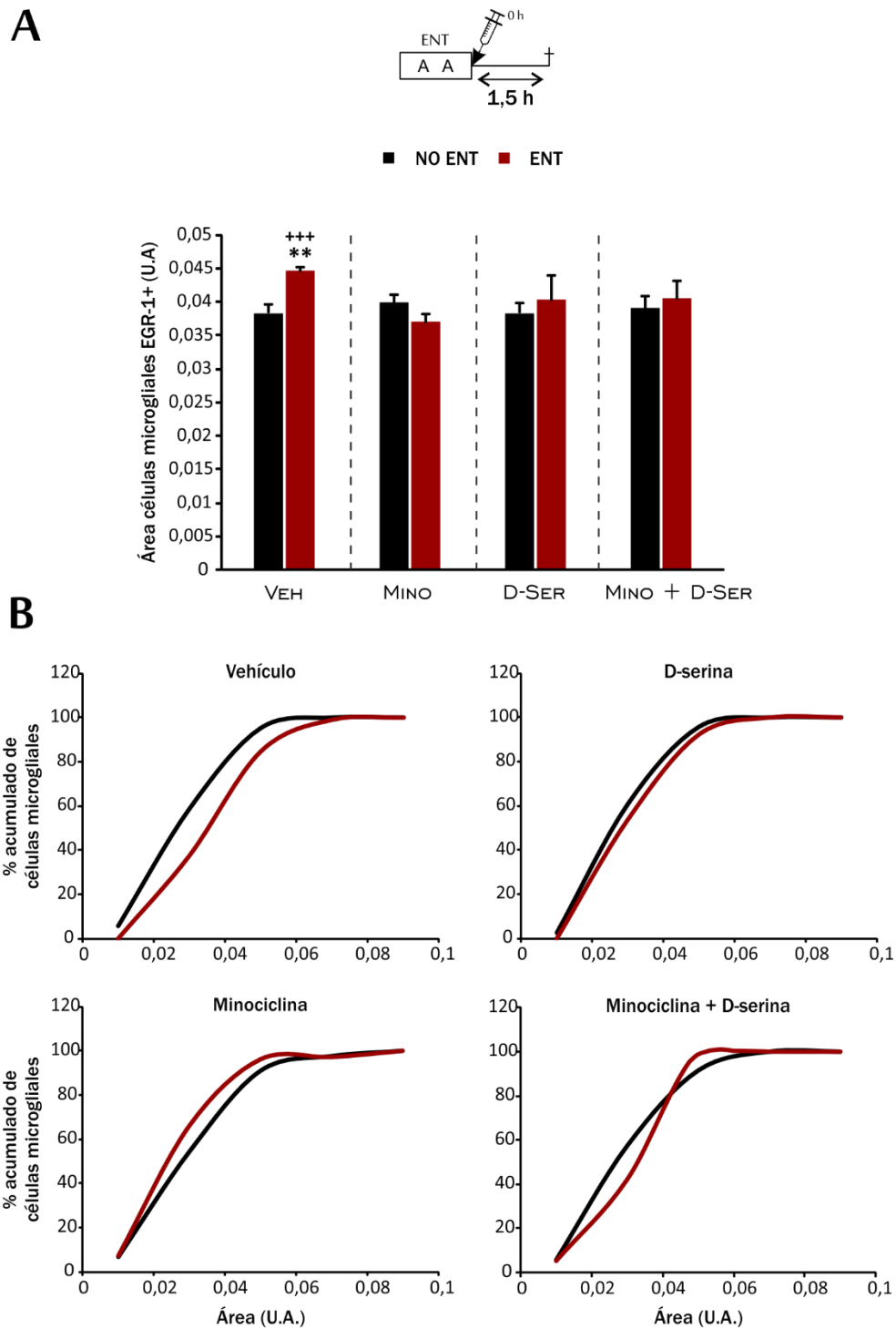


Figura IV.17. La administración sistémica de D-serina no revierte el efecto de la minociclina sobre el incremento de tamaño microglial en CA1 que se produce tras el entrenamiento.

(A) El esquema muestra el tiempo en el que se sacrificaron los ratones (indicado con una cruz) con respecto al final de la sesión de entrenamiento (ENT). La letra A simboliza el objeto utilizado. La gráfica representa el área promedio de células microgliales EGR-1+ en unidades arbitrarias (U.A.) en la región CA1 del hipocampo para ratones entrenados o no (No ENT), en los cuatro grupos farmacológicos indicados al pie de la gráfica. (B) Porcentaje acumulado del número de células microgliales EGR-1+ respecto al total en los distintos intervalos de área celular. N = al menos 3 ratones, dos cortes por animal. * Comparación estadística entre animales

no entrenados y entrenados dentro de un mismo grupo farmacológico. + Comparación estadística con respecto a los animales entrenados del grupo minociclina. Dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

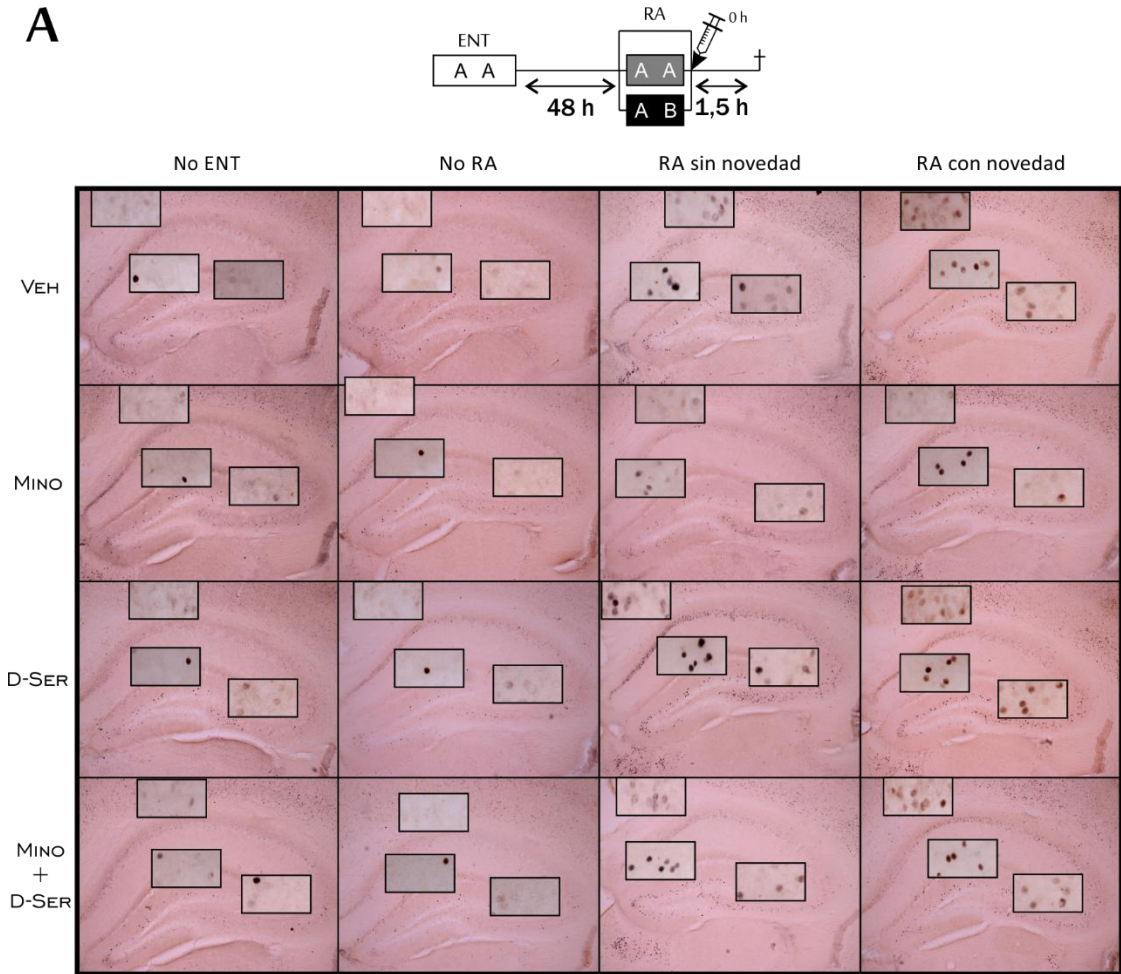
IV. 9 EFECTO DE LA COADMINISTRACIÓN DE D-SERINA Y MINOCICLINA SOBRE LA ACTIVACIÓN NEURONAL Y EL ÁREA MICROGLIAL EN EL HIPOCAMPO DURANTE LA RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

IV. 9.1 Efecto de la coadministración sistémica de D-serina y minociclina sobre la expresión de c-Fos en la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos

Nuestros resultados parecen indicar que el deterioro producido en la reconsolidación de la memoria con novedad debido a la administración de minociclina, está relacionado con una disminución de la expresión de c-Fos en CA3 y CA1 tras la sesión de reactivación con novedad (**Fig.IV.9**). Para comprobar si el efecto de reversión conductual, que se observa en el grupo farmacológico de coadministración de D-serina más minociclina, está relacionado con el restablecimiento de la inducibilidad de la expresión de c-Fos, cuantificamos la densidad de neuronas c-Fos+ en el hipocampo de ratones sacrificados 1,5 horas después de una sesión de reactivación, con o sin novedad, en los distintos grupos farmacológicos estudiados (diagrama en **Fig.IV.18A**).

Los ratones a los que administramos vehículo o D-serina tras la sesión de reactivación, incrementaron el número de neuronas c-Fos+ en todas las regiones del circuito hipocampal (GD, CA3 y CA1) en respuesta a la sesión de reactivación con o sin novedad. Es destacable que en las regiones CA3 y CA1 de ambos grupos farmacológicos, la reactivación con novedad provocó un incremento en la expresión de c-Fos significativamente superior al producido por la reactivación sin novedad (excepto en D-serina-CA3, que es superior pero no significativamente). Por otro lado, la disminución en la expresión de c-Fos inducida por minociclina en CA3 y CA1 tras la reactivación con novedad fue revertida cuando se coadministró con D-serina (CA3: densidad_{Mino-AA_AB} = $4,64 \pm 0,65$, densidad_{Mino+Dser-AA_AB} = $6,82 \pm 0,28$ céls/U.A. de área, [t (8) = 2,60, $p = 0,03$]; CA1: densidad_{Mino-AA_AB} = $5,27 \pm 0,51$, densidad_{Mino+Dser-AA_AB} = $7,92 \pm 0,52$ céls/U.A. de área, [t (6) = 3,63, $p = 0,005$]; **Fig.IV.18B**). Los animales no reactivados de los diferentes grupos experimentales no mostraron diferencia significativa con respecto a los animales que permanecieron en la caja del grupo al que suministramos vehículo.

A



B

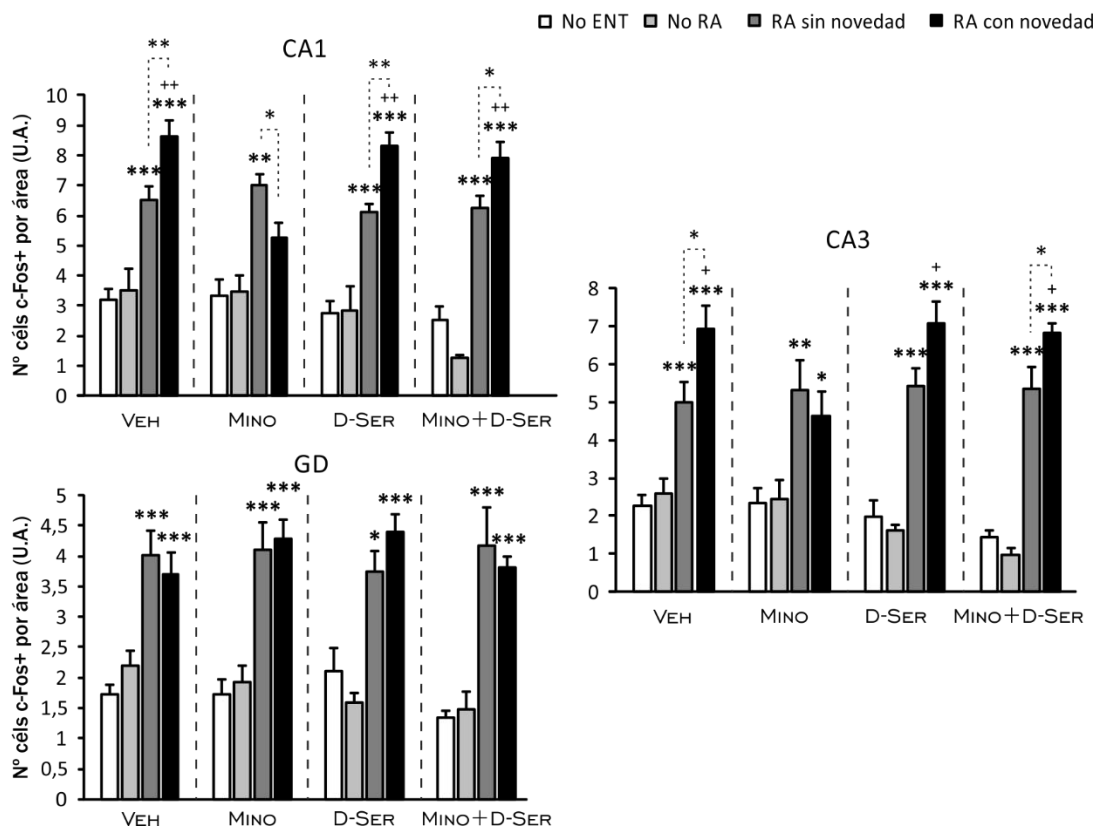


Figura IV.18. La deficiencia de la expresión de c-Fos en las áreas CA3 y CA1 del hipocampo provocada por la minociclina tras la reactivación con novedad es revertida por la coadministración sistémica de D-serina.

(A) Diagrama del protocolo experimental. La cruz indica el tiempo al que se sacrificaron los ratones con respecto al final de la sesión de reactivación (RA). Las letras A y B simbolizan los diferentes objetos utilizados. La imagen muestra microfotografías representativas del marcaje de c-Fos en el hipocampo. Los insertos son microfotografías a mayor aumento en el giro dentado (GD), CA3 y CA1. (B) Cuantificación del número de neuronas c-Fos+ por área (U.A.) en GD, CA3 y CA1 en las distintas condiciones experimentales, para los cuatro grupos farmacológicos indicados al pie de cada gráfica. N = al menos 3 ratones, dos cortes por animal. * Comparación estadística con respecto a los animales no estimulados (No ENT) dentro de un mismo grupo farmacológico o significación entre ambos grupos de reactivación (línea discontinua). + Comparación estadística con respecto a los animales reactivados con novedad del grupo minociclina. Un símbolo: $p < 0,05$, dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

IV. 9.2 Efecto de la coadministración sistémica de D-serina y minociclina sobre el área de células microgliales durante la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos

Dado que la minociclina impide el incremento del área microglial EGR-1+ que se produce en respuesta a la reactivación con novedad (**Fig.IV.10**), comprobamos si la coadministración de D-serina con minociclina revierte dicho efecto. Para ello, tras finalizar la sesión de reactivación, administramos el fármaco correspondiente y sacrificamos a los ratones 1,5 horas después (diagrama en **Fig.IV.19A**). Posteriormente medimos el área de la microglía marcada con EGR-1 en la subregión CA1 del hipocampo.

Los ratones que recibieron vehículo al finalizar la sesión de reactivación sólo mostraron un incremento en el área microglial EGR-1+ cuando la reactivación contenía novedad. Además, nuestros datos corroboraron que la administración de minociclina impide el aumento en el área microglial EGR-1+ tras la reactivación con novedad, mostrando un área promedio similar en todas las situaciones comportamentales estudiadas (no entrenado, reactivado sin novedad y con novedad; **Fig.IV.19A**). Por otro lado, tanto la administración de D-serina como su coadministración con minociclina impidieron el aumento del tamaño microglial EGR-1+ en respuesta a la reactivación con novedad ($\text{área}_{\text{Dser-NoENT}} = 0,0386 \pm 0,0017$, $\text{área}_{\text{Dser-AA_AB}} = 0,0389 \pm 0,0021$ U.A., [t (6) = 0,10, $p = 0,92$]; $\text{área}_{\text{Mino+Dser-NoENT}} = 0,0391 \pm 0,0025$, $\text{área}_{\text{Mino+D-ser-AA_AB}} = 0,0408 \pm 0,0018$ U.A., [t (5) = 0,50, $p = 0,63$]; **Fig.IV.19A**).

