



Nuevas aproximaciones terapéuticas mediante las vías de señalización del ácido lisofosfatídico: regulación farmacológica y trasplante neuronal

Memoria de Tesis presentada por D^a CRISTINA ROSELL DEL VALLE

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga

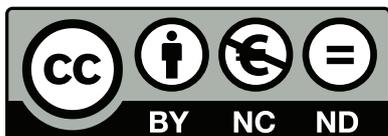
Málaga 2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Cristina Rosell del Valle

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

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

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

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

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

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



D. LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ, Doctor en Psicología y Catedrático de Psicobiología del Depto. de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Málaga, y D. GUILLERMO ESTIVILL TORRÚS, Doctor en Biología, Investigador de la Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Neurociencias de los Hospitales Universitarios Regional de Málaga y Virgen de la Victoria, y Director del Grupo de Investigación en Neuropsicofarmacología de Transmisores Lipídicos, como directores

CERTIFICAN:

Que, D^a. CRISTINA ROSELL DEL VALLE ha realizado en el Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Facultad de Psicología y en la Unidad de Microscopía y Laboratorio de Investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga en el Hospital Universitario Regional de Málaga, bajo nuestra dirección, el presente trabajo de investigación titulado: *“Nuevas aproximaciones terapéuticas mediante las vías de señalización del ácido lisofosfatídico: regulación farmacológica y trasplante neuronal”*, y que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, considerando que reúne el rigor científico y las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga a 23 de Enero de 2014.

Fdo.- Luis Javier Santín Núñez

Fdo.- Guillermo Estivill Torrús

Yo, Cristina Rosell del Valle, DECLARO que soy autora del presente trabajo de investigación y que lo he realizado en el Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Facultad de Psicología de la Universidad de Málaga y en la Unidad de Microscopía y Laboratorio de Investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga en el Hospital Universitario Regional de Málaga, bajo la dirección del Dr. Luis Javier Santín Núñez y el Dr. Guillermo Estivill Torrús.

Igualmente DECLARO que parte del mismo se ha realizado en el Laboratorio del Grupo de Investigación en Terapia Celular en Neuropatologías del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), en Sevilla, bajo la supervisión de su director, el Dr. Manuel Álvarez Dolado.

Y para que así conste, firmo la presente declaración en Málaga, a 23 de Enero de 2014.

Fdo. Cristina Rosell del Valle

Este trabajo **se ha realizado al amparo del grupo de investigación del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo; Junta de Andalucía), código CTS643, Neuropsicofarmacología de los Transmisores Lipídicos. Génesis neural y conducta, dirigido por el Dr. Guillermo Estivill Torrús,** y establecido en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) con la participación conjunta del Hospital Universitario Regional de Málaga y la Universidad de Málaga, así como en colaboración con el **Grupo de Investigación en Terapia Celular en Neuropatologías, dirigido por el Dr. Manuel Álvarez Dolado,** del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), en Sevilla.

El trabajo se ha realizado en las siguientes **instalaciones y Estructuras Comunes de Apoyo la Investigación (ECAI):**

- Laboratorio de Investigación y Unidad y ECAI de Microscopía, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Regional de Málaga, Universidad de Málaga.
- Depto. de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Regional de Málaga, Universidad de Málaga.
- ECAI Centro de Experimentación Animal, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Regional de Málaga, Universidad de Málaga.
- Laboratorio del Departamento de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER).

El trabajo ha sido financiado por las siguientes instituciones:

Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo. Junta de Andalucía.

- Incentivos para la formación de personal docente e investigador predoctoral en las Universidades Públicas de Andalucía. 2009. Secretaría General de Universidades, Investigación y Tecnología. Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (expediente

asociado actualmente a la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo).
Beneficiaria: Cristina Rosell del Valle.

Ministerio de Economía y Competitividad

- Título del proyecto: Modulación de vulnerabilidad cerebral ante estrés: papel del receptor LPA1 en el efecto del enriquecimiento ambiental sobre las alteraciones cognitivas y emocionales inducidas por estrés (Exp.: FIS PI10/ 02514). Acción Estratégica en Salud. Proyectos de Investigación en Salud. 2010. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación (expediente asociado actualmente al Ministerio de Economía y Competitividad). Ayuda cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Investigador principal: Guillermo Estivill Torrús.

- Título del proyecto: Alteraciones cognitivas y emocionales inducidas por estrés: papel del ácido lisofosfatídico (Expediente: FIS PI07/ 0629). Ayudas del Programa de Promoción de la Investigación Biomédica y en Ciencias de la Salud. 2007. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (expediente asociado actualmente al Ministerio de Economía y Competitividad). Ayuda cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Investigador principal: Guillermo Estivill Torrús.

- Título del proyecto: Beneficios del enriquecimiento ambiental en las alteraciones cognitivas y emocionales inducidas por estrés crónico: papel del receptor LPA1 y de la neurogénesis hipocampal (Expediente: PSI2010-16160). Proyectos de Investigación Fundamental no orientada. 2010. Ministerio de Ciencia e Innovación (expediente asociado actualmente al Ministerio de Economía y Competitividad). Investigador principal: Luis Javier Santín Núñez.

Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

- Título del proyecto: Alteraciones cognitivas y emocionales inducidas por estrés: papel del ácido lisofosfatídico (Expediente: SEJ2007-61187). Ayudas para la realización de proyectos de investigación en el marco del Plan Nacional de I+D+i 2004-2007. Ministerio de Educación y Ciencia (expediente asociado actualmente al Ministerio de Educación,

Cultura y Deporte). Ayuda cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Investigador principal: Luis Javier Santín Núñez.

- Título del proyecto: Potencial terapéutico del trasplante de precursores GABAérgicos para el tratamiento de la epilepsia (Expediente: SAF09-07746). Ministerio de Educación y Ciencia (expediente asociado actualmente al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte). Ayuda cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Investigador principal: Manuel Álvarez Dolado.

Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo. Junta de Andalucía.

- Incentivos a grupos de investigación no universitarios. Grupo PAIDI del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación, código CTS643, Neuropsicofarmacología de los Transmisores Lipídicos. Génesis neural y conducta. Convocatorias resueltas hasta la fecha: 2010 y 2011.

- Título del proyecto: Efectos del enriquecimiento ambiental en las alteraciones cognitivas y emocionales inducidas por estrés crónico: Papel del receptor LPA1 y de la neurogénesis hipocampal (Expediente: SEJ-4515). Proyectos de Investigación de Excelencia en equipos de investigación de las universidades y organismos de investigación de Andalucía. 2009. Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo (anteriormente, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia). Investigador principal: Luis Santín Núñez.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Hospital Universitario Regional de Málaga



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE IGUALDAD,
SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES



A mi familia

Los lisofosfolípidos son derivados de fosfolípidos de la membrana celular y uno de los más estudiados es el ácido lisofosfatídico (LPA), considerado como un importante regulador de diversas funciones biológicas. Hasta la fecha, se conocen seis receptores de LPA acoplados a proteínas G (LPA₁₋₆), y entre sus funciones destaca la regulación de la plasticidad hipocampal adulta (Dash et ál., 2004; Choi et ál., 2010; Shin et ál., 2012; revisado en Choi y Chun, 2013). Los ratones carentes del receptor LPA₁ presentan déficits en la exploración, la memoria y la regulación emocional (Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010; Blanco et ál., 2012; Castilla-Ortega et ál., 2012; Pedraza et ál., 2013; Castilla-Ortega et ál., 2013) junto con alteraciones funcionales en el hipocampo y en la amígdala (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011; Musazzi et ál., 2011; Castilla-Ortega et ál., 2012; García-Fernandez et ál., 2012; Pedraza et ál., 2013; Castilla-Ortega et ál., 2013).

Actualmente, por la importante participación en el correcto desarrollo del sistema nervioso central así como en numerosas patologías, el potencial clínico de los receptores de LPA está cobrando cada vez mayor interés, gracias a que se dispone de agonistas y antagonistas que pueden modificar la actividad de los receptores (revisado en Choi et ál., 2010). Dentro de este contexto, uno de los objetivos de la Tesis Doctoral fue la modulación farmacológica del receptor LPA₁, principalmente, mediante el uso de las minibombas osmóticas Alzet®, en condiciones in vivo durante 21 días determinando el papel del tratamiento a nivel fisiológico y conductual. En otro sentido, para un buen desarrollo del sistema nervioso central es imprescindible una correcta sintonía entre los sistemas neuronales activadores e inhibidores. Los ratones carentes del receptor LPA₁, presentan pérdida de interneuronas GABAérgicas y un sistema GABAérgico alterado (Cunningham et ál., 2006; Matas-Rico et ál., 2009), además de tener déficits en la liberación de los neurotransmisores GABA y glutamato (Harrison et ál., 2003; Roberts et ál., 2005; Blanco et ál., 2012). El segundo objetivo se centró, por ello, en el trasplante de precursores de interneuronas GABAérgicas derivados de la eminencia ganglionar medial en el hipocampo dorsal de ratones normales y nulos para el receptor LPA₁ durante 31 días, a objeto de profundizar en los mecanismos dependientes del receptor y a su vez, desarrollar alternativas de rescate de fenotipo.

Los resultados presentados en esta tesis avalan los tratamientos farmacológicos y la terapia celular en los modelos experimentales, que demuestran, por una parte, que el ácido lisofosfatídico impulsa la neurogénesis adulta y la maduración de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo así como la regulación emocional, a través de la activación del receptor LPA₁. Por otra parte, demuestran que la ausencia del receptor tiene lugar en un entorno neural que permite la integración de precursores de interneuronas para que, éstas, merced a su modulación GABAérgica potencien y mejoren la funcionalidad hipocampal tras la restauración de la red neuronal local, repercutiendo positivamente sobre la conducta relacionada con la ansiedad. Ambos experimentos, demuestran la validez de los tratamientos farmacológicos y la terapia celular para el estudio de alteraciones neurales dependientes de receptores de amplia distribución en el sistema nervioso.