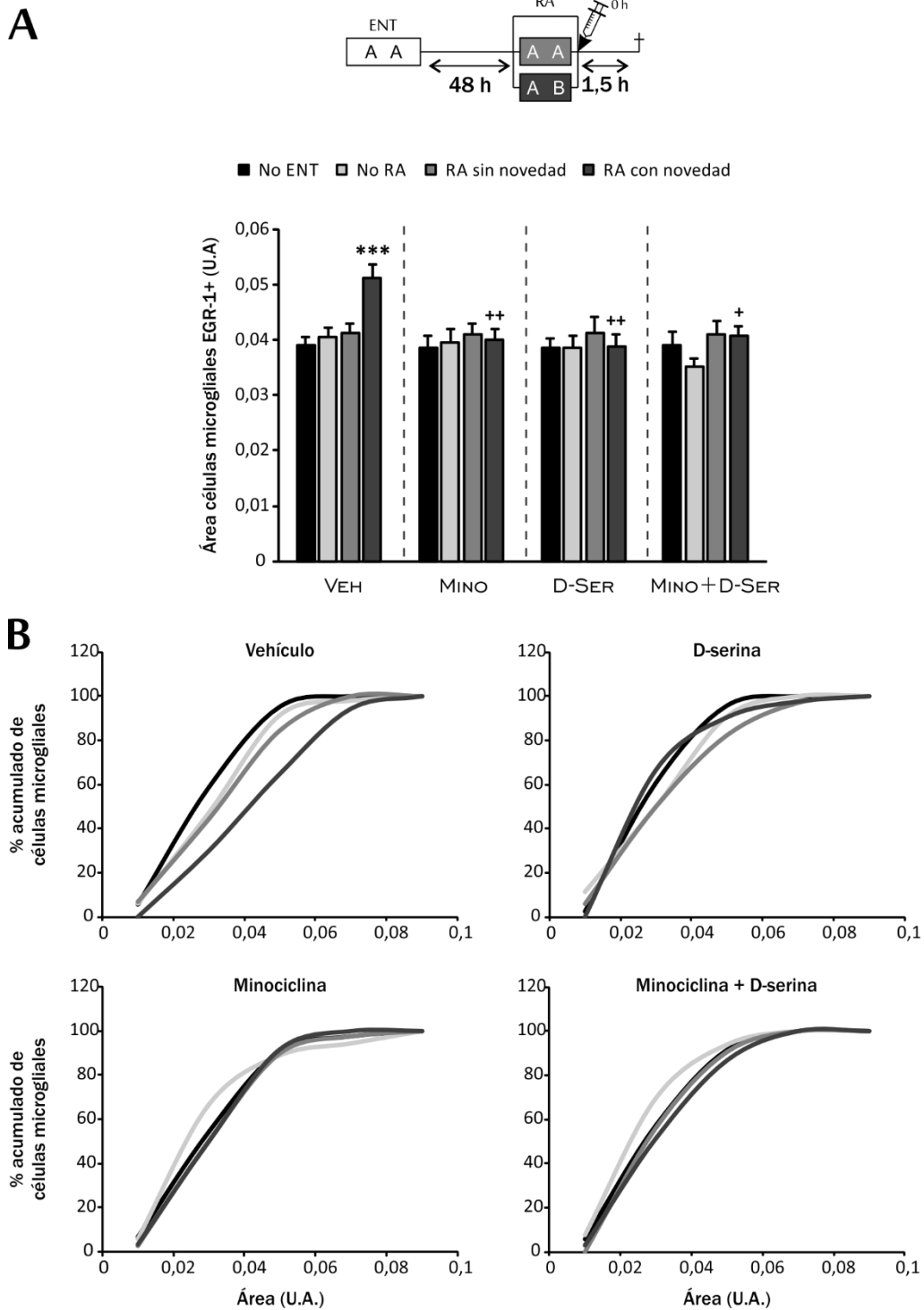


Figura IV.19. La administración sistémica de minociclina, D-serina o ambas sustancias inhibe el aumento de tamaño microglial en CA1 que se produce tras la reactivación con novedad.

(A) Esquema del protocolo experimental. La cruz indica el tiempo al que se sacrificaron los ratones con respecto al final de la sesión de reactivación (RA). Las letras A y B simbolizan los diferentes objetos utilizados. La gráfica representa el área promedio de células microgliales EGR-1+ en unidades arbitrarias (U.A.) en la región CA1 del hipocampo en las distintas condiciones experimentales, para los cuatro grupos farmacológicos indicados al pie de la gráfica. (B) Porcentaje acumulado del número de células microgliales EGR-1+ respecto al total en los distintos intervalos de área celular. N = al menos 3 ratones, dos cortes por animal. * Comparación

estadística con respecto a los animales no estimulados (No ENT) dentro de un mismo grupo farmacológico. + Comparación estadística con respecto a los animales reactivados con novedad del grupo vehículo. Un símbolo: $p < 0,05$, dos símbolos: $p < 0,01$, tres símbolos: $p < 0,001$.

Al calcular la frecuencia relativa acumulada para cada intervalo de área, observamos que el desplazamiento hacia intervalos de áreas mayores tras la reactivación con novedad no ocurre en los grupos a los que administramos minociclina, D-serina o ambas sustancias, respecto al grupo control (**Fig.IV.19B**). De hecho, los ratones tratados con vehículo que permanecieron en la caja presentaron un 30,39% de células en el intervalo (0-0,06) que en el grupo reactivado con novedad se ubicó en un intervalo mayor, [0,06-0,1), reflejo de su activación. En cambio los animales tratados con minociclina, D-serina o la coadministración de ambas sustancias tuvieron un porcentaje mucho menor de células que se desplazaron a intervalos superiores de área: 4,40%, 5,30% y 5,88% respectivamente. De modo que, para los ratones reactivados con novedad, aquellos tratados con minociclina, D-serina o ambas sustancias presentaron un 26,87%, un 25,56% y un 21,85% menos de células en el intervalo de mayor área, [0,06-0,1), con respecto a los ratones inyectados con vehículo. Finalmente, cuando la reactivación no contenía novedad, el tratamiento con minociclina, D-serina o ambas sustancias supuso una diferencia de 5,39%, 2,17% y 6,10% en el intervalo [0,06-0,1) respecto al grupo tratado con vehículo.

V. DISCUSIÓN

El descubrimiento de nuevas funciones desempeñadas por la glía invita a replantearnos cuestiones investigadas desde hace décadas con un enfoque distinto en el que las neuronas y las células gliales colaboran íntimamente para una correcta función cerebral. Uno de los campos de estudio en crecimiento es la implicación de la glía en el comportamiento animal (Oliveira et al., 2015; Rohan Walker y Yirmiya, 2016), como es el caso de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen los procesos de aprendizaje y memoria. Ejemplo de ello queda reflejado en el número aproximado de publicaciones anuales que relacionan astrocitos o microglía con plasticidad sináptica (Fig.V.1).

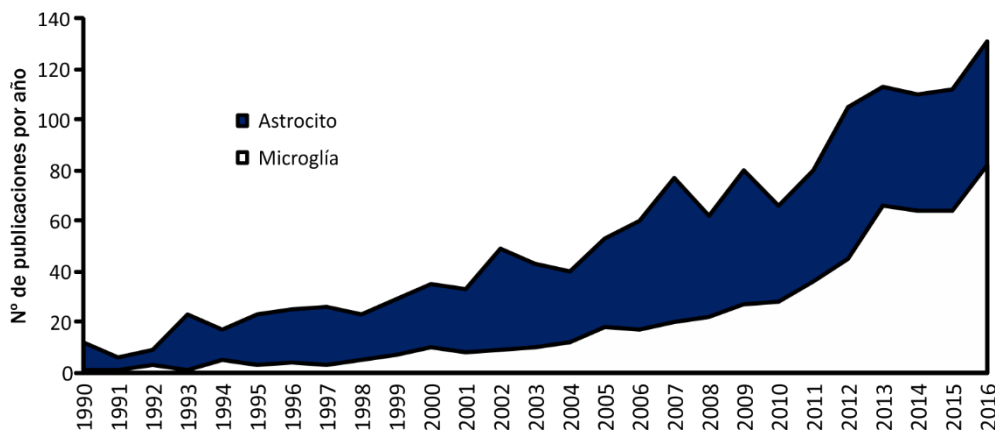


Figura V.1. Número aproximado de publicaciones anuales sobre glía (astrocitos o microglía) y plasticidad sináptica.

Los valores corresponden al número de publicaciones que contienen los términos *astrocyte* y *synaptic plasticity* (azul) o *microglia* y *synaptic plasticity* (blanco) en alguno de los diferentes campos (*All fields*: título, *abstract*...) de los trabajos registrados en *PubMed.gov* desde 1990, año del descubrimiento de las ondas de Ca^{2+} en astrocitos (Cornell-Bell et al., 1990), hasta el año 2016.

El presente trabajo está focalizado en el papel de las células gliales (microglía y astrocitos) en los procesos de adquisición, consolidación y reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. Nuestros resultados demuestran que la inhibición de la activación microglial por administración de minociclina repercute sobre los procesos de almacenamiento y actualización de la memoria de reconocimiento de objetos, disminuyendo la densidad de neuronas piramidales que se activan en el hipocampo dorsal tras la exploración de nuevos objetos. Además, el incremento artificial en los niveles de D-serina, pese a que no recupera la activación microglial, anula el defecto cognitivo causado por el tratamiento con minociclina y rescata la inducción de la activación neuronal. Como desarrollaremos a continuación, de la interpretación de estos resultados inferimos que la exploración de nuevos objetos modifica el estado activo de las células microgliales del hipocampo, que a través de su comunicación con los astrocitos, podrían intervenir como mecanismo regulador de la actividad glutamatérgica de las células piramidales del circuito trisináptico hipocámpal, necesario para el almacenamiento de nueva información de reconocimiento de objetos, como nueva memoria o actualización de una memoria ya adquirida.

V. 1 ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA EN RESPUESTA A UNA TAREA COGNITIVA

La mayoría de los cambios transcripcionales que tienen lugar durante la formación de la MLP están descritos en neuronas; hasta el momento, pocos han sido reconocidos en las células gliales. Recientemente, han sido identificados cambios en la expresión génica de microglía del encéfalo completo de ratón en respuesta a un protocolo conductual, basado en un choque eléctrico en las patas sin posibilidad de escape. Por tanto, se deduce que la formación de una memoria de miedo implica cambios en la actividad microglial (Yu et al., 2017). Nuestro trabajo muestra cómo la exploración breve de varios objetos novedosos incrementa la expresión de *iba1* en el hipocampo (**Fig.IV.1**, pág 69), región clave en los procesos de aprendizaje y memoria explícita (Eichenbaum, 2004), y produce un aumento del área promedio microglial en la subregión CA1 (**Fig.IV.2**, pág 71), zona crucial del hipocampo en la formación de memoria duradera de reconocimiento de objetos (Hammond et al., 2004; Rossato et al., 2007; Cohen et al., 2013; Stackman Jr. et al., 2016). Ambos resultados indican que la microglía modifica su perfil de actividad durante la formación de la memoria. Con objeto de resolver la relación causa-efecto entre ambos eventos, activación de células microgliales y almacenamiento de la información, analizamos si la inhibición de la activación microglial repercute sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Para ello, usamos un tratamiento farmacológico, la minociclina, y un paradigma comportamental que depende del hipocampo, el reconocimiento de objetos (Clark et al., 2000; Hammond et al., 2004; de Lima et al., 2006; Cohen et al., 2013), utilizado en numerosas publicaciones (Ennaceur y Aggleton, 1994; Puma y Bizot, 1998; Tang et al., 1999; Baker y Kim, 2002; Rosa et al., 2003; Schröder et al., 2003; Okuda et al., 2004; Heisler y O'Connor, 2015). La capacidad de la minociclina para atravesar la barrera hematoencefálica nos permite administrarla intraperitonealmente con una dosis similar a la empleada con frecuencia en la literatura, 50 mg/kg (Yong et al., 2004).

El estudio del fenotipo celular de la microglía es utilizado como indicador de su estado de activación (Zhang, Vadakkan, et al., 2008; Cunningham et al., 2013). El suministro de minociclina elimina estos cambios morfológicos característicos de la activación microglial (Alcocer-Gómez et al., 2016), como por ejemplo un aumento del tamaño (Vega-Avelaira et al., 2013; Zhang et al., 2016). Partiendo de este precedente, la administración sistémica de minociclina impide el incremento del área promedio de microglía EGR-1+ en CA1, que se produce en respuesta a la exploración de un ambiente rico, reflejo de un bloqueo eficaz de la activación microglial (**Fig.IV.2**, pág 71). Como respaldo de su acción inhibitoria, existen estudios donde la variación en la expresión de diversos marcadores genéticos (p.e. TNF- α , IL-1 β , interferón- γ , IL-4, IL-10) durante la activación microglial es revertida tras el tratamiento con minociclina (Lee et al., 2003; Lee, Yune, et al., 2004; Wang et al., 2005, 2016; Williamson et al., 2011; Kobayashi et al., 2013; Yu et al., 2017). Dada la importancia de la microglía como células inmunocompetentes, la mayoría de los marcadores considerados pertenecen a las diferentes categorías de activación, clásica (M1) y alternativa (M2), con las que se clasifica la respuesta inmunitaria de los macrófagos (Almolda et al., 2015). Sin embargo, la microglía expresa un núcleo de genes que la

distingue de los macrófagos, incluso durante los cambios de expresión causados por el envejecimiento; además, su perfil transcripcional varía entre regiones cerebrales (Grabert et al., 2016). También, es asumido que la microglía presenta diversos estados activos, acorde a su multifuncionalidad (Kettenmann et al., 2011), por lo que su perfil de actividad no siempre puede acomodarse a la clasificación basada en los fenotipos M1 o M2 (Almolda et al., 2015). Por tanto, es necesario un estudio masivo de expresión que considere tanto marcadores específicos de microglía como marcadores comunes a otros tipos celulares, partícipes o no en la actividad inmunitaria, con objeto de definir el/los estado(s) activo(s) con el/los que la microglía participa en los procesos cognitivos. En este sentido, tratamientos crónicos con minociclina aminoran los déficits de memoria ocasionados por la activación microglial en respuesta a un desorden nervioso (esquizofrenia, alzhéimer, envejecimiento...) (Griffin et al., 2006; Choi et al., 2007; Borre et al., 2012; Kohman et al., 2013; Liaury et al., 2014; Jiang et al., 2015; Wang et al., 2016). En contraste, este trabajo muestra como el tratamiento con minociclina perjudica al almacenamiento de nueva información en condiciones fisiológicas. Lo que nos lleva a plantear la posible existencia de un estado activo microglial inducido durante la formación de la memoria, que en presencia de una lesión es bloqueado por la activación de un perfil inflamatorio, perjudicial para la cognición. En definitiva, la suma de los resultados mencionados en presencia de un desorden neurológico junto con nuestras aportaciones en ausencia de patología colocan a la microglía como un factor influyente en los procesos cognitivos.

V. 2 LA MICROGLÍA PARTICIPA EN LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA DURADERA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

La transformación de la memoria adquirida (MCP) en una memoria duradera (MLP) requiere de un proceso que abarca diferentes escalas de tiempo, que incluye cambios bioquímicos en células individuales (de segundos a horas) e interacciones entre diferentes circuitos cerebrales (de días a años) (Dudai, 2004; Dudai et al., 2015). El diseño de nuestros experimentos está restringido al estudio de los eventos que ocurren durante la consolidación en un periodo de tiempo cercano al entrenamiento y a su repercusión sobre la retención de la memoria 24 horas después. Los resultados obtenidos mediante inhibición de la respuesta microglial por administración de minociclina tras el entrenamiento, indican que la microglía no es requerida para la formación de la MCP, pero sí para la formación de la MLP de reconocimiento de objetos (**Fig.IV.3**, pág 73). Además, observamos que la participación de la microglía en consolidación ocupa al menos las 2 horas siguientes al entrenamiento, puesto que el tratamiento con minociclina bloquea la retención de la MLP cuando se administra justo al final del entrenamiento o 2 horas después, siendo inocua cuando se inyecta a las 6 horas (**Fig.IV.4**, pág 74). Para un mejor ajuste de la ventana de tiempo en la que interviene la microglía sobre la consolidación, se necesitan nuevos tiempos de administración de minociclina entre las 2 y las 6 horas. En consonancia con estos resultados, nuestros datos de expresión de *iba1*

tras la exploración de un ambiente rico muestran una activación de la microglía del hipocampo en los tiempos tempranos tras la exploración (1-3h), que no se observa a las 6 horas (**Fig.IV.1**, pág 69). La similitud de ambas ventanas de tiempo podría significar que la inhibición de la microglía localizada en el hipocampo es la responsable del déficit en la formación de la MLP. Del mismo modo, la inactivación temporal del hipocampo dorsal de ratas mediante inyección intrahipocampal de muscimol justo después o 3 horas después del entrenamiento, perturba a la retención de la memoria 24 horas más tarde, mientras que la administración a las 6 horas no tiene efecto (de Lima et al., 2006). En este sentido, cuando suministramos minociclina en el hipocampo tras la sesión de entrenamiento, reproducimos los mismos resultados de la administración sistémica: un bloqueo de la formación de la MLP sin afectar al aprendizaje (**Fig.IV.5**, pág 75). Sin embargo, no podemos descartar la posible implicación microglial en otras regiones encefálicas.

No obstante, el papel del hipocampo en memoria de reconocimiento de objetos es en ocasiones motivo de controversia, debido a experimentos en los que la lesión del hipocampo no repercute en la retención de la memoria. Un análisis de estos experimentos, realizado por (Cohen y Stackman Jr., 2015), concluye que la mayoría de las lesiones hipocampales carentes de efecto son permanentes, lo que impide distinguir entre las diferentes fases del procesamiento de la información en las que el hipocampo podría estar implicado y favorece la reorganización del lóbulo temporal medial como mecanismo compensador. Además, aquellas lesiones permanentes o temporales que generan déficit presentan un rasgo común, el tiempo que separa la sesión de entrenamiento del test es de al menos 10 minutos, mientras que para intervalos más pequeños no hay intervención del hipocampo. A su vez, sugiere que cuando la exploración de los objetos ocupa tiempos muy breves (memoria débil) no hay participación hipocampal. Las diferencias en el protocolo de reconocimiento de objetos, así como en el tamaño, el momento y la especificidad de la lesión, dificultan la interpretación del conjunto de experimentos, por lo que aún se necesita más investigación para revelar el papel definitivo de las diferentes estructuras implicadas bajo este paradigma. No obstante, en base a nuestros resultados conductuales, podemos especular que la microglía del hipocampo participa en la consolidación temprana de la memoria de reconocimiento de objetos. Como comentaremos posteriormente, el análisis inmunohistoquímico apoya esta proposición.

V. 3 LA MICROGLÍA PARTICIPA EN LA MODIFICACIÓN DE MEMORIAS DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS PREVIAMENTE ALMACENADAS

La distinción entre consolidación y reconsolidación es en ocasiones motivo de debate (Alberini, 2005; McKenzie y Eichenbaum, 2011). Sin embargo, aunque presentan elementos comunes, existen diferencias en los mecanismos celulares y moleculares, como expresión génica, regiones cerebrales involucradas o sensibilidad a tratamientos

amnésicos (Debiec y LeDoux, 2004; Dudai, 2004; Lee, Everitt, et al., 2004; Rossato et al., 2007; Lima et al., 2009; Romero-Granados et al., 2010; Barnes et al., 2012; Lee y Hynds, 2013), indicando que los eventos que transcurren durante la consolidación no se repiten cada vez que una memoria es reactivada.

Nosotros hemos mostrado que la reconsolidación de la memoria ya almacenada, tras ser reactivada con la misma información, no requiere del cambio en la actividad microglial (**Fig.IV.6**, pág 76). Si bien es cierto, cabe considerar que la sesión de reactivación empleada, con los mismos objetos del entrenamiento, podría resultar insuficiente para recuperar el estado lábil de la memoria preexistente y por consiguiente, la retención de la memoria presentaría inmunidad frente a cualquier tratamiento amnésico. Existen varios factores que pueden afectar a la probabilidad de reactivación en diferentes paradigmas: la duración de la sesión de reactivación (Pedreira y Maldonado, 2003) y su separación con respecto al entrenamiento (edad de la memoria) (Milekic y Alberini, 2002; Eisenberg y Dudai, 2004; Boccia et al., 2006). Sin embargo, un trabajo previo de nuestro laboratorio coincidente en ambos parámetros, muestra como un tratamiento amnésico tras la sesión de reactivación bloquea la reconsolidación (Romero-Granados et al., 2010), indicando que nuestro diseño experimental es eficaz para suscitar la reactivación de una memoria previamente consolidada. De modo que, el resultado obtenido refleja la falta de implicación microglial en el proceso de reconsolidación de reconocimiento de objetos, cuando el objetivo prioritario de la reconsolidación es el fortalecimiento de una información ya adquirida. No obstante, la reconsolidación no es solamente un fenómeno que permite estabilizar y reforzar una memoria ya almacenada que ha recuperado su estado lábil (Lee, 2008), sino que además posibilita la integración de nueva información sobre una memoria ya consolidada (Lee, 2010). En ese caso, observamos participación microglial en la actualización del recuerdo con nueva información adquirida durante la sesión de reactivación (**Fig.IV.7**, pág 78). En concreto, el tratamiento con minociclina tras la reactivación con novedad interrumpe la estabilización de la memoria del objeto familiar tras recobrar su estado lábil (**Fig.IV.7A**) y la formación de la memoria para el objeto nuevo de la reactivación (**Fig.IV.7C**).

En relación con ambas formas de reconsolidación (refuerzo y actualización), es sugerido que la reconsolidación de la memoria depende de diferentes regiones corticales cuando se reactiva con dos objetos familiares (Akirav y Maroun, 2006; Romero-Granados et al., 2010), mientras que la actividad del hipocampo está asociada con la detección de novedad y cambios en la configuración espacial (Wan et al., 1999; Viola et al., 2000; Winograd y Viola, 2004; Moncada y Viola, 2006). De acuerdo con esta hipótesis, la inhibición de la síntesis proteica con anisomicina tras la sesión de reactivación sin novedad perjudica a la reconsolidación cuando se inyecta sistémicamente (Romero-Granados et al., 2010) o en la corteza prefrontal ventromedial (Akirav y Maroun, 2006), pero no cuando se administra en el hipocampo (Rossato et al., 2007). En cambio, en presencia de novedad, la administración intrahipocampal de anisomicina tras la reactivación sí bloquea la modificación de la memoria (Rossato et al., 2007). Puesto que la inhibición sistémica de la microglía deteriora ambos procesos asociados con la actividad hipocampal,

consolidación temprana y reconsolidación con novedad, es posible que bajo nuestro diseño experimental sólo esté involucrada la microglía localizada en el hipocampo, como señalábamos anteriormente.

A pesar de que el tratamiento con minociclina impide el aumento del tamaño microglial tras la exploración, existe la posibilidad de que la conducta observada no se deba a la inhibición de la activación microglial, sino a un efecto colateral causado por el tratamiento con minociclina sobre la funcionalidad del hipocampo o el comportamiento de los ratones, capaz de disminuir el rendimiento en la exploración de los objetos, como ansiedad o locomoción reducida. Además, el suministro de minociclina en el peritoneo produce irritación abdominal, incluso si previamente se neutraliza su acidez, lo que origina estrés y liberación de corticoesteroides (Nessler et al., 2002; Yong et al., 2004). Son varias las evidencias que sugieren la nulidad de estos posibles efectos colaterales sobre nuestros resultados: (1) eficiente aprendizaje y reconsolidación sin novedad en animales tratados con minociclina, (2) eficiente consolidación cuando se administra minociclina 6 horas tras el entrenamiento, (3) uso de un tratamiento monodosis a diferencia de otras publicaciones que utilizan dosis repetidas (Griffin et al., 2006; Borre et al., 2012; Kohman et al., 2013; Jiang et al., 2015; Zhang et al., 2016; Wang et al., 2017), (4) dosis muy inferior (50 mg/kg) a la necesaria (100-150 mg/kg) para reducir la locomoción (Kofman et al., 1993), (5) el tratamiento local reproduce los resultados obtenidos en la formación de la MCP y la MLP mediante administración en el peritoneo, y (6) a excepción del estudio de aprendizaje (que no se ve alterado), la separación entre administración y sesión es superior a la vida media de la minociclina (2-3 h) (Yong et al., 2004). No obstante, aún nos encontramos en la etapa temprana del estudio de la contribución glial en la memoria, por lo que el desarrollo de estrategias experimentales alternativas permitirá un abordaje más específico de la implicación de la microglía en el procesamiento de la información *in vivo*.

V. 4 LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL MODULA LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL HIPOCAMPO DURANTE LA FORMACIÓN Y LA ACTUALIZACIÓN DE MEMORIAS DURADERAS DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

En nuestro trabajo hemos realizado un estudio de la activación de neuronas en tres subregiones del hipocampo dorsal: GD, CA3 y CA1, tras la exposición a sesiones de reconocimiento de objetos que desencadenan cada una de las fases del procesamiento de la información. Para ello, hemos utilizado el marcaje de c-Fos, trazador indirecto de activación neuronal (Tischmeyer y Grimm, 1999; Guzowski et al., 2005; Gao y Ji, 2009). Los resultados obtenidos revelan un aumento en la densidad de neuronas c-Fos+ en respuesta a una sesión de entrenamiento o de reactivación (con o sin novedad) en las tres regiones del hipocampo, 1,5 horas después de la sesión (**Fig.IV.8** y **Fig.IV.9**, págs 80 y 82). En GD la densidad es similar en las tres situaciones comportamentales (ENT, RA sin y con novedad); en cambio, tras la sesión de entrenamiento y de reactivación con

novedad, las regiones CA3 y CA1 exhiben una densidad mayor con respecto a la sesión de reactivación con objetos familiares. Dicho de otro modo, el asta de Amón del hipocampo manifiesta un mayor grado de actividad durante el almacenamiento de nueva información, ya sea en forma de una memoria nueva o como modificación de un recuerdo. Por tanto, durante las fases vulnerables al tratamiento con minociclina (formación y actualización de la MLP) se produce una mayor inducción en CA3 y CA1 respecto al proceso insensible a minociclina (refuerzo de la MLP), lo que podría sugerir que el mayor grado de inducción ocasionado por la exploración de novedad es mediado por las células microgliales. De acuerdo con este planteamiento, la minociclina reduce la inducción de c-Fos cuando se administra justo después de la sesión de entrenamiento (**Fig.IV.8**, pág 80) o de reactivación con novedad (**Fig.IV.9**, pág 82) en CA3 y CA1, siendo más pronunciado el efecto en CA1, región clave en la memoria duradera de objetos (Hammond et al., 2004; Rossato et al., 2007; Cohen et al., 2013; Stackman Jr. et al., 2016). Del mismo modo, sólo observamos activación microglial, medida como incremento del área de células de microglía EGR-1+, en respuesta a una sesión de entrenamiento (**Fig.IV.2**, pág 71) o de reactivación con novedad (**Fig.IV.10**, pág 84), que igualmente es bloqueada por acción de la minociclina. Por tanto, podemos especular que durante las fases de consolidación y reconsolidación con nueva información se produce una activación microglial que modula la activación de CA3 y CA1, necesaria para la retención de la MLP 24 horas después de la sesión de entrenamiento o de reactivación con novedad. Aunque el porcentaje de células microgliales que se activan podría resultar insuficiente para modular la inducción de la actividad neuronal observada, conviene considerar tres factores: (1) la posible intervención de la microglía fuera de la zona de estudio, el *stratum radiatum* de CA1, (2) el porcentaje de microglía implicada podría ser superior, pues la activación no siempre va acompañada de un cambio morfológico obvio (Eskes et al., 2003; Cunningham et al., 2005), y (3) la acción de un intermediario entre la comunicación de la microglía y las neuronas podría amplificar la señal.

Puesto que las células piramidales del circuito trisináptico son principalmente glutamatérgicas (Radonjic et al., 2014), el mecanismo de regulación de la actividad neuronal podría estar mediado por receptores de glutamato. Aunque existen varias clases de receptores con afinidad por el glutamato, la participación de los receptores de tipo NMDA ha sido extensamente reconocida en procesos de plasticidad sináptica y memoria, teniendo especial relevancia en el hipocampo (Morris, 2013). Los receptores NMDA son heterotetrámeros constituidos por dos subunidades GluN1 y dos subunidades reguladoras GluN2 (A-D) o GluN3 (A-B) (Cercato et al., 2016). La expresión de las subunidades GluN1 y GluN2A (pero no GluN2B), medida por *western blot*, aumenta en el hipocampo de rata 70 minutos después de la sesión de entrenamiento de reconocimiento de objetos con respecto a las ratas sacrificadas inmediatamente después del entrenamiento, sin variar su expresión en la corteza prefrontal. Así, una sesión de entrenamiento podría conducir a un incremento de receptores NMDA en las sinapsis hipocámpales, facilitando los procesos de plasticidad sináptica que contribuyen al almacenamiento de información (Cercato et al., 2016). Trabajos con herramientas farmacológicas y genéticas corroboran la importancia de estos receptores en nuestro

paradigma de estudio. Por ejemplo, el suministro antes del entrenamiento en el hipocampo de ratas de un antagonista del receptor NMDA, APV, afecta a la retención de la memoria 3 horas, pero no 5 minutos, después del entrenamiento (Baker y Kim, 2002). Asimismo, la administración sistémica en ratas del antagonista MK-801, antes o después de la sesión de entrenamiento, bloquea la retención de la memoria 1,5 y 24 horas más tarde (de Lima et al., 2005). Además, ratones transgénicos que sobreexpresan la subunidad GluN2B tienen facilitada la LTP en el hipocampo y la formación de la MLP de reconocimiento de objetos evaluada 1 o 3 días después del entrenamiento (Tang et al., 1999). Del mismo modo, la eliminación en ratones de los receptores NMDA en CA1 bloquea la formación de la memoria cuando las sesiones de entrenamiento y test están separadas por 0,5 horas, 2 horas o 24 horas (Rampon et al., 2000). Todo junto sugiere que la activación de los receptores NMDA del hipocampo es requerida durante los procesos de aprendizaje y memoria de reconocimiento de objetos.

Un importante modulador endógeno de la actividad de los receptores NMDA es el coagonista D-serina, cuya señalización está ligada al componente astrogliar (Panatier et al., 2006; Henneberger et al., 2010; Fossat et al., 2012; Kang et al., 2013). Cuatro factores contribuyen a su potencial regulador: (1) carece de la capacidad neurotóxica del agonista glutamato (Coyle y Tsai, 2004), (2) distribución solapada de la D-serina y los receptores NMDA (Schell et al., 1997), (3) alta afinidad por la D-serina del sitio de unión de glicina (Matsui et al., 1995), y (4) que en el hipocampo *in vivo*, los sitios de unión de glicina no están saturados (Danysz y Parsons, 1998; Panizzutti et al., 2005). En base a todas estas observaciones, cabe considerar a la astrogliá como un posible coregulador de la actividad sináptica a través del sitio de unión de glicina de los receptores NMDA.

V. 5 LOS ASTROCITOS COMO POSIBLES INTERMEDIARIOS DE LA COMUNICACIÓN MICROGLÍA-NEURONAS IMPLICADA EN LA FORMACIÓN Y LA ACTUALIZACIÓN DE MEMORIAS DURADERAS DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

Con objeto de determinar la posible intervención de los astrocitos en el almacenamiento de nueva información, analizamos si la exploración de nuevos objetos origina cambios de expresión en genes asociados a su actividad. Un trabajo reciente describe cambios transcripcionales en astrogliá del hipocampo dorsal tras una tarea cognitiva en genes asociados al papel de los astrocitos como soporte metabólico de las neuronas (Tadi et al., 2015). Nosotros hemos observado un incremento de la expresión en el hipocampo de tres marcadores astroglicales, *gfap*, *s100β* y *srr*, en respuesta a la exploración breve de varios objetos novedosos (**Fig.IV.11**, pág 85). El marcador GFAP, que está asociado con la activación de los astrocitos ante un daño del SNC (Khakh y Sofroniew, 2015), exhibe un incremento no significativo en respuesta a la exploración 1 hora más tarde, reflejo de activación astrogliar. El gen codificante para la proteína de unión a calcio S100-β aumenta su expresión 1 hora después de la sesión y permanece hasta las 6 horas en un nivel apenas

superior con respecto a los ratones no estimulados. Este resultado podría ser un reflejo del reconocimiento de la actividad sináptica por los astrocitos, pues ha sido propuesto que la secreción de S100- β actúa como prevención frente al daño por hiperactividad, al regular negativamente la actividad nerviosa; así, la delección de *s100 β* mejora el rendimiento de los ratones en paradigmas que dependen del hipocampo (Nishiyama et al., 2002). Además, es sugerida su implicación en memoria (Hydén y Lange, 1970) y procesos de plasticidad sináptica que dependen del Ca²⁺ neuronal, dado que la aplicación de S100- β exógeno aumenta la concentración de Ca²⁺ en neuronas y astrocitos en cultivo (Nishiyama et al., 2002). No obstante, S100- β no sólo se localiza en el citoplasma de los astrocitos sino también en las células endoteliales de los plexos coroideos y los oligodendrocitos (Rajewska-Rager y Pawlaczyk, 2016). Finalmente, *srr*, el gen que codifica para la enzima serina racemasa, implicada en la síntesis de D-serina (Wolosker, Blackshaw, et al., 1999; Wolosker, Sheth, et al., 1999; De Miranda et al., 2002), aumentó ligeramente su expresión 1 hora después de la sesión de exploración. Este leve incremento podría ser insuficiente para subir los niveles de D-serina, sin embargo, la relación entre transcripción y actividad enzimática no es directa, ya que excluye los procesos de traducción, modificaciones post-traduccionales y mecanismos de regulación. Por ello, no podemos descartar una mayor biosíntesis del D-aminoácido en respuesta a la exploración de objetos. En este sentido, un mecanismo de regulación sobre la funcionalidad de la serina racemasa mediado por la proteína quinasa C ha sido identificado como responsable de una mayor producción de D-serina en el hipocampo de ratas, sacrificadas tras el test de MCP de reconocimiento de objetos, sin modificación del nivel transcripcional de *srr* (Vargas-Lopes et al., 2011).

Por otro lado, observamos un incremento en el área de astrocitos GFAP+ del *stratum radiatum* de CA1 durante la consolidación temprana evocada por la exploración de objetos (**Fig.IV.12**, pág 86), lo que indica, junto con los cambios de expresión, activación de los astrocitos en respuesta a la exploración. Podría ser un reflejo de la posible participación de los astrocitos en el almacenamiento de información.

Con el propósito de aproximarnos al presunto papel astrogliar en la formación de la memoria, simulamos el efecto de la gliotransmisión mediante la administración de D-serina exógena. A pesar de la débil difusión de la D-serina a través de la barrera hematoencefálica (Pernot et al., 2012), una dosis de 50 mg/kg, similar a la que utilizamos (75 mg/kg), es suficiente para inducir un aumento de la activación hipocampal (Panizzutti et al., 2005) y facilitar la memoria de reconocimiento de objetos sin afectar a la locomoción ni causar ansiedad (Bado et al., 2011), a diferencia de dosis muy altas (600-1300 mg/kg) y ansiogénicas (Labrie, Clapcote, et al., 2009) empleadas habitualmente en experimentos conductuales (Duffy et al., 2008; Zhang, Gong, et al., 2008).

Nosotros mostramos que la coadministración de D-serina, revierte el déficit ocasionado por la inhibición de la función microglial sobre la retención de la MLP 24 horas después del entrenamiento (**Fig.IV.13**, pág 87) o de la reactivación con novedad (**Fig.IV.15**, pág 90). Además, la D-serina mantiene su capacidad de reversión desde el final del

entrenamiento hasta al menos 2 horas, mientras que la coadministración del gliotransmisor a las 4 horas no recupera completamente la deficiencia cognitiva causada por el suministro de minociclina al acabar el entrenamiento (**Fig.IV.14**, pág 89). Por consiguiente, el requerimiento temporal de la D-serina y de la función microglial (descrito anteriormente) en la formación de la MLP son similares (**Fig.IV.4** y **Fig.IV.14**, págs 74 y 89). De igual modo, el suministro de D-serina posibilita la formación de la MLP cuando se administra 0,5 horas, pero no 6 horas, después de una sesión de entrenamiento de duración insuficiente para retener la memoria de reconocimiento de objetos 24 horas más tarde. Además, observaron que la administración sistémica incrementa el nivel de D-serina en el hipocampo (Bado et al., 2011). Estos resultados, junto con el requerimiento temporal inferior a 6 horas de la activación hipocampal (de Lima et al., 2006), nos aporta una evidencia más de que los procesos de memoria analizados dependen del hipocampo, y que el deterioro causado por minociclina es originado por la inhibición de la microglía localizada en esta región y revertido por la acción de la D-serina exógena.