ÍNDICE

Capítulo I: INTRODUCCIÓN

1. EL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO (LPA)	1
1.1 <i>Primeros hallazgos sobre el LPA</i>	1
1.2 <i>Metabolismo del LPA</i>	4
1.2.1 <u>Biosíntesis extracelular</u>	5
1.2.2 <u>Biosíntesis intracelular</u>	7
1.2.3 <u>Vías de degradación</u>	12
2. RECEPTORES DE LPA	13
2.1 <i>Vías de señalización intracelular asociadas a los receptores de LPA</i>	13
2.2 <i>Tipos de receptores de LPA</i>	17
2.2.1 <u>Receptor LPA₁</u>	17
2.2.2 <u>Receptor LPA₂</u>	18
2.2.3 <u>Receptor LPA₃</u>	19
2.2.4 <u>Receptor LPA₄</u>	22
2.2.5 <u>Receptor LPA₅</u>	22
2.2.6 <u>Receptor LPA₆</u>	23
3. RECEPTOR LPA₁	25
3.1 <i>Implicación del receptor LPA₁ en el sistema nervioso y en la conducta</i>	25
3.2 <i>Moduladores farmacológicos: antagonistas y agonistas de los receptores de LPA</i>	38

Capítulo II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **45**

Capítulo III: MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DEL RECEPTOR LPA₁: IMPLICACIONES CONDUCTUALES Y NEUROGÉNICAS HIPOCAMPALES

1. INTRODUCCIÓN	52
2. MATERIAL Y MÉTODOS	55
2.1 <i>Animales</i>	55
2.2 <i>Tratamiento farmacológico</i>	56
2.2.1 <u>Fármacos</u>	56

2.2.2	<u>Minibomba osmótica Alzet®</u>	57
2.2.3	<u>Diseño experimental</u>	60
2.2.3.1	Administración de BrdU	63
2.3	<i>Pruebas de comportamiento</i>	64
2.3.1	<u>Campo abierto</u>	64
2.3.2	<u>Laberinto en Y</u>	67
2.3.3	<u>Test de natación forzada</u>	69
2.3.4	<u>Análisis estadísticos</u>	70
2.4	<i>Técnicas inmunohistoquímica: neurogénesis, actividad neuronal y muerte celular</i>	71
2.4.1	<u>Fijación, corte y seriado del tejido</u>	71
2.4.2	<u>Inmunohistoquímica</u>	73
2.4.3	<u>Detección de apoptosis</u>	79
2.4.4	<u>Cuantificación</u>	82
2.4.5	<u>Análisis estadístico</u>	82
2.5	<i>Electrotransferencia e inmunotinción (Western Blot)</i>	83
2.5.1	<u>Preparación del tejido y cuantificación de proteínas</u>	83
2.5.2	<u>Electroforesis en gel de poliacrilamida</u>	85
2.5.3	<u>Electrotransferencia</u>	87
2.5.4	<u>Inmunotinción</u>	87
2.5.5	<u>Análisis estadístico</u>	89
3	RESULTADOS	91
3.1	<i>Análisis conductual</i>	91
3.1.1	<u>Exploración y ansiedad</u>	91
3.1.2	<u>Memoria de trabajo espacial</u>	95
3.1.3	<u>Comportamiento de afrontamiento pasivo y activo</u>	97
3.2	<i>Neurogénesis</i>	99
3.2.1	<u>Proliferación celular y desarrollo de las nuevas neuronas</u>	100
3.3	<i>Apoptosis</i>	105
3.4	<i>Actividad neuronal</i>	107
3.5	<i>Regulación del receptor LPA₁ y de la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII)</i>	110
3.6	<i>Control rutinario de inflamación</i>	114
4.	DISCUSIÓN	115

4.1 <i>Papel del receptor LPA₁ sobre la neurogénesis en el adulto, la muerte celular y la activación neuronal</i>	115
4.2 <i>Papel del receptor LPA₁ sobre la conducta</i>	120
5. CONCLUSIONES	127
Capítulo IV: TRASPLANTE DE PRECURSORES GABAÉRGICOS EN EL HIPOCAMPO EN RATONES CARENTES DEL RECEPTOR LPA₁	

1. INTRODUCCIÓN	133
2. MATERIAL Y MÉTODOS	139
2.1 <i>Animales</i>	139
2.2 <i>Aislamiento celular y trasplante</i>	141
2.3 <i>Diseño experimental</i>	144
2.4 <i>Administración de BrdU</i>	145
2.5 <i>Pruebas de comportamiento</i>	145
2.5.1 <u>Campo abierto</u>	145
2.5.2 <u>Test de natación forzada</u>	147
2.5.3 <u>Laberinto en cruz elevado</u>	147
2.5.4 <u>Test de actividad en rodillo (en inglés, Rotarod)</u>	148
2.6 <i>Análisis estadísticos</i>	149
2.7 <i>Técnicas inmunohistoquímica: Caracterización de los precursores de interneuronas GABAérgicas</i>	150
2.7.1 <u>Fijación, corte y seriado del tejido</u>	150
2.7.2 <u>Inmunofluorescencia</u>	151
2.7.3 <u>Cuantificación</u>	155
2.7.4 <u>Análisis estadístico</u>	156
3 RESULTADOS	157
3.1 <i>Análisis conductual</i>	157
3.1.1 <u>Mejora del trasplante de las células precursores de interneuronas GABAérgicas sobre la respuesta tipo ansiosa</u>	157
3.1.2 <u>Afrontamiento activo y pasivo en el test de natación forzada</u>	166
3.1.3 <u>Las células trasplantadas no afectaron a la actividad motora</u>	169

3.2	<i>Caracterización de los precursores de interneuronas GABAérgicas</i>	170
3.2.1	<u>Supervivencia de las células trasplantadas</u>	170
3.2.2	<u>Subtipos de interneuronas GABAérgicas derivadas de la eminencia ganglionar medial</u>	171
3.3	<i>Proliferación celular</i>	175
4	DISCUSIÓN	177
4.1	<i>Supervivencia celular, diferenciación a interneuronas maduras y proliferación celular</i>	178
4.2	<i>Las células derivadas de la eminencia ganglionar medial mejora las conductas tipo ansiosas</i>	180
4.3	<i>Relevancia clínica</i>	182
5	CONCLUSIONES	185
ANEXOS		
	Anexo I: Protocolos del fijador y de los tampones usados en inmunohistoquímica	189
	Anexo II: Publicación de los resultados	192
	REFERENCIAS	197
	AGRADECIMIENTOS	239

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.	<i>Representación tridimensional y lineal de la estructura química del LPA.</i>	3
Figura 2.	<i>Producción de LPA en el suero y en el plasma sanguíneo.</i>	5
Figura 3.	<i>Producción de LPA en las membranas celulares a partir del ácido fosfatídico.</i>	7
Figura 4.	<i>Vía de producción del LPA a través de la ATX e interacción con el receptor de LPA.</i>	10
Figura 5.	<i>Vías de degradación para el LPA.</i>	12
Figura 6.	<i>Vías de señalización intracelular asociadas a los receptores de LPA₁₋₆.</i>	14
Figura 7.	<i>Esquema representativo de la activación del receptor PPARγ.</i>	17
Figura 8.	<i>Expresión del receptor LPA₁ (zona más oscura) en la zona subventricular del sistema</i>	

<i>nervioso central de embrión de ratón (E14).</i>	26
Figura 9. <i>Alteraciones morfológicas y defectos neuronales en los ratones nulos para el receptor LPA₁.</i>	31
Figura 10. <i>Estructura química del agonista (LPA) y los antagonistas (Ki16425 y VPC 32183) de los receptores LPA.</i>	41

CAPÍTULO III:

- MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 11. <i>Representación de las partes que componen la minibomba osmótica Alzet®.</i>	58
Figura 12. <i>Representación de los pasos a seguir para montar las minibombas osmóticas Alzet®.</i>	60
Figura 13. <i>Esquema del protocolo experimental del tratamiento farmacológico crónico.</i>	61
Figura 14. <i>Implantación de la minibomba osmótica Alzet®.</i>	62
Figura 15. <i>Imágenes representativas de los pasos del protocolo de cirugía con el aparato estereotáxico.</i>	63
Figura 16. <i>Imagen del campo abierto utilizado para el estudio de la conducta de tipo ansiosa.</i>	66
Figura 17. <i>Imagen de la prueba del laberinto en Y.</i>	68
Figura 18. <i>Ejemplo para el cálculo del porcentaje de alternancia en el laberinto en Y.</i>	68
Figura 19. <i>Imágenes representativas de las conductas analizadas en el test de natación forzada.</i>	70
Figura 20. <i>Corte y seriación.</i>	72
Figura 21. <i>Apoptosis.</i>	71
Figura 22. <i>Representación de la placa de 96 pocillos utilizada para la determinación de la concentración de proteínas de las muestras a través del ensayo de Bradford.</i>	85

- RESULTADOS

Figura 23. <i>Conductas analizadas durante la prueba de campo abierto.</i>	94
Figura 24. <i>Número de alternancias realizadas en el laberinto en Y.</i>	97
Figura 25. <i>Conductas registradas en el test de natación forzada.</i>	99
Figura 26. <i>Proliferación celular en la ZSG y en la ZSV.</i>	102
Figura 27. <i>Desarrollo de las nuevas neuronas en la ZSG.</i>	104
Figura 28. <i>Apoptosis en la zona del giro dentado.</i>	106
Figura 29. <i>Actividad neuronal en la región del hipocampo: zona superior de GD, zona inferior del GD, CA3 y CA1.</i>	109

Figura 30. <i>Semicuantificación del receptor LPA₁ en extracto de los hipocampos derechos.</i>	112
Figura 31. <i>Semicuantificación de proteína αCaMKII en su forma inactiva y activa (fosforilada) en extracto de los hipocampos derechos.</i>	113

CAPÍTULO IV:

- INTRODUCCIÓN

Figura 32. <i>Resumen de los orígenes de las interneuronas corticales y las rutas migratorias tangenciales que siguen durante el desarrollo de la neocorteza.</i>	135
--	-----

- MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 33. <i>Posición de los precursores neuronales derivadas de la EGM en el cerebro huésped.</i>	143
Figura 34. <i>Diseño experimental.</i>	144
Figura 35. <i>Imagen del campo abierto utilizado para el estudio de la conducta de tipo ansiosa.</i>	146
Figura 36. <i>Imagen del laberinto en cruz elevado.</i>	148
Figura 37. <i>Imagen del test de Rotarod.</i>	149

- RESULTADOS

Figura 38. <i>Conductas relacionadas con la ansiedad y con las exploraciones analizadas en el campo abierto.</i>	161
Figura 39. <i>Conducta relacionada con la ansiedad analizada en el laberinto en cruz elevado.</i>	166
Figura 40. <i>Conducta pasiva, primera latencia de inmovilidad y conductas activas del test de natación forzada.</i>	168
Figura 41. <i>Rotarod.</i>	169
Figura 42. <i>Porcentaje de supervivencia de las células GFP⁺ trasplantadas el hipocampo dorsal.</i>	171
Figura 43. <i>Caracterización de los precursores GABAérgicos.</i>	172
Figura 44. <i>Imágenes de los diferentes marcadores neuronales en el giro dentado del grupo WT-EGM y NULL-EGM.</i>	174
Figura 45. <i>Proliferación celular en el ZSG del hipocampo dorsal en los cuatro grupos experimentales.</i>	175

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. <i>Relación filogenética de los receptores LPA en función de su grado de homología.</i>	15
Tabla 2. <i>Expresión de los receptores LPA₁₋₅ en ratón (R) y humano (H).</i>	16
Tabla 3. <i>Resumen de las funciones identificadas de los receptores de LPA en enfermedades relacionadas con el SNC y periférico.</i>	22
Tabla 4. <i>Resumen de los déficits neuroquímicos, fisiológicos y conductuales presente en los ratones nulos para el receptor LPA₁.</i>	37
Tabla 5. <i>Lista de algunos agonistas y antagonistas actuales para los receptores del LPA.</i>	40

CAPÍTULO III:

- **MATERIAL Y MÉTODOS**

Tabla 6. <i>Resumen de los fármacos utilizados en las minibombas osmóticas Alzet® durante 21 días de tratamiento.</i>	59
Tabla 7. <i>Resumen del significado de las conductas registradas en la prueba de campo abierto.</i>	66
Tabla 8. <i>Resumen de los marcadores utilizados.</i>	75
Tabla 9. <i>Resumen de anticuerpos primarios.</i>	76
Tabla 10. <i>Resumen anticuerpos secundarios.</i>	77
Tabla 11. <i>Resumen de anticuerpos primarios.</i>	88
Tabla 12. <i>Resumen de anticuerpos secundarios.</i>	88

- **RESULTADOS**

Tabla 13. <i>Variables analizadas durante la prueba del laberinto en Y.</i>	96
--	----

CAPÍTULO IV:

- **MATERIAL Y MÉTODOS**

Tabla 14. <i>Anticuerpos primarios.</i>	154
Tabla 15. <i>Anticuerpos secundarios.</i>	154

- **RESULTADOS**

Tabla 16. <i>Porcentaje de las células GFP⁺ que expresaron marcadores de interneuronas GABAérgicas en el hipocampo dorsal de los grupos WT-EGM y NULL-EGM.</i>	172
--	-----

ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina (5-hidroxitriptamina)	ICV: Intracerebroventricular
ADN: Ácido desoxirribonucleico	Iba1: Molécula 1 adaptadora de unión a calcio ionizado (del inglés, <i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>)
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico	IP₃: Inositol-3-trifosfato
ATX: Autotaxina	Ki: Constante de inhibición
BSA: Suero albúmina bovina libre de ácidos grasos (del inglés, <i>bovine serum albumin</i>)	LCAT: Lecitincolesterol acetil-transferasa
BrdU: Bromodesoxiuridina; 5-bromo-2'-desoxiuridina	LPA: Ácido lisofosfatídico (del inglés, <i>lysophosphatidic acid</i>)
CA1: Cuerno de Amón 1	LPA_n: Receptor n de ácido lisofosfatídico
CA3: Cuerno de Amón 3	LPA-LPS: LPA-lisofosfolipasa (del inglés, <i>LPA-lysophospholipase</i>)
CaMKII: proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina	LPC: Lisofosfatidilcolina (del inglés, <i>lysophosphatidylcholine acid</i>)
CB: Calbindina	LPS: Lisofosfatidilserina (del inglés, <i>lysophosphatidylserine acid</i>)
CE₅₀: Concentración de eficacia media	LPE: Lisofosfatidiletanolamina (del inglés <i>lysophosphatidylethanolamide acid</i>)
CR: Calretinina	LPP: Lípidos fosfato fosfatasa (del inglés, <i>lipids phosphato phosphatase</i>)
DAB: Tetrahidrocloruro de 3,3'diaminobenzindina	LSD: Diferencia mínimamente significativa de Fisher (del inglés, <i>Least Significant Difference</i>)
DCX: Doblecortina (del inglés, <i>Doublecortin X-linked gene</i>)	MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
DGK: Diacilglicerol cinasa	NPY: Neuropeptido y
E_{max}: Eficacia máxima	PA: Ácido fosfatídico (del inglés, <i>phosphatidic acid</i>)
EDG: Genes de diferenciación celular endotelial (del inglés, <i>endothelial differentiation gene</i>)	PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
EGM: Eminencia Ganglionar Media	PC: Fosfatidilcolina (del inglés, <i>phosphatidylcholine</i>)
Enpp2: Familia nucleótido pirofosfatasa /fosfodiesterasa 2 (del inglés, <i>ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase family member 2</i>)	
GABA: Ácido γ aminobutírico (del inglés, <i>Gamma Aminobutyric Acid</i>)	
GFAP: Proteína glial fibrilar ácida (del inglés, <i>Gliar Fibrillary Acidic Protein</i>)	
GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i>)	

PD-1 α /ATX: Fosfodiesterasa-1 α /autotaxina (del inglés, *phosphodiesterase-1 α /autotaxin*)

PE: Fosfatidiletanolamina (del inglés *phosphatidylethanolamide*)

PG: Fosfoglicerol (del inglés, *phosphoglycerol*)

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

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

PPAR- γ : Receptor- γ de activación de la proliferación de peroxisomas (del inglés, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ)

PS: Fosfatidilserina (del inglés, *phosphatidylserine*)

PLD: Fosfolipasa D (del inglés, *phospholipase D*)

PV: Parvalbúmina

S1P: Esfingosina-1-fosfato (del inglés, *sphingosine 1-phosphate*)

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

SNC: Sistema Nervioso Central

SOM: Somatostatina

TPBS: Tampón Tris-PBS

Tris: Hidroximetil aminometano

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

ZSG: Zona subgranular (del hipocampo)

vzg-1: *ventricular zone gen-1*

ZSV: Zona subventricular (del ventrículo lateral)

ZV: Zona Ventricular

Unidades de medida

cm: Centímetro

h: Hora

kDa: Kilo Dalton

Kg: Kilo gramo

Lux: iluminación, lumen /m².

M: Molar

nM: Nanomolar

ml: mililitro

min: minuto

mm: milímetro

ml: mililitro

μ l: microlitro

s: segundo

Capítulo I:

INTRODUCCIÓN

EL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO (LPA)

1.1 Primeros hallazgos sobre el LPA

El sistema nervioso central (SNC) sigue siendo la estructura biológica que siempre nos deja con más preguntas complicadas por responder y que precisa de un continuo estudio a objeto de conocer su desarrollo y su complejidad funcional y estructural. Desde que Santiago Ramón y Cajal en 1888 propusiera la teoría neuronal, por la que se postulaba que la neurona era una unidad genéticamente individual y que ésta mostraba un impulso nervioso unidireccional, empezamos a querer conocer mejor las funciones, las conexiones entre las diferentes áreas cerebrales y los sistemas de regulación del SNC, entre otros. En este sentido, por ejemplo, los procesos que regulan el desarrollo del SNC para llegar a obtener una correcta funcionalidad cerebral deben ser muy precisos y minuciosos. Desde hace tiempo conocemos que, además de en el desarrollo, la formación de nuevas neuronas tiene lugar en el cerebro adulto de todos los mamíferos, incluido el ser humano (Eriksson et ál., 1998). Estos fenómenos de génesis neuronal adulta han sido descritos y estudiados extensivamente (ver revisión en Gage y Temple, 2013) y tienen lugar en la zona ventricular (ZV), localizada en el neuroepitelio que recubre los ventrículos laterales. Los primeros trabajos describieron en dicha zona las poblaciones de células progenitoras neuronales que se dividían recubriendo la superficie de los ventrículos laterales y dando lugar a los diferentes tipos celulares (Sidman et ál., 1956; Altman y Das, 1965; Boulder Committee, 1970; Altman y Bayer, 1986). Son estos trabajos los que han permitido romper la barrera que consideraba al cerebro adulto como una estructura fija. Altman y Das, (1965) fueron, igualmente, los primeros en identificar la formación de nuevas neuronas en el giro dentado de hipocampo de la rata, demostrando que el proceso de neurogénesis se daba también en la etapa adulta (Altman y Das, 1965).

Los procesos de neurogénesis se encuentran bajo la influencia de factores intrínsecos y extracelulares que afectan a la morfología, división, migración y supervivencia celular (ver revisión en Faigle y Song, 2013). La amplia lista de estos factores reguladores que modulan la neurogénesis ha ido creciendo de manera continuada hasta revelarnos, hace escasamente una década, los ácidos fosfatídicos, y, especialmente, al ácido lisofosfatídico, como moléculas

imprescindibles para la correcta regulación y desarrollo del SNC, siendo el objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral.