De la interpretación de los experimentos comportamentales podemos inferir que el déficit cognitivo se produce por un impedimento en la señalización de la D-serina, debido a la inhibición de la actividad microglial. Así, la coadministración del D-aminoácido recupera la densidad de neuronas c-Fos+ mitigada por el tratamiento con minociclina en CA3 y CA1, descrita 1,5 horas después del entrenamiento (**Fig.IV.16**, pág 92) o de la sesión de reactivación con novedad (**Fig.IV.18**, pág 97). Por lo que la unión del coagonista a los receptores NMDA de ambas subregiones hipocampales parece constituir un elemento clave para la formación y actualización de la MLP. En cambio, la coadministración de D-serina no revierte el bloqueo de la función microglial causado por minociclina, medida como incremento del área promedio microglial EGR-1+ en CA1 (**Fig.IV.17** y **Fig.IV.19**, págs 94 y 98), lo que sugiere que el suministro del gliotransmisor simula una fase posterior a la activación de la microglía, que hace de esta un paso prescindible. Además, la administración exclusiva de D-serina evita la activación microglial que se produce durante la formación (**Fig.IV.17**, pág 94) y actualización de la MLP (**Fig.IV.19**, pág 98), lo que podría considerarse como un indicio de que la microglía no se activa cuando la concentración de D-serina ha alcanzado el umbral óptimo para modular la neurotransmisión y sí lo hace cuando el nivel de D-serina es insuficiente. Tal vez se trate de un mecanismo de seguridad con el fin de evitar el exceso de actividad neuronal. Así, la microglía parece detectar la actividad ligada a los receptores NMDA y responder en consecuencia; de hecho, la aplicación del agonista NMDA en rodajas de hipocampo aumenta el área microglial en el *stratum radiatum* de CA1 (Dissing-Olesen et al., 2014), al igual que ocurre durante los procesos de consolidación y actualización de la memoria desencadenados tras una tarea conductual (**Fig.IV.17** y **Fig.IV.19**, págs 94 y 98). Por tanto, el reconocimiento por la microglía del espacio extracelular y de la actividad sináptica podría mediar no sólo el bloqueo de la activación microglial cuando el nivel de D-serina es suficiente, sino además inducir la activación de la microglía cuando se necesita alcanzar un nivel óptimo. Una posible vía que posibilite el reconocimiento de la señalización mediada por D-serina sería la presencia de receptores NMDA en la membrana microglial; sin embargo, aunque existen indicios de su expresión (Gottlieb y

Matute, 1997; Liang et al., 2010; Murugan et al., 2011; Kaindl et al., 2012), la aplicación de NMDA sobre microglía de rodajas hipocampales no genera cambios fisiológicos detectables (Eyo et al., 2014; Wendt et al., 2016), por lo que es necesario corroborar la presencia de receptores funcionales en microglía bajo condiciones fisiológicas. Aun así, otros receptores ionotrópicos (receptor AMPA) y metabotrópicos (mGluRs) de glutamato también han sido identificados en cultivos de microglía (Kettenmann et al., 2011). De hecho, tanto en cultivos celulares como en rodajas de médula espinal ha sido reconocida la migración microglial hacia una fuente de glutamato, en un proceso de quimiotaxis mediado por receptores AMPA y mGluRs (Liu et al., 2009). Por otra parte, un estudio en rodajas de ratón sobre un modelo para el aura de la migraña propone al K^+ como señal activadora de la microglía. De modo que, la microglía es capaz de detectar la activación de los receptores NMDA a través del incremento subsecuente de los niveles de K^+ extracelular. No obstante, el aumento de K^+ obtenido resulta improbable en condiciones fisiológicas (Wendt et al., 2016). Mencionar también, una investigación desarrollada tanto en rodajas de hipocampo como *in vivo*, que muestra como la activación de los receptores NMDA neuronales produce la liberación de ATP, que al ser reconocido por receptores purinérgicos de la microglía, esta extiende sus procesos hacia las neuronas (Dissing-Olesen et al., 2014; Eyo et al., 2014), siendo en CA1 donde se observa una respuesta mayor (Eyo et al., 2014). Finalmente, es preciso señalar la posible participación de otros sistemas no directamente relacionados *a priori* con la función de los receptores NMDA en la interacción neurona-microglía, como por ejemplo la señalización CX₃CL1-CX₃CR1 (**Fig.V.2**, n°2). Scianni et al., 2013 demuestra en rodajas hipocampales de ratón como la aplicación de CX₃CL1 exógeno, un ligando neuronal, potencia la función de los receptores NMDA en CA1 durante la estimulación eléctrica de las colaterales de *Schaffer*, mediante un mecanismo asociado a D-serina y sensible a minociclina. Postularon que la activación de los receptores microgliales CX₃CR1 induce la liberación de adenosina que se une a receptores A_{2A} de microglía y astrocitos (**Fig.V.2**, n°3), estimulando así la liberación de D-serina.

Del análisis de nuestros experimentos con D-serina, podemos extrapolar que la inhibición de la función microglial por minociclina tras la exploración de nueva información mantiene los niveles endógenos de D-serina por debajo del nivel óptimo necesario para incrementar la actividad neuronal en CA3 y CA1, por limitar la activación de los receptores NMDA; así, el tratamiento con D-serina exógena revierte el efecto en ausencia de respuesta microglial. En conformidad con nuestros datos, bajo un paradigma que depende del hipocampo, la deficiencia en memoria espacial, producida por perturbación de la función astrogial con fluoroacetato, es rescatada mediante el suministro de D-serina exógena (Zhang, Gong, et al., 2008).

En definitiva, parece que la microglía interviene sobre el comportamiento cognitivo estudiado modulando los sitios de unión de glicina de los receptores NMDA, de acuerdo con varios factores: (1) la relevancia de los receptores NMDA hipocampales en reconocimiento de objetos y la implicación de la D-serina como modulador de estos receptores, (2) la inocuidad de la minociclina sobre la formación de la MCP y el deterioro

que produce sobre el establecimiento de la MLP (**Fig.IV.3** y **Fig.IV.7**, págs 73 y 78) en consonancia con, la asociación entre D-serina y diferentes procesos relacionados con la formación de memorias duraderas, como LTP (Henneberger et al., 2010; Shigetomi et al., 2013), sinaptogénesis (Diniz et al., 2012) y neurogénesis hipocampal adulta (Sultan et al., 2013), (3) la ausencia de efecto de la administración de D-serina exógena sobre el procesamiento de la información en presencia de microglía activada (**Fig.IV.13** y **Fig.IV.15**, págs 87 y 90), (4) la falta de efecto de la coadministración de D-serina sobre la activación neuronal en aquellas situaciones conductuales independientes de la activación microglial (ratones no entrenados, no reactivados, reactivados sin novedad; **Fig.IV.16** y **Fig.IV.18**, págs 92 y 97), (5) la similitud entre la ventana temporal en la que participa la microglía en la formación de la memoria (**Fig.IV.4**, pág 74) y la ventana de tiempo en la que la D-serina bloquea el déficit cognitivo causado por el tratamiento con minociclina (**Fig.IV.14**, pág 89), y finalmente (6) la reversión originada por la D-serina sobre el efecto de la minociclina en el rendimiento cognitivo y la inducción de la actividad neuronal.

Teniendo en cuenta que los procesos microgliales y astroglicales están estrechamente entrelazados (Jinno et al., 2007) y los astrocitos son clave en la modulación de los receptores NMDA vía D-serina (Panatier et al., 2006; Henneberger et al., 2010; Fossat et al., 2012; Kang et al., 2013), proponemos al componente astroglicial como intermediario de la comunicación microglía-neurona durante la formación y actualización de la memoria de reconocimiento de objetos. Del mismo modo, el papel de los astrocitos como intermediario ha sido propuesto en un estudio en rodajas hipocampales en el que la activación de la microglía por LPS modula la neurotransmisión excitadora. En él, Pascual et al., 2012 propone que la microglía activada libera ATP que es reconocido por receptores P2Y₁ de astroglicia que amplifican la señal por liberar más ATP capaz de reclutar un mayor número de astrocitos (**Fig.V.2**, n°3 y 4). La astroglicia activada libera glutamato que se une a los receptores metabotrópicos mGluR5 de los terminales presinápticos, lo que conduce a un aumento de la exocitosis de neurotransmisores. La activación artificial de los receptores P2Y₁ hace de la función microglial un paso prescindible (Pascual et al., 2012). Por otro lado, no sólo la liberación de ATP por la microglía capacita su comunicación con los astrocitos (Pascual et al., 2012; Shinozaki et al., 2014), sino que además, otras moléculas podrían intervenir, como citoquinas que han sido reconocidas inducir la astrogliosis reactiva ante una lesión (Liddelow et al., 2017). Pese a la importante contribución que aportan los diferentes modelos de interacción celular encontrados en la literatura, es necesario el desarrollo de nuevas investigaciones para esclarecer el mecanismo molecular que sustenta la comunicación bidireccional de la microglía con sus células vecinas, astrocitos y neuronas, durante el almacenamiento de nueva información bajo nuestro paradigma de estudio (**Fig.V.2**).

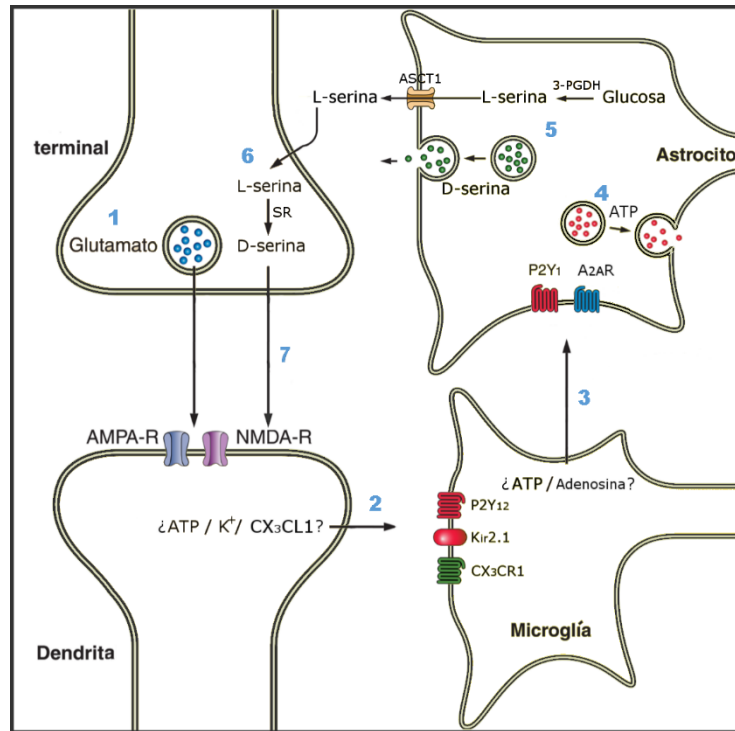


Figura V.2. Modelo teórico propuesto de comunicación neuroglial durante el almacenamiento de nueva información de reconocimiento de objetos.

La exploración de nuevos objetos provoca la activación de neuronas glutamatérgicas del hipocampo (1). Este incremento en la actividad sináptica es reconocido a través de los procesos microgliales que continuamente inspeccionan el medio extracelular de forma dependiente de la actividad sináptica. La fractalquina (CX₃CL1) secretada o anclada en la membrana neuronal y/o el ATP y/o el K⁺ secretados en respuesta a la neurotransmisión glutamatérgica, se unen a los receptores microgliales CX₃CR1 y P2Y₁₂, y al canal Kir2.1 respectivamente, lo que permite a la microglía reconocer los cambios en la actividad sináptica (2). Si la actividad de los receptores NMDA está limitada, la microglía se activa e interacciona vía ATP y/o adenosina con la astrogliá que se unen a los receptores P2Y₁ o A_{2A} respectivamente (3). La activación del receptor P2Y₁ recluta un mayor número de astrocitos por amplificar la señal de ATP (4). La astrogliá activada libera D-serina al exterior por exocitosis y exporta a las neuronas su precursor L-serina (5), que es sintetizado en el astrocito a partir de glucosa procedente de los vasos sanguíneos o la lisis del glucógeno, en un proceso cuya etapa limitante está catalizada por 3-PGDH. La salida y entrada de L-serina del astrocito y las neuronas respectivamente está mediada por transportadores de aminoácidos neutros como el transportador de salida ASCT1. La disponibilidad de L-serina en la neurona posibilita la biosíntesis de D-serina catalizada por SR (6). La D-serina es liberada por Asc-1 u otros transportadores neuronales, lo que permite la activación de los receptores NMDA sinápticos (7). La señalización de la D-serina finaliza con la recaptación por las neuronas y astrocitos (Wolosker et al., 2016). 3-PGDH: D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa, A_{2A}R: receptor de adenosina, Asc-1: transportador de alanina/serina/cisteína, ASCT1: transportador de alanina/serina/cisteína/treonina, CX₃CL1, CX₃CR1: fractalquina y su receptor, Kir2.1: canal de rectificación de entrada de K⁺, P2Y₁₂: receptor metabotrópico purinérgico, AMPA-R, NMDA-R: receptores ionotrópicos de glutamato, y SR: serina racemasa. La ilustración no considera escalas de tamaño ni diferencia microdominios celulares. Fuente: elaboración propia.

A pesar de la posible intermediación de los astrocitos, cabe considerar el potencial de la microglía para regular directamente la neurotransmisión a través de coagonistas del receptor NMDA. En este sentido, han sido identificados en medios condicionados de

microglía, la presencia de glicina capaz de facilitar la inducción de LTP en la colateral de *Schaffer* del hipocampo (Hayashi et al., 2006). Asimismo, en medios de cultivos de microglía expuestos a la proteína β -amiloide, se ha detectado la expresión de serina racemasa y la liberación de D-serina (Wu et al., 2004). Sin embargo, para considerar que la microglía ejerce una modulación directa sobre la actividad sináptica mediante esta vía, es necesario nuevas estrategias que se aproximen a las condiciones fisiológicas para corroborar los resultados obtenidos en cultivos y rodajas.

Por otro lado, un análisis reciente sobre la localización de D-serina y serina racemasa (Wolosker et al., 2016) indica que aunque existe cierta expresión de la enzima en los astrocitos del hipocampo, la biosíntesis del D-aminoácido ocurre principalmente en las neuronas, anulando la noción que se tenía hasta ahora de la D-serina como gliotransmisor. La inespecificidad de los anticuerpos y la diferenciación del perfil transcripcional de los astrocitos *in vitro* respecto *in vivo* son propuestos como responsables de considerar a la astrogliá la fuente principal de D-serina. A pesar de que los astrocitos pudieran generar niveles insuficientes de D-serina para modular la plasticidad sináptica, la astrogliá mantiene un papel relevante en la señalización mediada por D-serina, como fuente de su precursor, la L-serina (Yamasaki et al., 2001) (**Fig.V.2**, nº5 y 6). De hecho, la delección del gen *Phgdh* que codifica la enzima responsable de la producción de L-serina a partir de glucosa, 3-PGDH (sigla en inglés para D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa), disminuye los niveles de D-serina en una magnitud similar a la obtenida mediante delección de *srr* (Basu et al., 2009; Yang et al., 2010). Así, con el objetivo de explicar la relevancia atribuida a la gliotransmisión de D-serina en plasticidad sináptica, ha sido propuesta una nueva hipótesis: la transferencia de L-serina de los astrocitos a las neuronas (Wolosker et al., 2016). Un mecanismo parecido resulta limitante en la formación de la MLP en diferentes paradigmas conductuales, la transferencia de lactato de astrocitos a neuronas (Suzuki et al., 2011; Steinman et al., 2016). Además, la producción de D-serina por las neuronas justifica la unión mayoritaria de la D-serina a los receptores NMDA sinápticos (Papouin et al., 2012) (**Fig.V.2**, nº7), a diferencia de los transmisores gliales que acceden más fácilmente a receptores localizados fuera de la sinapsis, debido a la mayor distancia que separa a la glía de la hendidura sináptica (Araque et al., 2014). Investigaciones futuras son requeridas para dilucidar la relevancia de la D-serina en plasticidad según su procedencia y corroborar la hipótesis de la transferencia de su precursor a las neuronas.

En definitiva, nuestros resultados sugieren que la detección de información novedosa, mediante un mecanismo aún por determinar, podría estimular un cambio en el estado activo de la microglía que la capacite para aumentar, a través de los astrocitos, la densidad de neuronas piramidales activas del hipocampo dorsal, probablemente mediante la modulación de los receptores NMDA (**Fig.V.2**). Este sistema permite el almacenamiento de información como una memoria nueva o un recuerdo actualizado. Por consiguiente, nuestro trabajo demuestra que la cooperación entre las neuronas y las células gliales posibilita un procesamiento complejo de la información.

VI. CONCLUSIONES

1. El procesamiento de la información desencadenado por la exploración de objetos novedosos modifica el estado activo de la microglía y la astrogía en el hipocampo.
2. Durante el establecimiento de la memoria se producen cambios transcripcionales en microglía y astrocitos del hipocampo.
3. La formación de memorias poco duraderas de reconocimiento de objetos no necesita activación microglial.
4. La activación de la microglía hipocampal es requerida para el establecimiento de memorias duraderas de reconocimiento de objetos.
5. El cambio de actividad de las células microgliales es necesario en el proceso de reconsolidación, sólo cuando conduce a la actualización de memorias de reconocimiento de objetos previamente almacenadas.
6. El cambio de actividad microglial modula la correcta activación de neuronas piramidales del hipocampo durante la formación de nuevas memorias y la actualización de recuerdos de reconocimiento de objetos.
7. Un nivel óptimo de D-serina es necesario para la consolidación y la actualización de memorias ya almacenadas.
8. La regulación necesaria para la formación y actualización de la memoria que ejerce la microglía a través de la D-serina, se lleva a cabo mediante un mecanismo sin establecer, posiblemente mediado por los astrocitos, que podrían intervenir como amplificadores de la señal microglial.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, T., Kandel, E. 1998. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Research. Brain Research Reviews* 26: 360-378.
- Abel, T., Lattal, K.M. 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 180-187.
- Abraham, W.C., Mason, S.E., Demmer, J., Williams, J.M., Richardson, C.L., Tate, W.P., Lawlor, P.A., Dragunow, M. 1993. Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 56: 717-727.
- Aggleton, J.P. 1985. One-trial object recognition by rats. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B* 37: 279-294.
- Akirav, I., Maroun, M. 2006. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 16: 1759-1765.
- Alberini, C.M. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences* 28: 51-56.
- Alberini, C.M. 2011. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5: 12.
- Alberini, C.M., Kandel, E.R. 2015. The Regulation of Transcription in Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a021741.
- Alcocer-Gómez, E., Ulecia-Morón, C., Marín-Aguilar, F., Rybkina, T., Casas-Barquero, N., Ruiz-Cabello, J., Ryffel, B. et al. 2016. Stress-Induced Depressive Behaviors Require a Functional NLRP3 Inflammasome. *Molecular Neurobiology* 53: 4874-4882.
- Allaman, I., Lengacher, S., Magistretti, P.J., Pellerin, L. 2003. A2B receptor activation promotes glycogen synthesis in astrocytes through modulation of gene expression. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 284: C696-704.
- Allaman, I., Pellerin, L., Magistretti, P.J. 2000. Protein targeting to glycogen mRNA expression is stimulated by noradrenaline in mouse cortical astrocytes. *Glia* 30: 382-391.
- Almolda, B., de Labra, C., Barrera, I., Gruart, A., Delgado-Garcia, J.M., Villacampa, N., Vilella, A. et al. 2015. Alterations in microglial phenotype and hippocampal neuronal function in transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-10. *Brain, Behavior, and Immunity* 45: 80-97.
- Anders, S., Minge, D., Griemsmann, S., Herde, M.K., Steinhäuser, C., Henneberger, C. 2014. Spatial properties of astrocyte gap junction coupling in the rat hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369: 20130600.
- Andersen, P., Bliss, T.V., Lomo, T., Olsen, L.I., Skrede, K.K. 1969. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiologica Scandinavica* 76: 4A-5A.
- Anderson, C.M., Swanson, R.A. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1-14.
- Andriezen, W.L. 1893. The Neuroglia Elements in the Human Brain. *British Medical Journal* 2: 227-230.

- Anokhin, K.V., Mileusnic, R., Shamakina, I.Y., Rose, S.P. 1991. Effects of early experience on c-fos gene expression in the chick forebrain. *Brain Research* 544: 101-107.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., Volterra, A. 2014. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81: 728-739.
- Araque, A., Martín, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., Buño, W. 2002. Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22: 2443-2450.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences* 22: 208-215.
- Aroeira, R.I., Sebastião, A.M., Valente, C.A. 2014. GlyT1 and GlyT2 in brain astrocytes: expression, distribution and function. *Brain Structure & Function* 219: 817-830.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., Newman, E.A. 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468: 232-243.
- Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., Yirmiya, R. 2003. Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus* 13: 826-834.
- Bachoo, R.M., Kim, R.S., Ligon, K.L., Maher, E.A., Brennan, C., Billings, N., Chan, S. et al. 2004. Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8384-8389.
- Bachstetter, A.D., Morganti, J.M., Jernberg, J., Schlunk, A., Mitchell, S.H., Brewster, K.W., Hudson, C.E. et al. 2011. Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiology of Aging* 32: 2030-2044.
- Bado, P., Madeira, C., Vargas-Lopes, C., Moulin, T.C., Wasilewska-Sampaio, A.P., Maretti, L., Oliveira, R.V. de et al. 2011. Effects of low-dose d-serine on recognition and working memory in mice. *Psychopharmacology* 218: 461-470.
- Baker, D.A., McFarland, K., Lake, R.W., Shen, H., Tang, X.-C., Toda, S., Kalivas, P.W. 2003. Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nature Neuroscience* 6: 743-749.
- Baker, K.B., Kim, J.J. 2002. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 9: 58-65.
- Ballas, N., Liroy, D.T., Grunseich, C., Mandel, G. 2009. Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nature Neuroscience* 12: 311-317.
- Balu, D.T., Coyle, J.T. 2012. Neuronal D-serine regulates dendritic architecture in the somatosensory cortex. *Neuroscience Letters* 517: 77-81.
- Bannerman, D.M., Sprengel, R., Sanderson, D.J., McHugh, S.B., Rawlins, J.N.P., Monyer, H., Seeburg, P.H. 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews. Neuroscience* 15: 181-192.

- Barnes, P., Kirtley, A., Thomas, K.L. 2012. Quantitatively and qualitatively different cellular processes are engaged in CA1 during the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. *Hippocampus* 22: 149-171.
- Barres, B.A. 1991. Glial ion channels. *Current Opinion in Neurobiology* 1: 354-359.
- Barrionuevo, G., Brown, T.H. 1983. Associative long-term potentiation in hippocampal slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 7347-7351.
- Barros, L.F., Courjaret, R., Jakoby, P., Loaiza, A., Lohr, C., Deitmer, J.W. 2009. Preferential transport and metabolism of glucose in Bergmann glia over Purkinje cells: a multiphoton study of cerebellar slices. *Glia* 57: 962-970.
- Basu, A.C., Tsai, G.E., Ma, C.-L., Ehmsen, J.T., Mustafa, A.K., Han, L., Jiang, Z.I. et al. 2009. Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Molecular Psychiatry* 14: 719-727.
- Beck, H., Goussakov, I.V., Lie, A., Helmstaedter, C., Elger, C.E. 2000. Synaptic plasticity in the human dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20: 7080-7086.
- Bélanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism* 14: 724-738.
- Bergersen, L.H., Morland, C., Ormel, L., Rinholm, J.E., Larsson, M., Wold, J.F.H., Røe, A.T. et al. 2012. Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 22: 1690-1697.
- Berlyne, D.E. 1950. Novelty and Curiosity as Determinants of Exploratory Behaviour. *British Journal of Psychology. General Section* 41: 68-80.
- Bernard-Hélary, K., Ardourel, M.-Y., Hévor, T., Cloix, J.-F. 2002. In vivo and in vitro glycogenic effects of methionine sulfoximine are different in two inbred strains of mice. *Brain Research* 929: 147-155.
- Bernard-Helary, K., Lapouble, E., Ardourel, M., Hévor, T., Cloix, J.F. 2000. Correlation between brain glycogen and convulsive state in mice submitted to methionine sulfoximine. *Life Sciences* 67: 1773-1781.
- Bernardinelli, Y., Randall, J., Janett, E., Nikonenko, I., König, S., Jones, E.V., Flores, C.E. et al. 2014. Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. *Current biology: CB* 24: 1679-1688.
- Bertollini, C., Ragozzino, D., Gross, C., Limatola, C., Eusebi, F. 2006. Fractalkine/CX3CL1 depresses central synaptic transmission in mouse hippocampal slices. *Neuropharmacology* 51: 816-821.
- Bevins, R.A., Besheer, J. 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study «recognition memory». *Nature Protocols* 1: 1306-1311.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., Volterra, A. 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391: 281-285.

- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., Volterra, A. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature Neuroscience* 7: 613-620.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., Boddeke, H.W.G.M. 2007. Neuronal «On» and «Off» signals control microglia. *Trends in Neurosciences* 30: 596-602.
- Bilbo, S.D. 2010. Early-life infection is a vulnerability factor for aging-related glial alterations and cognitive decline. *Neurobiology of Learning and Memory* 94: 57-64.
- Bilbo, S.D., Rudy, J.W., Watkins, L.R., Maier, S.F. 2006. A behavioural characterization of neonatal infection-facilitated memory impairment in adult rats. *Behavioural Brain Research* 169: 39-47.
- Bitanhirwe, B.K.Y., Peleg-Raibstein, D., Mouttet, F., Feldon, J., Meyer, U. 2010. Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35: 2462-2478.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L. 2013. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. *Molecular Brain* 6: 5.
- Bliss, T.V., Lomo, T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 232: 331-356.
- Block, M.L., Zecca, L., Hong, J.-S. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience* 8: 57-69.
- Blond, O., Crépel, F., Otani, S. 2002. Long-term potentiation in rat prefrontal slices facilitated by phased application of dopamine. *European Journal of Pharmacology* 438: 115-116.
- Blum, D., Chtarto, A., Tenenbaum, L., Brotchi, J., Levivier, M. 2004. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease* 17: 359-366.
- Boccia, M.M., Blake, M.G., Acosta, G.B., Baratti, C.M. 2006. Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13: 376-381.
- Boks, M.P.M., Rietkerk, T., van de Beek, M.H., Sommer, I.E., de Koning, T.J., Kahn, R.S. 2007. Reviewing the role of the genes G72 and DAAO in glutamate neurotransmission in schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 17: 567-572.
- Borre, Y., Sir, V., de Kivit, S., Westphal, K.G., Olivier, B., Oosting, R.S. 2012. Minocycline restores spatial but not fear memory in olfactory bulbectomized rats. *European Journal of Pharmacology* 697: 59-64.
- Bourne, J.N., Harris, K.M. 2008. Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annual review of neuroscience* 31: 47-67.

- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.-M., Pellerin, L. 2006. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *The European Journal of Neuroscience* 24: 1687-1694.
- Brown, A.M., Ransom, B.R. 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55: 1263-1271.
- Brown, M.W., Aggleton, J.P. 2001. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews. Neuroscience* 2: 51-61.
- Bruttger, J., Karram, K., Wörtge, S., Regen, T., Marini, F., Hoppmann, N., Klein, M. et al. 2015. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* 43: 92-106.
- Buch, T., Heppner, F.L., Tertilt, C., Heinen, T.J.A.J., Kremer, M., Wunderlich, F.T., Jung, S., Waisman, A. 2005. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nature Methods* 2: 419-426.
- Buffalo, E.A., Ramus, S.J., Clark, R.E., Teng, E., Squire, L.R., Zola, S.M. 1999. Dissociation between the effects of damage to perirhinal cortex and area TE. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 6: 572-599.
- Burda, J.E., Sofroniew, M.V. 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81: 229-248.
- Burwell, R.D., Witter, M.P., Amaral, D.G. 1995. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5: 390-408.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22: 183-192.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglsperger, T. et al. 2014. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience* 17: 131-143.
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y. et al. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28: 264-278.
- Caldinelli, L., Sacchi, S., Molla, G., Nardini, M., Pollegioni, L. 2013. Characterization of human DAAO variants potentially related to an increased risk of schizophrenia. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1832: 400-410.
- Camara, M.L., Corrigan, F., Jaehne, E.J., Jawahar, M.C., Anscorb, H., Koerner, H., Baune, B.T. 2013. TNF- α and its receptors modulate complex behaviours and neurotrophins in transgenic mice. *Psychoneuroendocrinology* 38: 3102-3114.
- Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D. et al. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience* 9: 917-924.

- Castro, M.A., Beltrán, F.A., Brauchi, S., Concha, I.I. 2009. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *Journal of Neurochemistry* 110: 423-440.
- Castro-Alamancos, M.A., Donoghue, J.P., Connors, B.W. 1995. Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15: 5324-5333.
- Cercato, M.C., Vázquez, C.A., Kornisiuk, E., Aguirre, A.I., Coletti, N., Snitcowsky, M., Jerusalinsky, D.A., Baez, M.V. 2016. GluN1 and GluN2A NMDA Receptor Subunits Increase in the Hippocampus during Memory Consolidation in the Rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10: 242.
- Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R., Sanderson, M.J. 1991. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6: 983-992.
- Chen, N., Sugihara, H., Sharma, J., Perea, G., Petravicz, J., Le, C., Sur, M. 2012. Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E2832-2841.
- Chen, S.-K., Tvrdik, P., Peden, E., Cho, S., Wu, S., Spangrude, G., Capecchi, M.R. 2010. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell* 141: 775-785.
- Chen, Y., Vartiainen, N.E., Ying, W., Chan, P.H., Koistinaho, J., Swanson, R.A. 2001. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry* 77: 1601-1610.
- Chittajallu, R., Alford, S., Collingridge, G.L. 1998. Ca²⁺ and synaptic plasticity. *Cell Calcium* 24: 377-385.
- Chitu, V., Gokhan, Ş., Nandi, S., Mehler, M.F., Stanley, E.R. 2016. Emerging Roles for CSF-1 Receptor and its Ligands in the Nervous System. *Trends in Neurosciences* 39: 378-393.
- Chitu, V., Nacu, V., Charles, J.F., Henne, W.M., McMahon, H.T., Nandi, S., Ketchum, H. et al. 2012. PSTPIP2 deficiency in mice causes osteopenia and increased differentiation of multipotent myeloid precursors into osteoclasts. *Blood* 120: 3126-3135.
- Choe, K.Y., Olson, J.E., Bourque, C.W. 2012. Taurine release by astrocytes modulates osmosensitive glycine receptor tone and excitability in the adult supraoptic nucleus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32: 12518-12527.
- Choi, Y., Kim, H.-S., Shin, K.Y., Kim, E.-M., Kim, M., Kim, H.-S., Park, C.H. et al. 2007. Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32: 2393-2404.
- Cholet, N., Pellerin, L., Welker, E., Lacombe, P., Seylaz, J., Magistretti, P., Bonvento, G. 2001. Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory

- activation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21: 404-412.
- Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E.A., Buzsáki, G. 2010. Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30: 15298-15303.
- Clark, R.E., Zola, S.M., Squire, L.R. 2000. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20: 8853-8860.
- Clarke, L.E., Barres, B.A. 2013. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews. Neuroscience* 14: 311-321.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., Verderio, C. 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 1354-1362.
- Cohen, S.J., Munchow, A.H., Rios, L.M., Zhang, G., Asgeirsdóttir, H.N., Stackman, R.W. 2013. The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Current biology: CB* 23: 1685-1690.
- Cohen, S.J., Stackman Jr., R.W. 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research* 285: 105-117.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., McLennan, H. 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 334: 33-46.
- Colton, C.A., Wilcock, D.M. 2010. Assessing activation states in microglia. *CNS & neurological disorders drug targets* 9: 174-191.
- Cooke, S.F., Bliss, T.V.P. 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain: A Journal of Neurology* 129: 1659-1673.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., Smith, S.J. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science (New York, N.Y.)* 247: 470-473.
- Coyle, J.T., Tsai, G. 2004. The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology* 174: 32-38.
- Cunningham, C., Wilcockson, D.C., Champion, S., Lunnon, K., Perry, V.H. 2005. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25: 9275-9284.
- Cunningham, C.L., Martínez-Cerdeño, V., Noctor, S.C. 2013. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33: 4216-4233.
- Dallérac, G., Chever, O., Rouach, N. 2013. How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 159.

- Damani, M.R., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Amaral, J., Fariss, R.N., Wong, W.T. 2011. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell* 10: 263-276.
- D'Angelo, E., Rossi, P., Gall, D., Prestori, F., Nieuw, T., Maffei, A., Sola, E. 2005. Long-term potentiation of synaptic transmission at the mossy fiber-granule cell relay of cerebellum. *Progress in Brain Research* 148: 69-80.
- Danysz, W., Parsons, C.G. 1998. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacological Reviews* 50: 597-664.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R. et al. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience* 8: 752-758.
- Davis, H.P., Squire, L.R. 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin* 96: 518-559.
- De Miranda, J., Panizzutti, R., Foltyn, V.N., Wolosker, H. 2002. Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 14542-14547.
- De Pittà, M., Brunel, N., Volterra, A. 2016. Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience* 323: 43-61.
- Debiec, J., LeDoux, J.E. 2004. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience* 129: 267-272.
- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews. Neuroscience* 11: 339-350.
- DeVito, L.M., Balu, D.T., Kanter, B.R., Lykken, C., Basu, A.C., Coyle, J.T., Eichenbaum, H. 2011. Serine racemase deletion disrupts memory for order and alters cortical dendritic morphology. *Genes, Brain, and Behavior* 10: 210-222.
- D'Haese, J.G., Friess, H., Ceyhan, G.O. 2012. Therapeutic potential of the chemokine-receptor duo fractalkine/CX3CR1: an update. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16: 613-618.
- Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., Volterra, A. 2011. Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature Neuroscience* 14: 1276-1284.
- Dias, R.B., Rombo, D.M., Ribeiro, J.A., Henley, J.M., Sebastião, A.M. 2013. Adenosine: setting the stage for plasticity. *Trends in Neurosciences* 36: 248-257.
- Dickerson, B.C., Eichenbaum, H. 2010. The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35: 86-104.
- Diniz, L.P., Almeida, J.C., Tortelli, V., Vargas Lopes, C., Setti-Perdigão, P., Stipursky, J., Kahn, S.A. et al. 2012. Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by

- transforming growth factor β signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 41432-41445.
- Dissing-Olesen, L., LeDue, J.M., Rungta, R.L., Hefendehl, J.K., Choi, H.B., MacVicar, B.A. 2014. Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34: 10511-10527.
- Doorn, K.J., Brevé, J.J.P., Drukarch, B., Boddeke, H.W., Huitinga, I., Lucassen, P.J., van Dam, A.-M. 2015. Brain region-specific gene expression profiles in freshly isolated rat microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 84.
- Dragunow, M. 1996. A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behavior Genetics* 26: 293-299.
- Dringen, R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62: 649-671.
- Duan, S., Anderson, C.M., Keung, E.C., Chen, Y., Chen, Y., Swanson, R.A. 2003. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23: 1320-1328.
- Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology* 55: 51-86.
- Dudai, Y., Karni, A., Born, J. 2015. The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron* 88: 20-32.
- Dudek, S.M., Bear, M.F. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 4363-4367.
- Duffy, S., Labrie, V., Roder, J.C. 2008. D-serine augments NMDA-NR2B receptor-dependent hippocampal long-term depression and spatial reversal learning. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33: 1004-1018.
- Duffy, S., MacVicar, B.A. 1995. Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15: 5535-5550.
- Eichenbaum, H. 2004. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44: 109-120.
- Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R., Lipton, P. 2012. Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36: 1597-1608.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A.P., Ranganath, C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual Review of Neuroscience* 30: 123-152.
- Eisenberg, M., Dudai, Y. 2004. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. *The European Journal of Neuroscience* 20: 3397-3403.
- ElAli, A., Rivest, S. 2016. Microglia Ontology and Signaling. *Molecular Medicine* 72.