El 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfato o ácido lisofosfatídico (LPA, del inglés *lysophosphatidic acid*) es un lisofosfolípido endógeno bioactivo formado por un grupo fosfato y una molécula de glicerol unida a una cola de ácidos grasos de grado de saturación y de longitud variables, con uniones de tipo éster, generalmente (Figura 1). Inicialmente, se le atribuyó la función de ser un precursor en la biosíntesis de diferentes complejos lipídicos, tanto en células procariotas como eucariotas (Pieringer y Hokin, 1962). No fue hasta 1986 cuando el grupo de W.H. Moolenaar, en el Instituto Holandés del Cáncer en Ámsterdam, en un intento por comprobar si las moléculas de ácido fosfatídico (PA, del inglés *phosphatidic acid*) podían servir como ionóforos naturales de calcio (Ca^{2+}), dieron un paso más. Los resultados mostraron que el aumento de la señal de Ca^{2+} inducida por el PA generó un incremento de la producción de inositol-trifosfato (IP3, del inglés *inositol-triphosphate*), seguido de un incremento de la activación del intercambiador de sodio/hidrógeno (Na^+/H^+), la transcripción de proto-oncogenes y la síntesis de ADN. En otras palabras, los PA exógenos actuaron como factores de crecimiento (Moolenaar et ál., 1986). Varios años más tarde el mismo grupo de investigación, analizó diferentes fosfolípidos incluidos los lisofosfolípidos a objeto de conocer sus posibles acciones como factores de crecimiento. Estos ensayos, mostraron que el LPA, en fibroblastos, representaba un estímulo destacable como movilizador de Ca^{2+} , además de poseer una importante capacidad mitogénica (van Corven et ál., 1989; Jalink et ál., 1990), y actuando a través de, al menos, dos proteínas G heteroméricas (van Corven et ál., 1989). En 1996, durante un estudio de neurogénesis en mamíferos, el grupo estadounidense dirigido por Jerold Chun en el Instituto de Investigación Scripps en La Jolla, aisló e identificó el gen del primer receptor funcional del LPA en la zona ventricular cerebral embrionaria, correspondiente a un receptor acoplado a proteína G (GPCRs, del inglés, *G-protein-coupled receptors*), y que denominaron, por la zona de expresión *vzg-1* (del inglés, *ventricular zone gen-1*, conocido posteriormente como *Edg2*; actualmente LPAR1/Lpar1, según atienda a humano o el resto de especies) (Hecht et ál., 1996).

A partir de estos hallazgos, diferentes grupos de investigación empezaron a trabajar para determinar y caracterizar las funciones del LPA en los sistemas biológicos. Algunos de los trabajos se encaminaron a estudiar la relación de este receptor con otros receptores

pertenecientes a la misma familia de genes de diferenciación celular endotelial (EDG, del inglés, *endothelial differentiation gene*), como el *Edg1* cuyo ligando es la esfingosina-1-fosfato (S1P, del inglés, *sphingosine 1-phosphate*) (Lee et ál., 1998; Zondag et ál., 1998). Debido a la similitud de los receptores EDG con otros receptores, como los receptores de cannabinoides, (aproximadamente un 30 % de similitud estructural), y a la convergencia de las rutas de síntesis de los mismos, la identificación de las rutas de señalización de los receptores EDG ha sido complicada. Sin embargo, con el uso posterior de agonistas y antagonistas han permitido ir conociendo cuales son las vías de señalización de cada uno de los miembros de receptores de la familia EDG.

Son muy diversas las funciones que, actualmente, podemos atribuir al LPA, molécula que no deja de ser un pequeño lípido bioactivo endógeno, y que, a pesar de ello, incluyen, entre las principales y de manera notoria, la regulación de la proliferación, la diferenciación, la migración y la supervivencia de las células, funciones que son reguladas por medio de receptores específicos (LPA₁₋₆) ampliamente distribuidos en el organismo en diferentes tejidos y tipos celulares (Fujiwara et ál., 2003; Pilpel y Segal, 2006; Rhee et ál., 2006; Noguchi et ál., 2009; Choi et ál., 2010). De este modo, el LPA interviene en importantes procesos biológicos como en la neurogénesis, la mielinización, la formación de vasos sanguíneos, la reproducción, la inducción del dolor neuropático o en la progresión tumoral, entre otros (Fukushima et ál., 2001; Sengupta et ál., 2004; Tokumura et ál., 2004; Aoki et ál., 2008), siendo, incluso, relevante en los procesos cognitivos como en la consolidación de la memoria espacial a largo plazo (Dash et ál., 2004). Las funciones para cada receptor serán detalladas posteriormente, en esta misma sección.

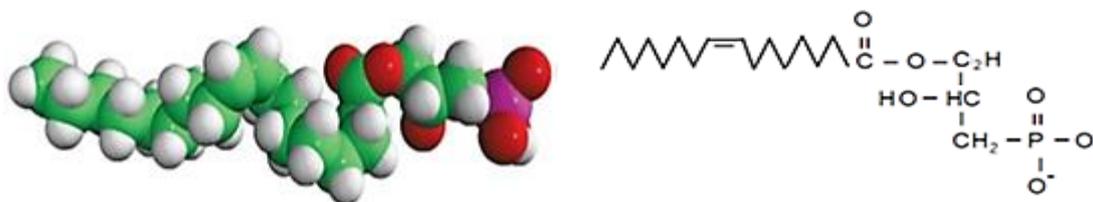


Figura 1. Representación tridimensional y lineal de la estructura química del LPA. Se puede observar el grupo fosfato (PO_4^{3-} , en color rojo las moléculas de oxígeno) anclado, junto al glicerol, a la cadena lipídica (en color verde las moléculas de carbono y en blanco las moléculas de hidrógeno). En la imagen se ha representado la especie de LPA correspondiente al oleil-LPA, LPA C18:1⁹, insaturado, de 18 átomos de carbono en su cadena, enlace doble en posición 9 y configuración *cis* (cis-9-

octadecenoico), denominado como 1-oleoil-2-hidroxi-*sn*-glicerol-3-fosfato o 1-(9Z-octadecanoil)-*sn*-glicerol-3-fosfato.

1.2 Metabolismo del LPA

El LPA se encuentra presente en diferentes fluidos biológicos como suero (Tigyi y Miledi, 1992; Baker et ál., 2000; Aoki et ál., 2002; Sano et ál., 2002), saliva (Sugiura et ál., 2002), fluido seminal (Hama et ál., 2002), fluido folicular (Tokumura et ál., 1999), clara de huevo de gallina (Nakane et ál., 2001) y líquido cefalorraquídeo (Sato et ál., 2005) tanto en animales como en humano. La mayor cantidad de LPA se encuentra en suero y en plasma sanguíneo y por tanto, es la fuente más caracterizada (Tigyi y Miledi, 1992; Baker et ál., 2000; Aoki et ál., 2002), como más adelante se detallará. Los niveles séricos de LPA se pueden encontrar elevados en condiciones fisiopatológicas específicas como ocurre en el cáncer de ovario (Nakane et ál., 2001), la aterosclerosis (Siess et ál., 1999) o en daños en el sistema nervioso (Kusaka et ál., 1998).

En cuanto a su transporte, en los fluidos biológicos el LPA se encuentra asociado a proteínas. La principal proteína ligadora del LPA en suero y en plasma es la albúmina, cuya concentración es abundante en este medio (Hama et ál., 2002). El tipo y la presencia de proteína de transporte unida al LPA también es un factor que puede influir en su actividad biológica. De este modo, se ha demostrado que el LPA en plasma (rico en albúmina) activa los receptores LPA₁₋₂, pero no al receptor LPA₃, mientras que el LPA en el fluido seminal (sin albúmina) activa al receptor LPA₃ y no a los LPA₁₋₂ (Hama et ál., 2002).

Respecto a la biosíntesis del LPA, es producido extracelular e intracelularmente a partir de los fosfolípidos de membrana. Como consecuencia de ello se forman diferentes especies de LPA siendo las más abundantes en plasma, y por orden decreciente, las correspondientes al palmitoil-LPA (16:0), estearoil-LPA (18:0), oleoil-LPA (18:1), linoleoil-LPA (18:2) y araquidonil-LPA (20:4) (Sano et ál., 2002). El 18:1 LPA es la forma más comúnmente utilizada por los grupos de investigación debida, probablemente, a su alta afinidad por los receptores de LPA (Jalink et ál., 1995).

1.2.1 Biosíntesis extracelular

En suero y plasma sanguíneo pueden acontecer dos vías de biosíntesis, una dependiente de la activación de las plaquetas y otra independiente. En ambas vías el punto de partida son los fosfolípidos pero se generan de manera diferente. En el primer caso, cuando las plaquetas están activas por la estimulación de trombinas, liberan fosfolípidos como la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (PC, PE, PS, respectivamente, del inglés, *phosphatidyl-choline, -ethanolamine, -serine*) que, por acción de las fosfolipasas A₁ y A₂ son convertidos en lisofosfolípidos, en este caso, a lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina y lisofosfatidilserina (LPC, LPE y LPS, respectivamente, del inglés, *lysophosphatidyl-choline, -ethalonamide, -serine*). El siguiente paso es convertir estos lisofosfolípidos en LPA siendo la enzima clave la autotaxina (ATX) con actividad lisofosfolipasa D (Aoki, 2004). En el segundo caso, los lisofosfolípidos son producidos a partir de lipoproteínas plasmáticas por la acción de enzimas como la lectin-colesterol acetil-transferasa o similares a la fosfolipasa A₁ (Aoki et ál., 2002; Aoki, 2004; Aoki et ál., 2008, Figura 2). De este modo, cada una de estas vías son responsables de, aproximadamente, la mitad de la producción de LPA presente en el suero (Aoki et ál., 2002).

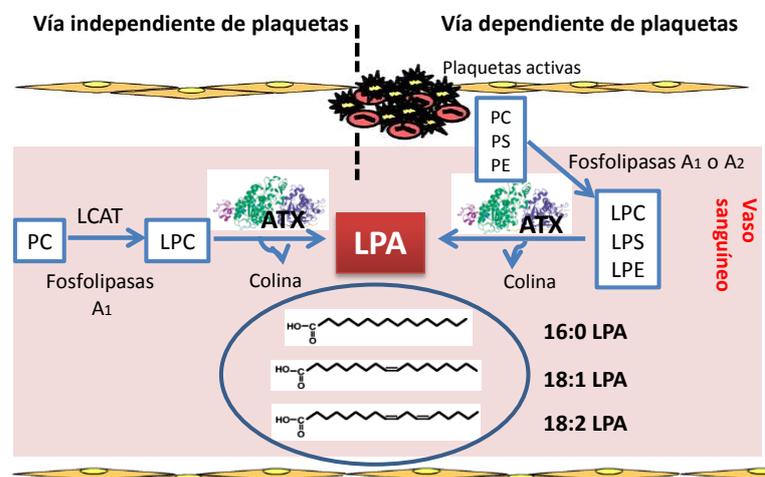


Figura 2. Producción del LPA en el suero y en el plasma sanguíneo. El LPA puede producirse por dos vías, una dependiente de plaquetas las cuales liberan fosfolípidos (PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina y PE: fosfatidiletanolamina) que por acción de las fosfolipasas A₁ y A₂ son transformados en lisofosfolípidos (LPC: lisofosfatidilcolina, LPS: lisofosfatidilserina, LPE: lisofosfatidiletanolamina) sobre los que por último, actúa la autotaxina (ATX). La vía independiente parte de la fosfatidilcolina que es transformada por la acción de la lecitincolesterol acetil-transferasa

(LCAT, del inglés, *lecithin-cholesterol acyltransferase*) o por enzimas similares a la fosfolipasa A₁ a lisofosfatidilcolina que, tras la acción de la ATX se convierte en LPA. Por ambas vías las especies de LPA más abundantes son 16:0, 18:0 y 18:1 LPA. Figura adaptada de Aoki et ál., 2008.

Existe otra ruta de biosíntesis que tiene lugar en las membranas celulares. Este mecanismo ha sido descrito en plaquetas y en células cancerígenas (Fourcade et ál., 1995; Shen et ál., 1998; Aoki et ál., 2008), aunque las enzimas fosfolipasas implicadas fueron identificadas en otros tipos celulares como las neuronas y las células gliales (Woelk et ál., 1981; Nardicchi et ál., 2007). En esta vía, el elemento principal es el PA que se genera en la región citosólica de la célula bien a partir de los fosfolípidos, (por acción de la fosfolipasa D (PLD, del inglés, *phospholipase D*) o bien a partir del diacilglicerol (por acción de la diacilglicerol quinasa). El PA generado se dirige a la región extracelular por un mecanismo de translocación aún no conocido (Aoki, 2004; Aoki et ál., 2008). Una vez en la capa externa de la bicapa lipídica, actúan las fosfolipasas A₁ y A₂ produciendo el LPA (Aoki et ál., 2002; Aoki, 2004; Aoki et ál., 2008, Figura 3). Esta vía genera una menor cantidad de LPA que las anteriores, debido a que el PA es un fosfolípido que se encuentra en menor proporción en los diferentes tipos celulares (aproximadamente un 10 %) (Sano et ál., 2002). Esta ruta extracelular de síntesis es, sin embargo, muy importante ya que genera rápidamente LPA en respuesta a diferentes estímulos. Con todo, esto sugiere que la concentración de LPA en el suero es altamente regulable ya que no sólo se puede inducir su síntesis sino que también se puede inhibir su producción constitutiva actuando sobre sus precursores o sus enzimas de síntesis (Shen et ál., 1998; Eder et ál., 2000).

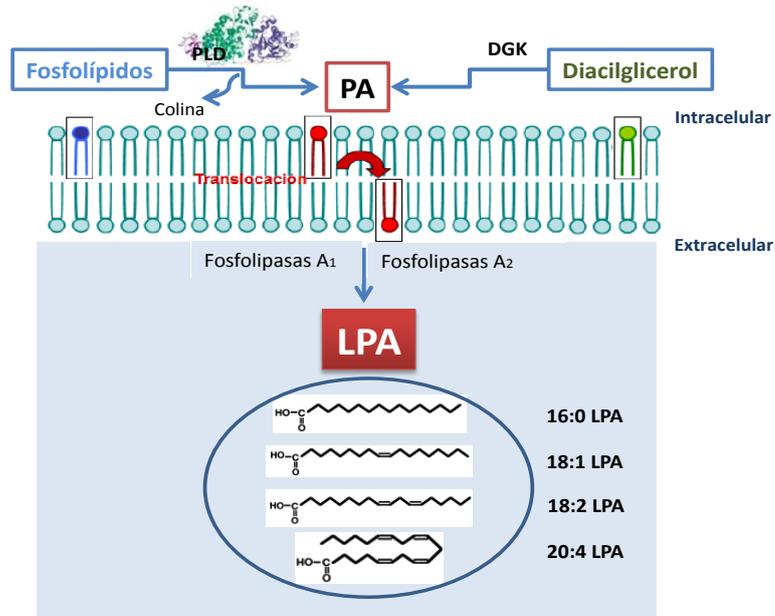


Figura 3. Producción de LPA en las membranas celulares a partir del ácido fosfatídico. A partir de los fosfolípidos o del diacilglicerol, bien sea por la acción de la ATX o bien de la diacilglicerol cinasa (DGK, del inglés, *diacylglycerol kinase*), se obtiene el ácido fosfatídico (PA) que se transloca desde la región citosólica a la zona extracelular donde, posteriormente, las enzimas fosfolipasas A₁ y A₂ lo convertirán a LPA. Modificado de Aoki et ál., 2008.

1.2.2 Biosíntesis intracelular

En muchos tipos celulares el LPA es producido a partir de fosfolípidos y triacilglicerol. Esta síntesis se produce a partir de la acilación del glicerol-3-fosfato y la acil-coenzima A por la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa y a partir de la fosforilización del monoacilglicerol por la enzima monoacilglicerol quinasa (Bektas et ál., 2005). Esta conversión tiene lugar intracelularmente en el retículo endoplasmático o en las mitocondrias. Esta vía tiene lugar en organismos más simples en los cuales la acción del LPA extracelular no ha sido observada. Es más, no hay certeza de que el LPA sea liberado al medio extracelular (Dircks y Sul, 1999), y se piensa que el LPA sintetizado intracelularmente viene a actuar como intermediario para la biosíntesis de otros fosfolípidos, no tanto como mensajero extracelular (Okudaira et ál., 2010).

La enzima clave en estas vías de síntesis, como ya se ha mencionado, es la ATX, con actividad lisofosfolipasa D. La ATX es la enzima mejor estudiada asociada a la señalización mediada por el LPA, siendo su primera función descrita la de actuar como enzima

estimuladora de la motilidad celular en células de melanoma en humanos (Stracke et ál., 1992). Esta enzima pertenece a la familia de la ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2 (*Enpp2*, del inglés, *ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2*) y se trata de una glucoproteína con actividad lisofosfolipasa D que actúa convirtiendo el LPC a LPA liberando una molécula de colina (Tokumura et ál., 2002; Umezu-Goto et ál., 2002; Ferry et ál., 2003, Figura 4). Recientemente, su estructura ha sido analizada por cristalografía de rayos X para obtener su forma tridimensional. Con ello, se puede conocer mejor sus dominios catalíticos y sus sitios de unión al sustrato o inhibidores (Hausmann et ál., 2011; Nishimasu et ál., 2011). La ATX está presente en niveles altos en diferentes fluidos biológicos como en suero, plasma y en el fluido seminal, y se expresa intensamente en el riñón, en el cerebro (sobre todo en los plexos coroideos), y en los órganos linfoides (Nakasaki et ál., 2008; Nakamura et ál., 2009). En condiciones fisiológicas especiales o bien patológicas, su concentración en sangre puede aumentar notablemente, como ocurre en el embarazo (Iwasawa et ál., 2009), la hepatitis C crónica (Watanabe et ál., 2007), el cáncer (Nam et ál., 2000; Nakamura et ál., 2007c), el prurito colestásico (Kramar et ál., 2003), por citar algunos ejemplos.

Existe una directa correlación entre la concentración sérica de LPA y la actividad enzimática de la ATX, de tal manera que, en ausencia de ésta, no se produce LPA (Tanaka et ál., 2006; Tsuda et ál., 2006; Aoki et ál., 2008). La actividad catalítica de la enzima puede inhibirse específicamente por su propio producto, el LPA, o moléculas relacionadas como la S1P, a objeto de regular su propia síntesis (van Meeteren et ál., 2005) o por moduladores específicos como el inhibidor competitivo FTY720 (van Meeteren et ál., 2008), entre otros. Es importante destacar que los valores de la constante de inhibición (K_i) son, para el LPA, 110 nM y para la S1P, 50 nM (van Meeteren y Moolenaar, 2007). Estos valores son aproximadamente 1000 veces más bajos que la constante de Michaelis-Menten (K_m) para el propio sustrato de la ATX, el LPC, indicando, así, que la ATX se une con mayor afinidad al LPA y a la S1P (van Meeteren et ál., 2005). El hecho es de especial relevancia ya que indica que el LPA es capaz de controlar su propia biosíntesis y que ésta, incluso, puede ser modulada por variaciones en los niveles de S1P (van Meeteren y Moolenaar, 2007). La regulación del eje ATX-LPA es bastante importante debido a su participación en procesos que condicionan la viabilidad del individuo, como en el correcto desarrollo vascular y neural (Tanaka et ál., 2006; van Meeteren et ál., 2006; Koike et ál., 2009; Fotopoulou et ál., 2010), en diferentes patologías como en la

progresión tumoral y metástasis (Nam et ál., 2000; Mills y Moolenaar et ál., 2003; Tager et ál., 2008; David et ál., 2010), en los procesos inflamatorios (Kanda et ál., 2008), en enfermedades fibróticas (Pradere et ál., 2007; Tager et ál., 2008) y en el dolor neuropático (Inoue et ál., 2004). Por el alcance del efecto en esta regulación y la implicación en ciertas patologías como el cáncer y el desarrollo vascular, la ATX puede llegar a convertirse una buena diana terapéutica utilizando antagonistas selectivos que inhiban su actividad enzimática (Hausmann et ál., 2011).