- Elloso, M.M., Phiel, K., Henderson, R.A., Harris, H.A., Adelman, S.J. 2005. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligands. *The Journal of Endocrinology* 185: 243-252.
- Elmore, M.R.P., Najafi, A.R., Koike, M.A., Dagher, N.N., Spangenberg, E.E., Rice, R.A., Kitazawa, M. et al. 2014. Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Signaling Is Necessary for Microglia Viability, Unmasking a Microglia Progenitor Cell in the Adult Brain. *Neuron* 82: 380-397.
- Ennaceur, A., Aggleton, J.P. 1994. Spontaneous recognition of object configurations in rats: effects of fornix lesions. *Experimental Brain Research* 100: 85-92.
- Ennaceur, A., Delacour, J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research* 31: 47-59.
- Eroglu, C., Barres, B.A. 2010. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468: 223-231.
- Eskes, C., Juillerat-Jeanneret, L., Leuba, G., Honegger, P., Monnet-Tschudi, F. 2003. Involvement of microglia-neuron interactions in the tumor necrosis factor- α release, microglial activation, and neurodegeneration induced by trimethyltin. *Journal of Neuroscience Research* 71: 583-590.
- Espinosa, J.S., Wheeler, D.G., Tsien, R.W., Luo, L. 2009. Uncoupling dendrite growth and patterning: single-cell knockout analysis of NMDA receptor 2B. *Neuron* 62: 205-217.
- Eyo, U.B., Peng, J., Swiatkowski, P., Mukherjee, A., Bispo, A., Wu, L.-J. 2014. Neuronal hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA receptors and microglial P2Y₁₂ receptors after status epilepticus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34: 10528-10540.
- Familian, A., Boshuizen, R.S., Eikelenboom, P., Veerhuis, R. 2006. Inhibitory effect of minocycline on amyloid β fibril formation and human microglial activation. *Glia* 53: 233-240.
- Feil, S., Valtcheva, N., Feil, R. 2009. Inducible Cre mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 530: 343-363.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., Carmignoto, G. 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43: 729-743.
- Fiacco, T.A., McCarthy, K.D. 2004. Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24: 722-732.
- Fields, R.D., Araque, A., Johansen-Berg, H., Lim, S.-S., Lynch, G., Nave, K.-A., Nedergaard, M. et al. 2014. Glial biology in learning and cognition. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 20: 426-431.
- Filosa, J.A., Bonev, A.D., Straub, S.V., Meredith, A.L., Wilkerson, M.K., Aldrich, R.W., Nelson, M.T. 2006. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nature Neuroscience* 9: 1397-1403.

- Flanary, B.E., Streit, W.J. 2004. Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. *Glia* 45: 75-88.
- Fontainhas, A.M., Wang, M., Liang, K.J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., Fariss, R.N. et al. 2011. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One* 6: e15973.
- Fossat, P., Turpin, F.R., Sacchi, S., Dulong, J., Shi, T., Rivet, J.-M., Sweedler, J.V. et al. 2012. Glial D-serine gates NMDA receptors at excitatory synapses in prefrontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 22: 595-606.
- Fox, P.T., Raichle, M.E. 1986. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 1140-1144.
- Fox, P.T., Raichle, M.E., Mintun, M.A., Dence, C. 1988. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science (New York, N.Y.)* 241: 462-464.
- Frank, M.G., Baratta, M.V., Sprunger, D.B., Watkins, L.R., Maier, S.F. 2007. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, Behavior, and Immunity* 21: 47-59.
- Gao, Y.-J., Ji, R.-R. 2009. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *The open pain journal* 2: 11-17.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* 327: 656-661.
- Gertig, U., Hanisch, U.-K. 2014. Microglial diversity by responses and responders. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 101.
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., Rouach, N. 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews. Neuroscience* 11: 87-99.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F. et al. 2010. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330: 841-845.
- Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S., Kandel, E.R. 1986. The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322: 419-422.
- Gottlieb, M., Matute, C. 1997. Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17: 290-300.
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M.H., Clohisey, S., Baillie, J.K., Stevens, M.P., Freeman, T.C. et al. 2016. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature Neuroscience* 19: 504-516.
- Graeber, M.B., Streit, W.J. 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119: 89-105.

- Grathwohl, S.A., Kälin, R.E., Bolmont, T., Prokop, S., Winkelmann, G., Kaeser, S.A., Odenthal, J. et al. 2009. Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nature Neuroscience* 12: 1361-1363.
- Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Greene, L.A. 1986. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science (New York, N.Y.)* 234: 80-83.
- Griffin, R., Nally, R., Nolan, Y., McCartney, Y., Linden, J., Lynch, M.A. 2006. The age-related attenuation in long-term potentiation is associated with microglial activation. *Journal of Neurochemistry* 99: 1263-1272.
- Grimm, R., Schicknick, H., Riede, I., Gundelfinger, E.D., Herdegen, T., Zuschratter, W., Tischmeyer, W. 1997. Suppression of c-fos induction in rat brain impairs retention of a brightness discrimination reaction. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 3: 402-413.
- Grinberg, Y.Y., Milton, J.G., Kraig, R.P. 2011. Spreading depression sends microglia on Lévy flights. *PLoS One* 6: e19294.
- Gundersen, V., Storm-Mathisen, J., Bergersen, L.H. 2015. Neuroglial Transmission. *Physiological Reviews* 95: 695-726.
- Gurden, H., Uchida, N., Mainen, Z.F. 2006. Sensory-evoked intrinsic optical signals in the olfactory bulb are coupled to glutamate release and uptake. *Neuron* 52: 335-345.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C., Kater, S.B. 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19: 520-528.
- Guzowski, J.F. 2002. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12: 86-104.
- Guzowski, J.F., Timlin, J.A., Roysam, B., McNaughton, B.L., Worley, P.F., Barnes, C.A. 2005. Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Current Opinion in Neurobiology* 15: 599-606.
- Haber, M., Zhou, L., Murai, K.K. 2006. Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26: 8881-8891.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 13: 54-63.
- Halassa, M.M., Haydon, P.G. 2010. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annual Review of Physiology* 72: 335-355.
- Hammond, R.S., Tull, L.E., Stackman, R.W. 2004. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 82: 26-34.
- Han, H., Peng, Y., Dong, Z. 2015. d-Serine rescues the deficits of hippocampal long-term potentiation and learning and memory induced by sodium fluoroacetate. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 133: 51-56.

- Hanisch, U.-K. 2013. Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 65.
- Hanisch, U.-K., Kettenmann, H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience* 10: 1387-1394.
- Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J. et al. 1998. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 10896-10901.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N., Harada, K., Oka, T., Takahashi, K. 1992. The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS letters* 296: 33-36.
- Hashimoto, K. 2008. Microglial activation in schizophrenia and minocycline treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32: 1758-1759; author reply 1760.
- Hatori, K., Nagai, A., Heisel, R., Ryu, J.K., Kim, S.U. 2002. Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *Journal of Neuroscience Research* 69: 418-426.
- Haustein, M.D., Kracun, S., Lu, X.-H., Shih, T., Jackson-Weaver, O., Tong, X., Xu, J. et al. 2014. Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 82: 413-429.
- Hayashi, Y., Ishibashi, H., Hashimoto, K., Nakanishi, H. 2006. Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *Glia* 53: 660-668.
- Haydon, P.G., Nedergaard, M. 2015. How do astrocytes participate in neural plasticity? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a020438.
- Haynes, S.E., Höllopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.-B., Julius, D. 2006. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience* 9: 1512-1519.
- Hefendehl, J.K., Neher, J.J., Sühs, R.B., Kohsaka, S., Skodras, A., Jucker, M. 2014. Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell* 13: 60-69.
- Heisler, J.M., O'Connor, J.C. 2015. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent neurotoxic kynurenine metabolism mediates inflammation-induced deficit in recognition memory. *Brain, behavior, and immunity* 50: 115-124.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., Rusakov, D.A. 2010. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463: 232-236.
- Heppner, F.L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hövelmeyer, N., Waisman, A. et al. 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nature Medicine* 11: 146-152.
- Herard, A.-S., Dubois, A., Escartin, C., Tanaka, K., Delzescaux, T., Hantraye, P., Bonvento, G. 2005. Decreased metabolic response to visual stimulation in the superior colliculus of mice lacking the glial glutamate transporter GLT-1. *The European Journal of Neuroscience* 22: 1807-1811.

- Herculano-Houzel, S. 2014. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62: 1377-1391.
- Hertz, L. 1965. Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal--neuroglial--neuronal impulse transmission system. *Nature* 206: 1091-1094.
- Hertz, L., Zielke, H.R. 2004. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends in Neurosciences* 27: 735-743.
- von Herten, L.S.J., Giese, K.P. 2005. Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25: 1935-1942.
- Hess, U.S., Lynch, G., Gall, C.M. 1995. Regional patterns of c-fos mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. *The Journal of Neuroscience* 15: 7796-7809.
- Hinwood, M., Morandini, J., Day, T.A., Walker, F.R. 2012. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 22: 1442-1454.
- Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S., Kohsaka, S. 2005. Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *Journal of Neuroscience Research* 81: 357-362.
- Hjorth-Simonsen, A. 1973. Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis. *The Journal of Comparative Neurology* 147: 145-161.
- Hof, P.R., de Vellis, J., Nimchinsky, E.A., Kidd, G., Claudio, L., Trapp, B.D. 2008. Capítulo 3: Cellular Components of Nervous Tissue. En Squire, L.R., Berg, D., Bloom, F.E., du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N.C. *Fundamental Neuroscience (3ª ed.)*, pp.41-58. Academic Press.
- Houades, V., Rouach, N., Ezan, P., Kirchhoff, F., Koulakoff, A., Giaume, C. 2006. Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biology* 2: 3-14.
- Hua, J.Y., Smith, S.J. 2004. Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nature Neuroscience* 7: 327-332.
- Huang, W., Zhu, P.J., Zhang, S., Zhou, H., Stoica, L., Galiano, M., Krnjević, K. et al. 2013. mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nature Neuroscience* 16: 441-448.
- Huberman, A.D., Feller, M.B., Chapman, B. 2008. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annual Review of Neuroscience* 31: 479-509.
- Hughes, P.M., Botham, M.S., Frentzel, S., Mir, A., Perry, V.H. 2002. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia* 37: 314-327.
- Hutchins, J.B., Naftel, J.P., Ard, M.D. 2003. Capítulo 2: Biología celular de las neuronas y la glía. En Haines, D.E. *Principios de neurociencia (2ª ed.)*, pp.15-36. Elsevier Science.
- Hydén, H., Lange, P.W. 1970. S100 brain protein: correlation with behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 67: 1959-1966.

- Imai, Y., Ibata, I., Ito, D., Ohsawa, K., Kohsaka, S. 1996. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224: 855-862.
- Imai, Y., Kohsaka, S. 2002. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of *Iba1*. *Glia* 40: 164-174.
- Inda, M.C., Delgado-García, J.M., Carrión, A.M. 2005. Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25: 2070-2080.
- Inoue, R., Hashimoto, K., Harai, T., Mori, H. 2008. NMDA- and beta-amyloid1-42-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28: 14486-14491.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., Kohsaka, S. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. *Molecular Brain Research* 57: 1-9.
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., Fukuuchi, Y. 2001. Enhanced Expression of *Iba1*, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. *Stroke* 32: 1208-1215.
- Ito, H.T., Smith, S.E.P., Hsiao, E., Patterson, P.H. 2010. Maternal immune activation alters nonspatial information processing in the hippocampus of the adult offspring. *Brain, Behavior, and Immunity* 24: 930-941.
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M.J., Kaufman, E., Sokoloff, L. 2003. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4879-4884.
- Jahn, H.M., Scheller, A., Kirchhoff, F. 2015. Genetic control of astrocyte function in neural circuits. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 310.
- Jiang, Y., Liu, Y., Zhu, C., Ma, X., Ma, L., Zhou, L., Huang, Q. et al. 2015. Minocycline enhances hippocampal memory, neuroplasticity and synapse-associated proteins in aged C57 BL/6 mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 121: 20-29.
- Jinno, S., Fleischer, F., Eckel, S., Schmidt, V., Kosaka, T. 2007. Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 55: 1334-1347.
- Johnson, J.W., Ascher, P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325: 529-531.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., Littman, D.R. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and Cellular Biology* 20: 4106-4114.
- Kaczmarek, L. 1993. Molecular biology of vertebrate learning: Is c-fos a new beginning? *Journal of Neuroscience Research* 34: 377-381.

- Kaindl, A.M., Degos, V., Peineau, S., Gouadon, E., Chhor, V., Loron, G., Le Charpentier, T. et al. 2012. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Annals of Neurology* 72: 536-549.
- Kandel, E.R. 2001. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* 294: 1030-1038.
- Kandel, E.R., Dudai, Y., Mayford, M.R. 2014. The molecular and systems biology of memory. *Cell* 157: 163-186.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., Nedergaard, M. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience* 1: 683-692.
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., Nedergaard, M. 2008. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28: 4702-4711.
- Kang, N., Peng, H., Yu, Y., Stanton, P.K., Guilarde, T.R., Kang, J. 2013. Astrocytes release D-serine by a large vesicle. *Neuroscience* 240: 243-257.
- Kartvelishvily, E., Shleper, M., Balan, L., Dumin, E., Wolosker, H. 2006. Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 14151-14162.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., Verkhratsky, A. 2011. Physiology of microglia. *Physiological Reviews* 91: 461-553.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A. 2013. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* 77: 10-18.
- Khakh, B.S., Sofroniew, M.V. 2015. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience* 18: 942-952.
- Khalaf-Nazzal, R., Francis, F. 2013. Hippocampal development – Old and new findings. *Neuroscience* 248: 225-242.
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P. et al. 2013. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature Neuroscience* 16: 273-280.
- Kimelberg, H.K., Goderie, S.K., Higman, S., Pang, S., Waniewski, R.A. 1990. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 10: 1583-1591.
- Kinnavane, L., Amin, E., Olarte-Sánchez, C.M., Aggleton, J.P. 2016. Detecting and discriminating novel objects: The impact of perirhinal cortex disconnection on hippocampal activity patterns. *Hippocampus*.
- Kloppenburg, M., Brinkman, B.M., de Rooij-Dijk, H.H., Miltenburg, A.M., Daha, M.R., Breedveld, F.C., Dijkmans, B.A., Verweij, C. 1996. The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 934-940.
- Kloppenburg, M., Verweij, C.L., Miltenburg, A.M., Verhoeven, A.J., Daha, M.R., Dijkmans, B.A., Breedveld, F.C. 1995. The influence of tetracyclines on T cell activation. *Clinical and Experimental Immunology* 102: 635-641.

- Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A. et al. 2013. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death & Disease* 4: e525.
- Kofman, O., van Embden, S., Alpert, C., Fuchs, I. 1993. Central and peripheral minocycline suppresses motor activity in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 44: 397-402.
- Kohman, R.A., Bhattacharya, T.K., Kilby, C., Bucko, P., Rhodes, J.S. 2013. Effects of minocycline on spatial learning, hippocampal neurogenesis and microglia in aged and adult mice. *Behavioural Brain Research* 242: 17-24.
- Korte, M., Schmitz, D. 2016. Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond. *Physiological Reviews* 96: 647-693.
- Labrie, V., Clapcote, S.J., Roder, J.C. 2009. Mutant mice with reduced NMDA-NR1 glycine affinity or lack of D-amino acid oxidase function exhibit altered anxiety-like behaviors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 91: 610-620.
- Labrie, V., Fukumura, R., Rastogi, A., Fick, L.J., Wang, W., Boutros, P.C., Kennedy, J.L. et al. 2009. Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model. *Human Molecular Genetics* 18: 3227-3243.
- Labrie, V., Roder, J.C. 2010. The involvement of the NMDA receptor D-serine/glycine site in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34: 351-372.
- Larsen, B.R., Assentoft, M., Cotrina, M.L., Hua, S.Z., Nedergaard, M., Kaila, K., Voipio, J., MacAulay, N. 2014. Contributions of the Na⁺/K⁺-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K⁺ clearance and volume responses. *Glia* 62: 608-622.
- Lauro, C., Cipriani, R., Catalano, M., Trettel, F., Chece, G., Brusadin, V., Antonilli, L. et al. 2010. Adenosine A1 receptors and microglial cells mediate CX3CL1-induced protection of hippocampal neurons against Glu-induced death. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35: 1550-1559.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., Gordon, S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39: 151-170.
- Lebon, V., Petersen, K.F., Cline, G.W., Shen, J., Mason, G.F., Dufour, S., Behar, K.L. et al. 2002. Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22: 1523-1531.
- Lee, J.L.C. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience* 11: 1264-1266.
- Lee, J.L.C. 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4: 168.