En el sistema nervioso se ha detectado una isoforma llamada fosfodiesterasa- α /autotaxina (PD- α /ATX) (Narita et ál., 1994; Kawagoe et ál., 1995; Fuss et ál., 1997). La PD- α /ATX es vital para el desarrollo embrionario y, transcurrido éste, disminuye su expresión (Tanaka et ál., 2006; van Meeteren et ál., 2006; Savaskan et ál., 2007). Se ha detectado expresión de la enzima en la sustancia blanca, los plexos coroideos, las células leptomeningiales, la zona subventricular (Savaskan et ál., 2007) y en el líquido cefalorraquídeo (Sato et ál., 2005). Una de las células implicadas en la secreción de ATX al medio extracelular, de especial interés, son los oligodendrocitos (Kawagoe et ál., 2005; Fuss et ál., 1997), íntimamente ligados al desarrollo de las vainas de mielinas. En este sentido, se ha demostrado la secreción de ATX por los oligodendrocitos en diferenciación durante los estadios iniciales de mielinización, y que dicha ATX estimula procesos de adhesión y conectividad celular por una vía, o domino activo, independiente de su actividad lisofosfolipasa D (Narita et ál., 1994; Fuss et ál., 1997; Cervera et ál., 2002; Jaillard et ál., 2005; Dennis et ál., 2008). Estos estudios coinciden con las observaciones que sugieren un papel importante para el LPA en la mielinización, merced a su expresión en oligodendrocitos durante la mielinización (Weiner et ál., 1998; Handford et ál., 2001; Cervera et ál., 2002) y a los cambios morfológicos en membrana que el LPA genera en dichas células cuando es añadido de manera exógena (Stankoff et ál., 2002; Nogaroli et ál., 2009). Precisamente por su posible participación en la mielinización se ha investigado la expresión de ATX en patologías desmielinizantes, demostrándose su sobreexpresión en pacientes con esclerosis múltiples (Hammack et ál., 2004). La sobreexpresión de ATX también se ha relacionado con la activación de los astrocitos en cerebros lesionados (Savaskan et ál., 2007), y se ha observado, igualmente, en la corteza cerebral de pacientes con demencia senil tipo Alzheimer (Umemura et ál., 2006).

Los ratones nulos para la ATX presentan importantes alteraciones funcionales ya que los embriones no sobreviven debido a los déficits vasculares (Tanaka et ál., 2006; van Meeteren et ál., 2006) y a la malformación del tubo neural (Fotopoulou et ál., 2010). A causa de estas complicaciones, no es fácil examinar las funciones de la enzima en los ratones adultos que carecen de ATX, siendo preciso, por ello, recurrir a ratones knock-out condicionales u otros modelos animales para estudiar mejor el papel de la ATX en las etapas adultas (Yukiura et ál., 2011).

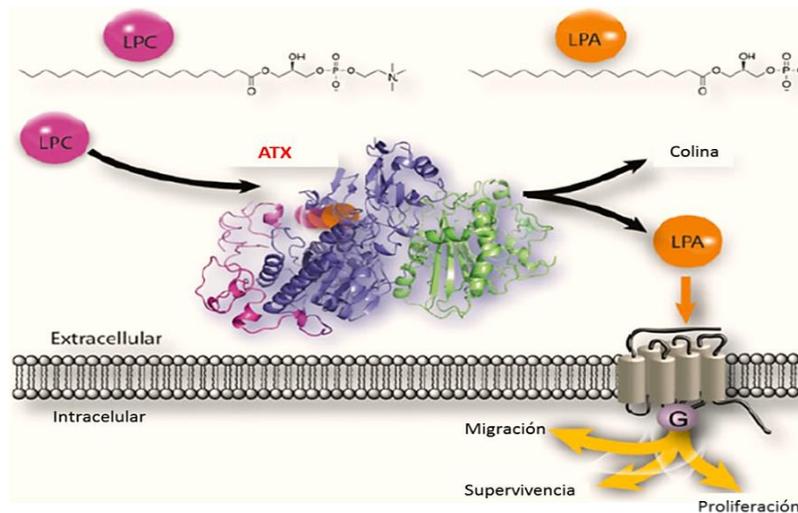


Figura 4. Vía de producción de LPA a través de la ATX e interacción con los receptores de LPA.

La ATX es una enzima extracelular que hidroliza al LPC convirtiéndolo en LPA. El LPA actúa a través de receptores acoplados a proteínas G estimulando la proliferación celular, la migración y la supervivencia. La ATX es una enzima con múltiples dominios representados en la imagen con diferentes colores indicando los dominios catalíticos específico (Houben y Moolenaar, 2011).

Debido al alcance clínico del eje ATX-LPA es importante conocer sus concentraciones en fluidos biológicos como, por ejemplo, en el suero y el plasma sanguíneo o en el líquido cerebroespinal. Este aspecto es de relevancia ya que conocer los valores de ATX y LPA en sujetos sanos podría servir para detectar enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de la enzima y la producción de LPA y, así, poder actuar para tratarlas o prevenirlas. Para ello, algunas técnicas como los ensayos enzimáticos, la cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés, *high-performance liquid chromatography*) están ayudando a resolver esta cuestión. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes para la medición de los niveles de LPA en sangre es la fluctuación

de estos niveles debida a la manipulación y al tratamiento post-extracción de la muestra. Así, tras la incubación del plasma o del suero puede tener lugar un incremento de los niveles de LPA posterior a la extracción, debido, por una parte, a que en la muestra también coexisten la ATX y su sustrato, el LPC, y por otra, por la activación de las plaquetas, fuente de síntesis de LPA (Aoki et ál., 2002; Kishimoto et ál., 2003; Nakamura et ál., 2007a; Nakamura et ál., 2007b, ver Figura 2). Otro de los métodos propuestos para su cuantificación ha sido la detección colorimétrica usando ensayos de ciclación enzimática a partir de muestras de plasma sanguíneo (Yatomi, 2010), que se basa en la amplificación de la sensibilidad del ensayo enzimático. No obstante, esta técnica no puede discriminar entre las diferentes especies de LPA por lo que sería difícil determinar las acciones biológicas de cada una de ellas (Yatomi, 2010). Una técnica que sí permite esta discriminación es la espectrometría de masas junto con la cromatografía líquida de alta eficacia ya que se puede separar las especies de LPA de otros lípidos que estén presentes en el plasma (Murph et ál., 2007; Smyth et ál., 2008).

De entre los estudios realizados, la técnica de ciclación enzimática ha permitido detectar en el plasma en sujetos sanos una concentración media de LPA de 0,085 μM , siendo más alta en mujeres que en hombres (Hosogaya et ál., 2008). Estos niveles se correlacionaban positivamente con la actividad lisofosfolipasa D de la ATX (Hosogaya et ál., 2008). A través de la técnica de inmunoensayo para esta enzima (Nakamura et ál., 2008), se pudo medir la concentración de la ATX en el suero de sujetos sanos encontrándose niveles alrededor de 0,731 $\mu\text{g/ml}$ siendo significativamente más alta ésta en mujeres que en hombres sanos y con una disminución significativa según aumentaba la edad (Nakamura et ál., 2008). La misma técnica ha permitido determinar la concentración de ATX en el líquido cefalorraquídeo siendo 1,32 $\mu\text{g/ml}$, es decir, aproximadamente el doble a la encontrada en el suero (Nakamura et ál., 2009). Este resultado parece indicar que la regulación de los niveles de ATX en el líquido cefalorraquídeo debe ser distinta a la del suero. Debido al papel en la regulación del neurodesarrollo y la implicación en trastornos psicopatológicos, la determinación de las concentraciones de ATX y LPA es especialmente importante. En este sentido es de destacar que, si bien los niveles de LPA encontrados en el líquido cefalorraquídeo no son tan elevados (principalmente por la falta de LPC en este medio, al menos no detectable con dicho método), en condiciones patológicas pueden verse aumentados drásticamente (Nakamura et ál., 2009).

1.2.3 Vías de degradación

Existen tres vías principales de degradación del LPA: a partir de fosfatasa, a partir de la conversión a PA, y por último, a partir de la formación de glicerol fosfato (PG, del inglés, *phosphoglycerol*) (Tigyi y Parrill, 2003, Figura 5). La más conocida es la conversión del LPA a monoacilglicerol (MAG) llevada a cabo por las enzimas fosfatasa de fosfolípido (LPP, del inglés, *lipid phosphate phosphatase*) localizadas en las membranas celulares, disminuyendo así los efectos biológicos del LPA (Pilquill et ál., 2001; Brindley, 2004; Pyne et ál., 2004; Meyer zu Heringdorf y Jakobs, 2007). No obstante, este mecanismo también puede dar lugar indirectamente a un incremento compensatorio de liberación de LPA (Pyne et ál., 2004). En la segunda vía, las enzimas LPA-aciltransferasas (LPA-AT, del inglés, *LPA-acyltransferase*) catalizan la transferencia de un grupo acil de la acil coenzima A (acil-Coa) al LPA para formar el PA. Por último, en la tercera vía, están implicada la enzima LPA-lisofosfolipasas (LPA-LPL, del inglés, *LPA-lysophospholipase*) que convierte el LPA a PG. Por otra parte, es importante destacar que, además de los procesos reguladores de su biosíntesis y su degradación, la señalización mediada por LPA también está regulada por la desensibilización e internalización de sus receptores en respuesta tanto al LPA, como a través de mecanismos independientes de ligando como la mediada por ésteres de forbol (Urs et ál., 2008).

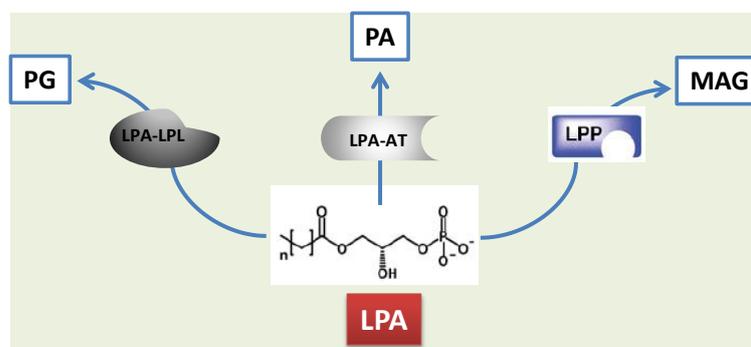


Figura 5. Vías de degradación para el LPA. En el esquema se representan las tres vías citada en el texto, mediadas por acción de fosfatasa de fosfolípidos (LPP), LPA-aciltransferasas (LPA-AT), y LPA-fosfolipasa (LPA-LPL), que degradarán el LPA dando lugar a monoacilglicerol (MAG), ácido fosfatídico (PA) y glicerol fosfato (PG), respectivamente. Esquema modificado de Tigyi y Parrill, 2003.

RECEPTORES DE LPA

2.1 Vías de señalización intracelular asociadas a los receptores de LPA

El LPA actúa a través de la unión con receptores específicos acoplados a proteína G (LPA₁₋₆) que difieren según los tejidos en los que se distribuyen y según la vía de señalización intracelular que generan, la cual dependerá del tipo de proteína G asociado, G_{α12/13}, G_{αi/0}, G_{αqi/11} y G_{αs} (Hecht et ál., 1996; Moolenaar et ál., 2004; Choi et ál., 2009; Choi et ál., 2010; revisado en Choi y Chun, 2013, Figura 6). En la vía mediada por la activación de la proteína G_{α12/13}, la proteína Rho actúa como intermediaria, y está implicada en un gran número de respuestas neuronales inducidas por LPA, como en la proliferación y la migración (Yan et ál., 2003), los cambios en el citoesqueleto generando esfericidad celular, la formación de fibras de estrés y la retracción de neuritas (Fukushima et ál., 1998; Ishii et ál., 2004), la inducción de muerte celular por apoptosis (Ye et ál., 2002), o en los procesos generales como el dolor neuropático (Inoue et ál., 2004) o la consolidación de la memoria espacial a largo plazo (Dash et ál., 2004). Por otro lado, la activación de la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, del inglés, *phosphatidylinositol-3-kinase*), asociada a la activación de la proteína G_{αi/0}, favorece la supervivencia (efectos anti-apoptóticos) (Ye et ál., 2002) como también, la migración y la proliferación celular a través de la vía Akt (Yan et ál., 2003; Kim et ál., 2006). La activación de G_{αqi/11} conlleva la activación de la fosfolipasa C que promueve, en última instancia, la acumulación y movilización de C²⁺ intracelular (Choi et ál., 2010). Por último, la activación de la proteína G_{αs} provoca la acumulación del adenosín monofosfato cíclico (AMPc, del inglés, *cyclic adenosine monophosphate*) intracelular (Lee et ál., 2008).

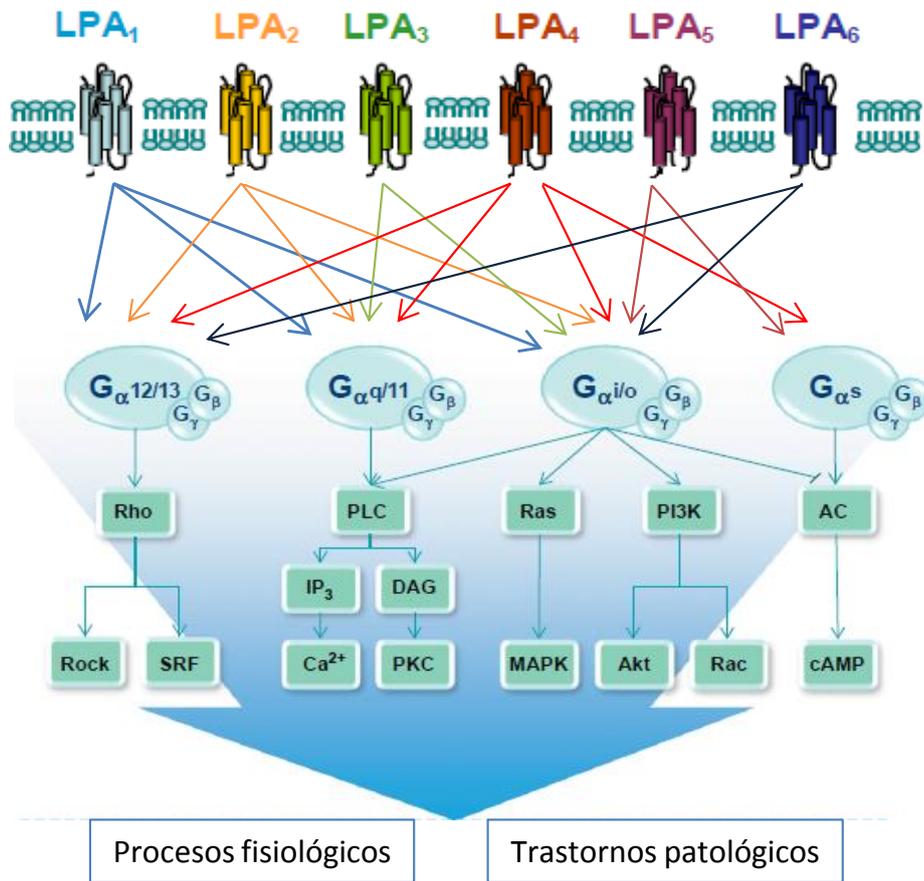


Figura 6. Vías de señalización intracelular asociadas a los receptores de LPA₁₋₆. PLC: fosfolipasa C, IP₃: inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteína quinasa C, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa, MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno, AC: adenilciclase. Modificado de Choi y Chun, 2013.

Los receptores de LPA pueden clasificarse en dos subgrupos en función al grado de homología presente en su estructura química (Choi et ál., 2010, Tabla 1). En el primer subgrupo llamado EDG, se encuentran los receptores LPA₁ (anteriormente EDG2), LPA₂ (anteriormente EDG4) y LPA₃ (anteriormente EDG7). Dentro de esta familia también se hallan los receptores para la S1P compartiendo un 50 % de los aminoácidos que conforman la estructura química con el receptor LPA₁ (Aoki et ál., 2008). Es importante destacar que los receptores para la S1P también están acoplados a proteínas G y están presentes en varios tipos celulares del SNC (revisado en Ishii et ál., 2004; Chi y Nicol, 2010; Chun et ál., 2010; Mutoh et ál., 2012; Choi y Chun, 2013). Actualmente, ambos receptores han sido identificados como factores imprescindibles para el desarrollo del SNC (revidado en Choi y Chun, 2013), y

están implicados en enfermedades como la esclerosis múltiple (Brinkmann et ál., 2010; Chun y Brinkmann, 2011), la hipoxia fetal e hidrocefalia (Harrison et ál., 2003; Brinkmann et ál., 2010; Chun y Brinkmann, 2011; Herr et ál., 2011; Yung et ál., 2011), el dolor neuropático (Inoue et ál., 2004; Nagai et ál., 2010; Lin et ál., 2012), la isquemia cerebral (Li et ál., 2008; Czech et ál., 2009), los traumatismos (Goldshmit et ál., 2010), la pérdida de audición (MacLennan et ál., 2001; Herr et ál., 2001; Kono et ál., 2007), la convulsiones (MacLennan et ál., 2001; Trimbuch et ál., 2009; Akahoshi et ál., 2011) y en la enfermedad de Sandhoff (Wu et ál., 2008).

En el segundo subgrupo se incluyen los receptores LPA₄ (anteriormente Gpr23/P2y9), LPA₅ (anteriormente Gpr92) y LPA₆ (anteriormente P2yr5), los cuales comparten entre sí aproximadamente un 35% de homología, no así con los receptores LPA₁₋₃ (Aoki et ál., 2008).

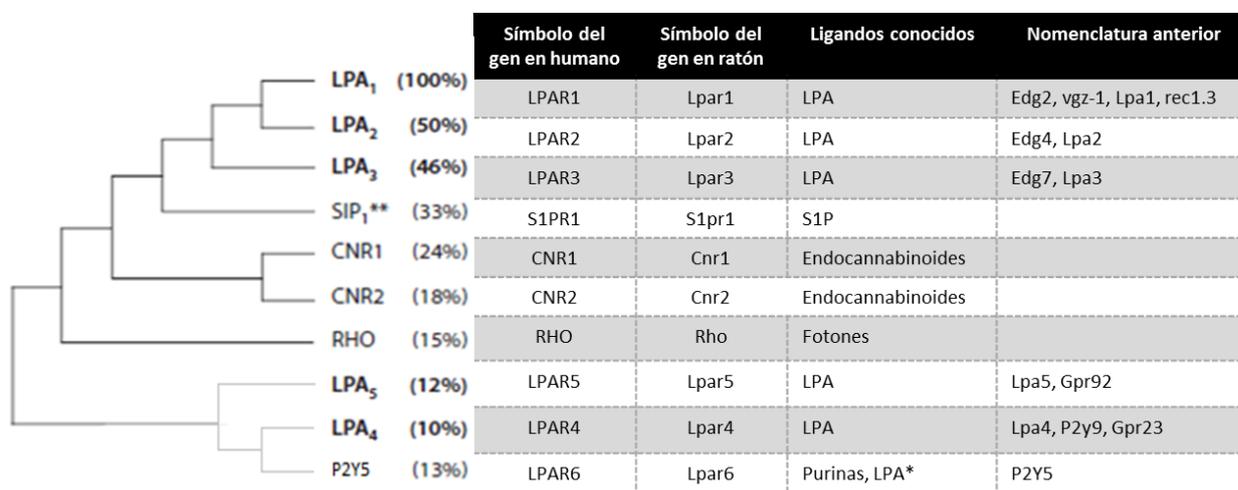


Tabla 1. Relación filogenética de los receptores LPA en función de su grado de homología. Se representa entre paréntesis el porcentaje de homología de aminoácidos que comparten con el receptor LPA₁. *Baja afinidad o ligando no confirmado (Choi y Chun, 2013).

Se ha estudiado la expresión de los distintos receptores de LPA en múltiples tejidos tanto en roedores como en humanos resumiéndose en la tabla 2. Sin embargo, es importante resaltar que, en algunos tipos celulares, el efecto mediado por el LPA es independiente de los receptores específicos de LPA acoplados a proteínas G, ya que el LPA también puede actuar como un agonista para el receptor nuclear gamma activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR_γ, del inglés, *nuclear peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) (McIntyre et ál., 2003, Figura 7). Este receptor juega un importante papel en la regulación del

metabolismo de los lípidos, la homeostasis de la glucosa, la diferenciación celular y la motilidad celular (Duval et ál., 2002; Evans et al., 2005; Kiec-Wilk et ál., 2005). Se ha sugerido que la activación del receptor PPAR γ mediada por LPA podría estar muy presente en patologías vasculares, habida cuenta de su efecto sobre la remodelación de la pared arterial (Cheng et ál., 2009).