- Lee, J.L.C., Everitt, B.J., Thomas, K.L. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science (New York, N.Y.)* 304: 839-843.
- Lee, J.L.C., Hynds, R.E. 2013. Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 23: 233-244.
- Lee, S.M., Yune, T.Y., Kim, S.J., Kim, Y.C., Oh, Y.J., Markelonis, G.J., Oh, T.H. 2004. Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF-alpha expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. *Journal of Neurochemistry* 91: 568-578.
- Lee, S.M., Yune, T.Y., Kim, S.J., Park, D.W., Lee, Y.K., Kim, Y.C., Oh, Y.J. et al. 2003. Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurotrauma* 20: 1017-1027.
- Lewis, D.A., Hashimoto, T. 2007. Deciphering the disease process of schizophrenia: the contribution of cortical GABA neurons. *International Review of Neurobiology* 78: 109-131.
- Li, Y., Du, X.-F., Liu, C.-S., Wen, Z.-L., Du, J.-L. 2012. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental Cell* 23: 1189-1202.
- Liang, J., Takeuchi, H., Jin, S., Noda, M., Li, H., Doi, Y., Kawanokuchi, J. et al. 2010. Glutamate induces neurotrophic factor production from microglia via protein kinase C pathway. *Brain Research* 1322: 8-23.
- Liang, S.-L., Carlson, G.C., Coulter, D.A. 2006. Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26: 8537-8548.
- Liaury, K., Miyaoka, T., Tsumori, T., Furuya, M., Hashioka, S., Wake, R., Tsuchie, K. et al. 2014. Minocycline improves recognition memory and attenuates microglial activation in Gunn rat: a possible hyperbilirubinemia-induced animal model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 50: 184-190.
- Lichtman, J.W., Colman, H. 2000. Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25: 269-278.
- Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L. et al. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541: 481-487.
- Lomo, T. 1966. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in dentate area of hippocampal formation. *Acta Physiologica Scandinavica*. 68, 277.
- de Lima, M.N., Luft, T., Roesler, R., Schröder, N. 2006. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neuroscience Letters* 405: 142-146.
- de Lima, M.N., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., Schröder, N. 2005. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research* 156: 139-143.

- Lima, R.H., Rossato, J.I., Furini, C.R., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I., Cammarota, M. 2009. Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 91: 466-472.
- Lisman, J., Yasuda, R., Raghavachari, S. 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews. Neuroscience* 13: 169-182.
- Liu, G.J., Nagarajah, R., Banati, R.B., Bennett, M.R. 2009. Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. *The European Journal of Neuroscience* 29: 1108-1118.
- Liu, Q., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J., Nedergaard, M. 2004. Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3172-3177.
- Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., D'Andrea, I., Lauro, C., Limatola, C. 2011. CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 5: 22.
- Maggi, L., Trettel, F., Scianni, M., Bertollini, C., Eusebi, F., Fredholm, B.B., Limatola, C. 2009. LTP impairment by fractalkine/CX3CL1 in mouse hippocampus is mediated through the activity of adenosine receptor type 3 (A3R). *Journal of Neuroimmunology* 215: 36-42.
- Magistretti, P.J. 2006. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *The Journal of Experimental Biology* 209: 2304-2311.
- Magistretti, P.J. 2009. Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *The American Journal of Clinical Nutrition* 90: 875S-880S.
- Magistretti, P.J., Chatton, J.-Y. 2005. Relationship between L-glutamate-regulated intracellular Na⁺ dynamics and ATP hydrolysis in astrocytes. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 112: 77-85.
- Malarkey, E.B., Ni, Y., Parpura, V. 2008. Ca²⁺ entry through TRPC1 channels contributes to intracellular Ca²⁺ dynamics and consequent glutamate release from rat astrocytes. *Glia* 56: 821-835.
- Malenka, R.C., Bear, M.F. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5-21.
- Maroun, M., Akirav, I. 2009. Differential involvement of dopamine D1 receptor and MEK signaling pathway in the ventromedial prefrontal cortex in consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 16: 243-247.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual Review of Neuroscience* 23: 649-711.
- Martineau, M., Shi, T., Puyal, J., Knolhoff, A.M., Dulong, J., Gasnier, B., Klingauf, J. et al. 2013. Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33: 3413-3423.
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D.R., Giladi, A., Aguilar, S.V., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H. et al. 2016. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* 353: aad8670.

- Matsui, T., Sekiguchi, M., Hashimoto, A., Tomita, U., Nishikawa, T., Wada, K. 1995. Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *Journal of Neurochemistry* 65: 454-458.
- Mayer, M.L., Vyklicky, L., Clements, J. 1989. Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* 338: 425-427.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B. 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261-263.
- McGaugh, J.L. 2000. Memory--a Century of Consolidation. *Science* 287: 248-251.
- McKenzie, S., Eichenbaum, H. 2011. Consolidation and Reconsolidation: Two Lives of Memories? *Neuron* 71: 224-233.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M. et al. 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO journal* 15: 5647-5658.
- Milekic, M.H., Alberini, C.M. 2002. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36: 521-525.
- Milior, G., Lecours, C., Samson, L., Bisht, K., Poggini, S., Pagani, F., Deflorio, C. et al. 2016. Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain, Behavior, and Immunity* 55: 114-125.
- Miller, R.H., Raff, M.C. 1984. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 4: 585-592.
- Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R. 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20: 445-468.
- Misanin, J.R., Miller, R.R., Lewis, D.J. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science (New York, N.Y.)* 160: 554-555.
- Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluessener, H.J., Meyermann, R. 2001. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathologica* 101: 249-255.
- Moncada, D., Viola, H. 2006. Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus: a molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity? *Neurobiology of Learning and Memory* 86: 9-18.
- Monji, A., Kato, T., Kanba, S. 2009. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 63: 257-265.
- Montana, V., Malarkey, E.B., Verderio, C., Matteoli, M., Parpura, V. 2006. Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia* 54: 700-715.
- Montana, V., Ni, Y., Sunjara, V., Hua, X., Parpura, V. 2004. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24: 2633-2642.
- Moraga-Amaro, R., Jerez-Baraona, J.M., Simon, F., Stehberg, J. 2014. Role of astrocytes in memory and psychiatric disorders. *Journal of Physiology, Paris* 108: 240-251.

- Morgado, I. 2005. [The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances]. *Revista De Neurologia* 40: 289-297.
- Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., Curran, T. 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science (New York, N.Y.)* 237: 192-197.
- Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., Everall, I.P. 2010. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biological Psychiatry* 68: 368-376.
- Mori, I., Imai, Y., Kohsaka, S., Kimura, Y. 2000. Upregulated Expression of Iba1 Molecules in the Central Nervous System of Mice in Response to Neurovirulent Influenza A Virus Infection. *Microbiology and Immunology* 44: 729-735.
- Morita, Y., Ujike, H., Tanaka, Y., Otani, K., Kishimoto, M., Morio, A., Kotaka, T. et al. 2007. A genetic variant of the serine racemase gene is associated with schizophrenia. *Biological Psychiatry* 61: 1200-1203.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319: 774-776.
- Morris, R.G.M. 2013. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology* 74: 32-40.
- Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., Snyder, S.H. 2000. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4926-4931.
- Mothet, J.-P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., Baux, G. 2005. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 5606-5611.
- Mothet, J.P., Rouaud, E., Sinet, P.-M., Potier, B., Jouvenceau, A., Dutar, P., Videau, C. et al. 2006. A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5: 267-274.
- Mouton, P.R., Long, J.M., Lei, D.-L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M.E., Ingram, D.K. 2002. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Research* 956: 30-35.
- Mulkey, R.M., Malenka, R.C. 1992. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9: 967-975.
- Müller, D.J., Zai, C.C., Shinkai, T., Strauss, J., Kennedy, J.L. 2011. Association between the DAOA/G72 gene and bipolar disorder and meta-analyses in bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disorders* 13: 198-207.
- Müller, G.E., Pilzecker, A. 1900. *Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss*. JA Barth.
- Murugan, M., Sivakumar, V., Lu, J., Ling, E.-A., Kaur, C. 2011. Expression of N-methyl D-aspartate receptor subunits in amoeboid microglia mediates production of

- nitric oxide via NF- κ B signaling pathway and oligodendrocyte cell death in hypoxic postnatal rats. *Glia* 59: 521-539.
- Nader, K., Hardt, O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews. Neuroscience* 10: 224-234.
- Nader, K., Schafe, G.E., LeDoux, J.E. 2000a. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406: 722-726.
- Nader, K., Schafe, G.E., LeDoux, J.E. 2000b. The labile nature of consolidation theory. *Nature Reviews. Neuroscience* 1: 216-219.
- Nagata, Y., Yamamoto, K., Shimojo, T., Konno, R., Yasumura, Y., Akino, T. 1992. The presence of free D-alanine, D-proline and D-serine in mice. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1115: 208-211.
- Nagelhus, E.A., Ottersen, O.P. 2013. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiological Reviews* 93: 1543-1562.
- Navarrete, M., Araque, A. 2010. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68: 113-126.
- Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín, E.D., Araque, A. 2012. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS biology* 10: e1001259.
- Nessler, S., Dodel, R., Bittner, A., Reuss, S., Du, Y., Hemmer, B., Sommer, N. 2002. Effect of minocycline in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of Neurology* 52: 689-690.
- Newman, L.A., Korol, D.L., Gold, P.E. 2011. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One* 6: e28427.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)* 308: 1314-1318.
- Nishikawa, T. 2011. Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879: 3169-3183.
- Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S., Itohara, S. 2002. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 4037-4042.
- Njie, E.G., Boelen, E., Stassen, F.R., Steinbusch, H.W.M., Borchelt, D.R., Streit, W.J. 2012. Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiology of Aging* 33: 195.e1-12.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-465.
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., Nedergaard, M. 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 814: 23-45.

- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q. et al. 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29: 3276-3287.
- Ogoshi, F., Yin, H.Z., Kuppumbatti, Y., Song, B., Amindari, S., Weiss, J.H. 2005. Tumor necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) induces rapid insertion of Ca²⁺-permeable alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)/kainate (CA-A/K) channels in a subset of hippocampal pyramidal neurons. *Experimental Neurology* 193: 384-393.
- Ohgidani, M., Kato, T.A., Sagata, N., Hayakawa, K., Shimokawa, N., Sato-Kasai, M., Kanba, S. 2016. TNF- α from hippocampal microglia induces working memory deficits by acute stress in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 55: 17-24.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y., Kohsaka, S. 2000. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113: 3073-3084.
- Okuda, S., Roozendaal, B., McGaugh, J.L. 2004. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 853-858.
- Oliet, S.H., Piet, R., Poulain, D.A. 2001. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science (New York, N.Y.)* 292: 923-926.
- Oliet, S.H., Mothet, J.-P. 2009. Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* 158: 275-283.
- Oliveira, J.F., Sardinha, V.M., Guerra-Gomes, S., Araque, A., Sousa, N. 2015. Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends in Neurosciences* 38: 535-549.
- Omran, A., Ashhab, M.U., Gan, N., Kong, H., Peng, J., Yin, F. 2013. Effects of MRP8, LPS, and lenalidomide on the expressions of TNF- α , brain-enriched, and inflammation-related microRNAs in the primary astrocyte culture. *TheScientificWorldJournal* 2013: 208309.
- Orr, A.G., Orr, A.L., Li, X.-J., Gross, R.E., Traynelis, S.F. 2009. Adenosine A_{2A} receptor mediates microglial process retraction. *Nature Neuroscience* 12: 872-878.
- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.-P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., Oliet, S.H.R. 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125: 775-784.
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.-C., Robitaille, R. 2011. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146: 785-798.
- Panizzutti, R., Rausch, M., Zurbrugg, S., Baumann, D., Beckmann, N., Rudin, M. 2005. The pharmacological stimulation of NMDA receptors via co-agonist site: an fMRI study in the rat brain. *Neuroscience Letters* 380: 111-115.
- Pannasch, U., Rouach, N. 2013. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends in Neurosciences* 36: 405-417.

- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M. et al. 2011. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 333: 1456-1458.
- Papouin, T., Dunphy, J., Tolman, M., Foley, J.C., Haydon, P.G. 2017. Astrocytic control of synaptic function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 372: .
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L. et al. 2012. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150: 633-646.
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates III, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L. et al. 2013. Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155: 1596-1609.
- Parpura, V., Zorec, R. 2010. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews* 63: 83-92.
- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., Bessis, A. 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E197-205.
- Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H. et al. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science (New York, N.Y.)* 310: 113-116.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., Carmignoto, G. 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17: 7817-7830.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (2° Ed)*. Academic Press.
- Pedreira, M.E., Maldonado, H. 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38: 863-869.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., Magistretti, P.J. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55: 1251-1262.
- Penfield, W., Milner, B. 1958. Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry* 79: 475-497.
- Perea, G., Araque, A. 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science (New York, N.Y.)* 317: 1083-1086.
- Perea, G., Araque, A. 2005. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25: 2192-2203.
- Pernot, P., Maucler, C., Tholance, Y., Vasylieva, N., Debilly, G., Pollegioni, L., Cespuglio, R., Marinesco, S. 2012. d-Serine diffusion through the blood-brain barrier: effect on d-serine compartmentalization and storage. *Neurochemistry International* 60: 837-845.

- Piet, R., Vargová, L., Syková, E., Poulain, D.A., Oliet, S.H.R. 2004. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2151-2155.
- Pocock, J.M., Kettenmann, H. 2007. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences* 30: 527-535.
- Popovic, N., Schubart, A., Goetz, B.D., Zhang, S.-C., Lington, C., Duncan, I.D. 2002. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Annals of Neurology* 51: 215-223.
- Porras, O.H., Loaiza, A., Barros, L.F. 2004. Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24: 9669-9673.
- Porter, J.T., McCarthy, K.D. 1996. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16: 5073-5081.
- Potier, B., Turpin, F.R., Sinet, P.-M., Rouaud, E., Mothet, J.-P., Videau, C., Epelbaum, J. et al. 2010. Contribution of the d-Serine-Dependent Pathway to the Cellular Mechanisms Underlying Cognitive Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2: 1.
- Power, C., Henry, S., Del Bigio, M.R., Larsen, P.H., Corbett, D., Imai, Y., Yong, V.W., Peeling, J. 2003. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Annals of Neurology* 53: 731-742.
- Pruzanski, W., Greenwald, R.A., Street, I.P., Laliberte, F., Stefanski, E., Vadas, P. 1992. Inhibition of enzymatic activity of phospholipases A2 by minocycline and doxycycline. *Biochemical Pharmacology* 44: 1165-1170.
- Przybylski, J., Sara, S.J. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural Brain Research* 84: 241-246.
- Puma, C., Bizot, J.C. 1998. Intraseptal infusions of a low dose of AP5, a NMDA receptor antagonist, improves memory in an object recognition task in rats. *Neuroscience Letters* 248: 183-186.
- Rabacchi, S., Bailly, Y., Delhaye-Bouchaud, N., Mariani, J. 1992. Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science (New York, N.Y.)* 256: 1823-1825.
- Radonjic, V., Malobabic, S., Radonjic, V., Puskas, L., Stijak, L., Aksic, M., Filipovic, B. 2014. Hippocampus: Why is it studied so frequently? *Vojnosanitetski preglad* 71: 195-201.
- Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., Trettel, F., Bertollini, C., Maggi, L., Gross, C., Charo, I.F. et al. 2006. Chemokine fractalkine/CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26: 10488-10498.
- Raivich, G. 2005. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends in Neurosciences* 28: 571-573.
- Rajewska-Rager, A., Pawlaczyk, M. 2016. The role of S100B protein as a potential marker in affective disorders. *Psychiatria Polska* 50: 849-857.

- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., Tsien, J.Z. 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience* 3: 238-244.
- Ranganath, C., Ritchey, M. 2012. Two cortical systems for memory-guided behaviour. *Nature Reviews. Neuroscience* 13: 713-726.
- Rebola, N., Srikumar, B.N., Mulle, C. 2010. Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *The Journal of Physiology* 588: 93-99.
- Reeves, A.M.B., Shigetomi, E., Khakh, B.S. 2011. Bulk loading of calcium indicator dyes to study astrocyte physiology: key limitations and improvements using morphological maps. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31: 9353-9358.
- Reshef, R., Kreisel, T., Beroukhim Kay, D., Yirmiya, R. 2014. Microglia and their CX3CR1 signaling are involved in hippocampal- but not olfactory bulb-related memory and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity* 41: 239-250.
- Río-Hortega, P. 1919a. El "tercer elemento" de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos). *Boletín de la Sociedad Española de Biología* VIII, 69-109.
- Río-Hortega, P. 1919b. El "tercer elemento" de los centros nerviosos. III. Naturaleza probable de la microglía. *Boletín de la Sociedad Española de Biología* VIII, 109-115.
- Río-Hortega, P. 1919c. El "tercer elemento de los centros nerviosos". IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Boletín de la Sociedad Española de Biología* VIII, 155-166.
- Robertson, H.A. 1992. Immediate-early genes, neuronal plasticity, and memory. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 70: 729-737.
- Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J. et al. 2011. CX3CR1 Deficiency Leads to Impairment of Hippocampal Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience* 31: 16241-16250.
- Rohan Walker, F., Yirmiya, R. 2016. Microglia, physiology and behavior: A brief commentary. *Brain, Behavior, and Immunity* 55: 1-5.
- Romero-Granados, R., Fontán-Lozano, A., Delgado-García, J.M., Carrión, A.M. 2010. From learning to forgetting: behavioral, circuitry, and molecular properties define the different functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus* 20: 584-595.
- Rosa, R.M., Flores, D.G., Appelt, H.R., Braga, A.L., Henriques, J.A.P., Roesler, R. 2003. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neuroscience Letters* 341: 217-220.
- Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R.M., Myskiw, J.C., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. 2007. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 14: 36-46.

- Rossi, D., Martorana, F., Brambilla, L. 2011. Implications of gliotransmission for the pharmacotherapy of CNS disorders. *CNS drugs* 25: 641-658.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., Giaume, C. 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science (New York, N.Y.)* 322: 1551-1555.
- Ruiz, R., Cano, R., Casañas, J.J., Gaffield, M.A., Betz, W.J., Tabares, L. 2011. Active Zones and the Readily Releasable Pool of Synaptic Vesicles at the Neuromuscular Junction of the Mouse. *The Journal of Neuroscience* 31: 2000-2008.
- Rusak, B., Robertson, H.A., Wisden, W., Hunt, S.P. 1990. Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science (New York, N.Y.)* 248: 1237-1240.
- Rusakov, D.A., Bard, L., Stewart, M.G., Henneberger, C. 2014. Diversity of astroglial functions alludes to subcellular specialisation. *Trends in Neurosciences* 37: 228-242.
- Salter, M.W., Beggs, S. 2014. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158: 15-24.
- Santello, M., Cali, C., Bezzi, P. 2012. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 970: 307-331.
- Sara, S.J. 2000. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 7: 73-84.
- Sasaki, T., Ishikawa, T., Abe, R., Nakayama, R., Asada, A., Matsuki, N., Ikegaya, Y. 2014. Astrocyte calcium signalling orchestrates neuronal synchronization in organotypic hippocampal slices. *The Journal of Physiology* 592: 2771-2783.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M. et al. 2012. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74: 691-705.
- Schell, M.J., Brady, R.O., Molliver, M.E., Snyder, S.H. 1997. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17: 1604-1615.
- Schell, M.J., Molliver, M.E., Snyder, S.H. 1995. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 3948-3952.
- Schitine, C., Nogaroli, L., Costa, M.R., Hedin-Pereira, C. 2015. Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 76.
- Schneider, A.M., Sherman, W. 1968. Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science (New York, N.Y.)* 159: 219-221.
- Schousboe, A. 2000. Pharmacological and functional characterization of astrocytic GABA transport: a short review. *Neurochemical Research* 25: 1241-1244.
- Schröder, N., O'Dell, S.J., Marshall, J.F. 2003. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse (New York, N.Y.)* 49: 89-96.

- Schummers, J., Yu, H., Sur, M. 2008. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science (New York, N.Y.)* 320: 1638-1643.
- Schwartz, M., Butovsky, O., Brück, W., Hanisch, U.-K. 2006. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends in Neurosciences* 29: 68-74.
- Scianni, M., Antonilli, L., Chece, G., Cristalli, G., Di Castro, M.A., Limatola, C., Maggi, L. 2013. Fractalkine (CX3CL1) enhances hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) function via D-serine and adenosine receptor type A2 (A2AR) activity. *Journal of Neuroinflammation* 10: 108.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., Singh, H. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science (New York, N.Y.)* 265: 1573-1577.
- Scoville, W.B., Milner, B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 20: 11-21.
- Seabrook, T.J., Jiang, L., Maier, M., Lemere, C.A. 2006. Minocycline affects microglia activation, A β deposition, and behavior in APP-tg mice. *Glia* 53: 776-782.
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.-C., Robitaille, R. 2006. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26: 5370-5382.
- Shelton, M.K., McCarthy, K.D. 2000. Hippocampal astrocytes exhibit Ca²⁺-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *Journal of Neurochemistry* 74: 555-563.
- Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R.T., O'Dell, T.J., Khakh, B.S. 2013. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33: 10143-10153.
- Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P., Khakh, B.S. 2011. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nature Neuroscience* 15: 70-80.
- Shinozaki, Y., Nomura, M., Iwatsuki, K., Moriyama, Y., Gachet, C., Koizumi, S. 2014. Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Scientific Reports* 4: 4329.
- Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R. et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693-699.
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J.P., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., Maletic-Savatic, M. 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7: 483-495.
- Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A.C., McEwen, B.S., Bulloch, K. 2007. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* 55: 412-424.

- Sigurdsson, T., Doyère, V., Cain, C.K., LeDoux, J.E. 2007. Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* 52: 215-227.
- Sin, W.C., Haas, K., Ruthazer, E.S., Cline, H.T. 2002. Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature* 419: 475-480.
- Sofroniew, M.V. 2015. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews. Neuroscience* 16: 249-263.
- Sorg, O., Magistretti, P.J. 1991. Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Research* 563: 227-233.
- Soulet, D., Rivest, S. 2008. Microglia. *Current biology: CB* 18: R506-508.
- Squire, L.R. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review* 99: 195-231.
- Squire, L.R., Stark, C.E.L., Clark, R.E. 2004. The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience* 27: 279-306.
- Stackman Jr., R.W., Cohen, S.J., Lora, J.C., Rios, L.M. 2016. Temporary inactivation reveals that the CA1 region of the mouse dorsal hippocampus plays an equivalent role in the retrieval of long-term object memory and spatial memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 133: 118-128.
- Steinman, M.Q., Gao, V., Alberini, C.M. 2016. The Role of Lactate-Mediated Metabolic Coupling between Astrocytes and Neurons in Long-Term Memory Formation. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 10: .
- Stellwagen, D., Malenka, R.C. 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440: 1054-1059.
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D. et al. 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131: 1164-1178.
- Stirling, D.P., Khodarahmi, K., Liu, J., McPhail, L.T., McBride, C.B., Steeves, J.D., Ramer, M.S., Tetzlaff, W. 2004. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24: 2182-2190.
- Stirling, D.P., Koochesfahani, K.M., Steeves, J.D., Tetzlaff, W. 2005. Minocycline as a Neuroprotective Agent. *The Neuroscientist* 11: 308-322.
- Stobart, J.L.L., Lu, L., Anderson, H.D.I., Mori, H., Anderson, C.M. 2013. Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 3149-3154.
- Streit, W.J., Sammons, N.W., Kuhns, A.J., Sparks, D.L. 2004. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45: 208-212.

- Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., Conti, B. 2007. Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience* 146: 1388-1399.
- Sugama, S., Takenouchi, T., Sekiyama, K., Kitani, H., Hashimoto, M. 2011. Immunological responses of astroglia in the rat brain under acute stress: interleukin 1 beta co-localized in astroglia. *Neuroscience* 192: 429-437.
- Sultan, S., Gebara, E.G., Moullec, K., Toni, N. 2013. D-serine increases adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience* 7: 155.
- Suzuki, A., Stern, S.A., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., Alberini, C.M. 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144: 810-823.
- Suzuki, H., Sugimura, Y., Iwama, S., Suzuki, H., Nobuaki, O., Nagasaki, H., Arima, H. et al. 2010. Minocycline prevents osmotic demyelination syndrome by inhibiting the activation of microglia. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 21: 2090-2098.
- Suzuki, W.A., Amaral, D.G. 1994. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. *The Journal of Comparative Neurology* 350: 497-533.
- Swanson, R.A., Graham, S.H. 1994. Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Research* 664: 94-100.
- Szatkowski, M., Barbour, B., Attwell, D. 1990. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348: 443-446.
- Tadi, M., Allaman, I., Lengacher, S., Grenningloh, G., Magistretti, P.J. 2015. Learning-Induced Gene Expression in the Hippocampus Reveals a Role of Neuron - Astrocyte Metabolic Coupling in Long Term Memory. *PLoS One* 10: e0141568.
- Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K., Hirase, H. 2011. Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31: 18155-18165.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z. 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63-69.
- Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B., Alberini, C.M. 2001. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nature Neuroscience* 4: 813-818.
- Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wright, G.D. 2010. The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 419-31.
- Thompson, M.L., Jimenez-Andrade, J.M., Chartier, S., Tsai, J., Burton, E.A., Habets, G., Lin, P.S. et al. 2015. Targeting cells of the myeloid lineage attenuates pain and disease progression in a prostate model of bone cancer. *Pain* 156: 1692-1702.
- Tikka, T., Fiebich, B.L., Goldsteins, G., Keinänen, R., Koistinaho, J. 2001. Minocycline, a Tetracycline Derivative, Is Neuroprotective against Excitotoxicity by Inhibiting Activation and Proliferation of Microglia. *The Journal of Neuroscience* 21: 2580-2588.

- Tikka, T., Koistinaho, J.E. 2001. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166: 7527-7533.
- Tischmeyer, W., Grimm, R. 1999. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 55: 564-574.
- Todd, K.J., Darabid, H., Robitaille, R. 2010. Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30: 11870-11882.
- Torres, A., Wang, F., Xu, Q., Fujita, T., Dobrowolski, R., Willecke, K., Takano, T., Nedergaard, M. 2012. Extracellular Ca²⁺ acts as a mediator of communication from neurons to glia. *Science Signaling* 5: ra8.
- Torres, L., Danver, J., Ji, K., Miyauchi, J.T., Chen, D., Anderson, M.E., West, B.L. et al. 2016. Dynamic microglial modulation of spatial learning and social behavior. *Brain, Behavior, and Immunity* 55: 6-16.
- Tremblay, M.-È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., Sierra, A. 2015. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in Neuroanatomy* 9: .
- Tremblay, M.-È., Lowery, R.L., Majewska, A.K. 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS biology* 8: e1000527.
- Tremblay, M.-È., Zettel, M.L., Ison, J.R., Allen, P.D., Majewska, A.K. 2012. Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia* 60: 541-558.
- Turrigiano, G.G. 2008. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135: 422-435.
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., Yamashita, T. 2013. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience* 16: 543-551.
- Urban, N.N., Henze, D.A., Lewis, D.A., Barrionuevo, G. 1996. Properties of LTP induction in the CA3 region of the primate hippocampus. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 3: 86-95.
- Van Horn, M.R., Sild, M., Ruthazer, E.S. 2013. D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 39.
- Vann, S.D., Brown, M.W., Erichsen, J.T., Aggleton, J.P. 2000. Fos Imaging Reveals Differential Patterns of Hippocampal and Parahippocampal Subfield Activation in Rats in Response to Different Spatial Memory Tests. *The Journal of Neuroscience* 20: 2711-2718.
- Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., Pardo, C.A. 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology* 57: 67-81.
- Vargas-Lopes, C., Madeira, C., Kahn, S.A., Albino do Couto, I., Bado, P., Houzel, J.C., De Miranda, J. et al. 2011. Protein kinase C activity regulates D-serine availability in the brain. *Journal of Neurochemistry* 116: 281-290.

- Vega-Avelaira, D., Ballesteros, J.J., López-García, J.A. 2013. Inflammation-induced hyperalgesia and spinal microglia reactivity in neonatal rats. *European Journal of Pain (London, England)* 17: 1180-1188.
- Ventura, R., Harris, K.M. 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19: 6897-6906.
- Verderio, C., Cagnoli, C., Bergami, M., Francolini, M., Schenk, U., Colombo, A., Riganti, L. et al. 2012. TI-VAMP/VAMP7 is the SNARE of secretory lysosomes contributing to ATP secretion from astrocytes. *Biology of the Cell* 104: 213-228.
- Verkhratsky, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., Sofroniew, M. 2014. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions* 42: 1291-1301.
- Verkhratsky, A., Steinhäuser, C. 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Research. Brain Research Reviews* 32: 380-412.
- Viola, H., Furman, M., Izquierdo, L.A., Alonso, M., Barros, D.M., de Souza, M.M., Izquierdo, I., Medina, J.H. 2000. Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20: RC112.
- Voutsinos-Porche, B., Bonvento, G., Tanaka, K., Steiner, P., Welker, E., Chatton, J.-Y., Magistretti, P.J., Pellerin, L. 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37: 275-286.
- Waisman, A., Ginhoux, F., Greter, M., Bruttger, J. 2015. Homeostasis of Microglia in the Adult Brain: Review of Novel Microglia Depletion Systems. *Trends in Immunology* 36: 625-636.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., Nabekura, J. 2009. Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *The Journal of Neuroscience* 29: 3974-3980.
- Wan, H., Aggleton, J.P., Brown, M.W. 1999. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19: 1142-1148.
- Wang, A.L., Yu, A.C.H., Lau, L.T., Lee, C., Wu, L.M., Zhu, X., Tso, M.O.M. 2005. Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. *Neurochemistry International* 47: 152-158.
- Wang, F., Smith, N.A., Xu, Q., Fujita, T., Baba, A., Matsuda, T., Takano, T. et al. 2012. Astrocytes modulate neural network activity by Ca²⁺-dependent uptake of extracellular K⁺. *Science Signaling* 5: ra26.
- Wang, H.-L., Liu, H., Xue, Z.-G., Liao, Q.-W., Fang, H. 2016. Minocycline attenuates post-operative cognitive impairment in aged mice by inhibiting microglia activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20: 1632-1639.
- Wang, H.-T., Huang, F.-L., Hu, Z.-L., Zhang, W.-J., Qiao, X.-Q., Huang, Y.-Q., Dai, R.-P. et al. 2017. Early-Life Social Isolation-Induced Depressive-Like Behavior in

- Rats Results in Microglial Activation and Neuronal Histone Methylation that Are Mitigated by Minocycline. *Neurotoxicity Research*.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.-F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J. et al. 2006. Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nature Neuroscience* 9: 816-823.
- Wanner, I.B., Anderson, M.A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., Sofroniew, M.V. 2013. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33: 12870-12886.
- Warr, O., Takahashi, M., Attwell, D. 1999. Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *The Journal of Physiology* 514 (Pt 3): 783-793.
- Welser-Alves, J.V., Milner, R. 2013. Microglia are the major source of TNF- α and TGF- β in postnatal glial cultures; regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochemistry international* 63: .
- Wendt, S., Wogram, E., Korvers, L., Kettenmann, H. 2016. Experimental Cortical Spreading Depression Induces NMDA Receptor Dependent Potassium Currents in Microglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36: 6165-6174.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., Pekny, M. 2006. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 17513-17518.
- Williams, S.M., Diaz, C.M., Macnab, L.T., Sullivan, R.K.P., Pow, D.V. 2006. Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain reveals novel anatomical compartmentalizations in glia and neurons. *Glia* 53: 401-411.
- Williamson, L.L., Sholar, P.W., Mistry, R.S., Smith, S.H., Bilbo, S.D. 2011. Microglia and memory: modulation by early-life infection. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31: 15511-15521.
- Winograd, M., Viola, H. 2004. Detection of novelty, but not memory of spatial habituation, is associated with an increase in phosphorylated cAMP response element-binding protein levels in the hippocampus. *Hippocampus* 14: 117-123.
- Witcher, M.R., Kirov, S.A., Harris, K.M. 2007. Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia* 55: 13-23.
- Wolf, Y., Yona, S., Kim, K.-W., Jung, S. 2013. Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 26.
- Wolosker, H., Balu, D.T., Coyle, J.T. 2016. The Rise and Fall of the d-Serine-Mediated Gliotransmission Hypothesis. *Trends in Neurosciences* 39: 712-721.
- Wolosker, H., Blackshaw, S., Snyder, S.H. 1999. Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate

- neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13409-13414.
- Wolosker, H., Sheth, K.N., Takahashi, M., Mothet, J.-P., Brady, R.O., Ferris, C.D., Snyder, S.H. 1999. Purification of serine racemase: Biosynthesis of the neuromodulator d-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 721-725.
- Wong, W.T. 2013. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 22.
- Worley, P.F., Bhat, R.V., Baraban, J.M., Erickson, C.A., McNaughton, B.L., Barnes, C.A. 1993. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 13: 4776-4786.
- Wu, D.C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D.-K. et al. 2002. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22: 1763-1771.
- Wu, S.-Z., Bodles, A.M., Porter, M.M., Griffin, W.S.T., Basile, A.S., Barger, S.W. 2004. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. *Journal of Neuroinflammation* 1: 2.
- Yamasaki, M., Yamada, K., Furuya, S., Mitoma, J., Hirabayashi, Y., Watanabe, M. 2001. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21: 7691-7704.
- Yang, J.H., Wada, A., Yoshida, K., Miyoshi, Y., Sayano, T., Esaki, K., Kinoshita, M.O. et al. 2010. Brain-specific Phgdh deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 41380-41390.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., Duan, S. 2003. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15194-15199.
- Yasuda, E., Ma, N., Semba, R. 2001. Immunohistochemical evidences for localization and production of D-serine in some neurons in the rat brain. *Neuroscience Letters* 299: 162-164.
- Ye, Z.-C., Wyeth, M.S., Baltan-Tekkok, S., Ransom, B.R. 2003. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23: 3588-3596.
- Yong, V.W., Power, C., Forsyth, P., Edwards, D.R. 2001. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience* 2: 502-511.
- Yong, V.W., Wells, J., Giuliani, F., Casha, S., Power, C., Metz, L.M. 2004. The promise of minocycline in neurology. *The Lancet Neurology* 3: 744-751.

- Yoon, S.-Y., Patel, D., Dougherty, P.M. 2012. Minocycline blocks lipopolysaccharide induced hyperalgesia by suppression of microglia but not astrocytes. *Neuroscience* 221: 214-224.
- Yrjänheikki, J., Keinänen, R., Pellikka, M., Hökfelt, T., Koistinaho, J. 1998. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 15769-15774.
- Yrjänheikki, J., Tikka, T., Keinänen, R., Goldsteins, G., Chan, P.H., Koistinaho, J. 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13496-13500.
- Yu, Z., Fukushima, H., Ono, C., Sakai, M., Kasahara, Y., Kikuchi, Y., Gunawansa, N. et al. 2017. Microglial production of TNF-alpha is a key element of sustained fear memory. *Brain, Behavior, and Immunity* 59: 313-321.
- Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L. et al. 2014. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience* 17: 400-406.
- Zhang, B., Zou, J., Han, L., Rensing, N., Wong, M. 2016. Microglial activation during epileptogenesis in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Epilepsia* 57: 1317-1325.
- Zhang, F., Vadakkan, K.I., Kim, S.S., Wu, L.-J., Shang, Y., Zhuo, M. 2008. Selective activation of microglia in spinal cord but not higher cortical regions following nerve injury in adult mouse. *Molecular Pain* 4: 15.
- Zhang, J., Wang, H., Ye, C., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z., Wu, C. et al. 2003. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40: 971-982.
- Zhang, Q., Pangrsic, T., Kreft, M., Krzan, M., Li, N., Sul, J.-Y., Halassa, M. et al. 2004. Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 12724-12733.
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W. et al. 2007. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nature Cell Biology* 9: 945-953.
- Zhang, Z., Gong, N., Wang, W., Xu, L., Xu, T.-L. 2008. Bell-shaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 18: 2391-2401.