		Cerebro embrionario	Cerebro adulto	Pulmón	Corazón	Intestino delgado	Estómago	Riñón	Músculo esquelético	Útero	Ovario	Testículos	Placenta	Próstata	Colon	Bazo	Timo	Páncreas	Piel	Hígado	Leucocitos
<i>Lpar1</i>	R	Alta	Alta	Moderada	Baja	Moderada	Baja	Baja	Baja	Alta	Baja	Moderada	Baja	NA	NA	Baja	Baja	Baja/inconsistente	Baja/inconsistente	Sin expresión	Sin expresión
<i>LPAR1</i>	H	NA	Moderada	Baja	Moderada	Moderada	NA	Moderada	Baja	NA	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	NA	Baja/inconsistente	Baja/inconsistente
<i>Lpar2</i>	R	Alta	Baja/inconsistente	Moderada	Baja/inconsistente	Sin expresión	Baja	Alta	Sin expresión	Alta	NA	Alta	NA	NA	NA	Baja	Baja	NA	NA	Sin expresión	NA
<i>LPAR2</i>	H	NA	Sin expresión	Sin expresión	Sin expresión	Sin expresión	NA	Sin expresión	Sin expresión	NA	Sin expresión	Alta	Sin expresión	Moderada	Sin expresión	Moderada	Moderada	Moderada	NA	Sin expresión	Alta
<i>Lpar3</i>	R	Baja/inconsistente	Baja	Alta	Baja	Moderada	Baja	Alta	Sin expresión	Alta	Baja/inconsistente	Alta	Baja	NA	NA	Baja	Baja	NA	NA	Sin expresión	NA
<i>LPAR3</i>	H	NA	Baja	Moderada	Alta	Sin expresión	Sin expresión	Sin expresión	Sin expresión	NA	Moderada	Alta	Baja/inconsistente	Alta	Baja/inconsistente	Sin expresión	Sin expresión	Alta	NA	Sin expresión	Sin expresión
<i>Lpar4</i>	R	Baja	Sin expresión	Sin expresión	Moderada	Sin expresión	Sin expresión	NA	Baja	Moderada	Sin expresión	Sin expresión	NA	NA	NA	Sin expresión	Baja/inconsistente	NA	Baja	Sin expresión	NA
<i>LPAR4</i>	H	NA	Baja	Sin expresión	Baja	Baja	NA	Sin expresión	NA	Alta	Baja	Sin expresión	Sin expresión	Sin expresión	Sin expresión	Sin expresión	Moderada	Moderada	NA	Sin expresión	Sin expresión
<i>Lpar5</i>	R	Baja/inconsistente	NA	Moderada	Moderada	Alta	Moderada	Baja	Sin expresión	Baja/inconsistente	NA	Baja	NA	NA	Moderada	Moderada	Moderada	NA	Moderada	Moderada	NA
<i>LPAR5</i>	H	NA	NA	Sin expresión	Moderada	Moderada	NA	Sin expresión	Sin expresión	NA	NA	NA	Moderada	Sin expresión	Baja	Alta	Sin expresión	NA	NA	Baja	Sin expresión

	Alta		Baja/inconsistente
	Moderada		Sin expresión
	Baja		NA

Tabla 2. Expresión de los receptores LPA₁₋₅ en ratón (R) y humano (H). (Adaptado de Choi et ál., 2010).

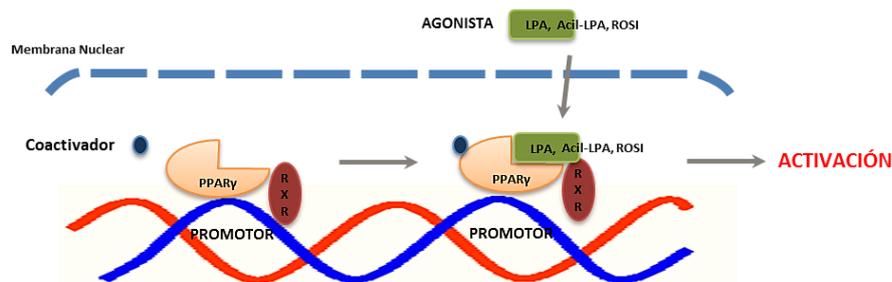


Figura 7. Esquema representativo de la activación del receptor PPAR γ . A través de la activación del receptor PPAR γ mediante agonistas (LPA, alquil-LPA o ROSI (rosiglitazona)) se induce la transcripción de genes implicados en la formación de las paredes arteriales. Figura modificada de (Tsukahara, 2012).

2.2 Tipos de receptores de LPA

2.2.1 Receptor LPA $_1$

El receptor LPA $_1$ fue el primero en identificarse y es el mejor estudiado. Se trata de una proteína con siete dominios transmembranales de aproximadamente 42 kDa de masa molecular y con 364 aminoácidos (Choi et ál., 2010). Existe, no obstante, una variante del receptor, MREC1.3, que presenta 18 aminoácidos menos en el extremo N-terminal (Contos y Chun, 1998), pero su significado biológico aún no ha sido evaluado. El receptor LPA $_1$ se acopla a tres tipos de proteínas G: G $_{ai/o}$, G $_{\alpha q/11}$, G $_{\alpha 12/13}$, activando las vías de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, del inglés, *mitogen-activated protein kinases*), fosfolipasa C, Akt, Rho, e inhibición de la adenilciclase (revisado en Choi et ál., 2010, Figura 5). Estas cascadas de señalización inducen multitud de respuestas celulares que incluyen proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular, cambios en el citoesqueleto y movilización de calcio intracelular, entre las más destacadas (Fukushima et ál., 2001; Goetzl et ál., 2002; Lynch y Macdonald, 2002; Ye et ál., 2002; Fujiwara et ál., 2003; Ankiler y Chun, 2004; Pilpel y Segal, 2006; Rhee et ál., 2006; Noguchi et ál., 2009; Choi et ál., 2010). El receptor LPA $_1$ muestra una alta afinidad para un amplio rango de especies de LPA, tanto ligadas a ácidos grasos saturados como a insaturados (Bandoh et ál., 2000).

La participación del receptor LPA $_1$ en el desarrollo normal así como en ciertas enfermedades o patologías es amplia, como en el dolor neuropático (traumatismo

craneoencefálico, o inflamación del sistema nervioso, Choi et ál., 2012), en trastornos psicopatológicos que tienen su origen en el neurodesarrollo como el autismo o la esquizofrenia (Hultman et ál., 1999; Brimacombe et ál., 2007; Byrne et ál., 2007; Castilla-Ortega et ál., 2011a), en la hidrocefalia fetal (Yung et ál., 2011), en la obesidad (Ferry et ál., 2003; Boucher et ál., 2005), el cáncer (revisado en Murph et ál., 2008), la fibrosis pulmonar (Tager et ál., 2008) y la fibrosis renal (Pradere et ál., 2007), entre otras. La tabla 3 detalla la participación de este receptor y del resto de los receptores de LPA, en algunas neuropatologías. Más adelante se detalla la participación de este receptor en determinados aspectos funcionales del sistema nervioso, por ser eje central de esta tesis.

2.2.2 Receptor LPA₂

El receptor LPA₂ se identificó mediante búsquedas en bases de datos de secuencias genéticas (GenBank®, <http://www.ncbi.nlm.gov/genbank/>), gracias a su elevada homología (aproximadamente un 60 %) con el receptor LPA₁. Se trata de una proteína de alrededor de 39 kDa de masa molecular y con 348 aminoácidos (Contos y Chun, 2000; Choi et ál., 2010). Su expresión está más restringida en ratones adultos y en humanos, en comparación con la que presenta el receptor LPA₁ (ver tabla 2). Al igual que el receptor LPA₁, el receptor LPA₂ se expresa en el cerebro embrionario y su expresión disminuye considerablemente en el adulto. El receptor LPA₂ se acopla a las proteínas G_{α12/13}, G_{αi/o} y G_{αqi/11} activando las respuestas asociadas a estas vías (Ishii et ál., 2004, Figura 5). La activación del LPA₂ se asocia a procesos de supervivencia, migración celular y cambios morfológicos (Choi et ál., 2010). Además, se ha asociado, junto con el receptor LPA₃, con la invasión y metástasis de células cancerosas de ovario, de endometrio, de mesotelioma y de colon (Shida et ál., 2003; Jeong et ál., 2008; Hope et ál., 2009). Asimismo, en estudios in vivo e in vitro, se ha demostrado su sobreexpresión en varios tipos celulares cancerígenos (Shida et ál., 2003; Kitayama et ál., 2004; Shida et ál., 2004, Lee y Yun, 2010).

Los ratones nulos para el receptor LPA₂ no demuestran ninguna alteración de su fenotipo anatómico o cerebral (Contos et ál., 2000a). Esto indica que, a diferencia del LPA₁, el receptor LPA₂ no es tan esencial para el desarrollo normal del ratón. En este sentido, los dobles mutantes que carecen de ambos receptores expresan unas alteraciones muy similares

a las de los mutantes que carecen únicamente de LPA₁. Por tanto, la ausencia de LPA₂ no parece provocar ningún efecto patológico (Contos et ál., 2000a). Sin embargo, en modelos celulares usando fibroblastos procedentes de ratones LPA₂-nulos, las células reducen las respuestas mediadas por el receptor, es decir, la proliferación, la movilización de calcio y la activación de las vías intracelulares asociadas. Además, en los fibroblastos que carecen de ambos receptores, estas respuestas se encuentran notablemente más reducidas que en las células que son nulas únicamente para alguno de ellos, lo que ha permitido concluir que los receptores LPA₁ y LPA₂ pueden actuar conjuntamente y mediar respuestas similares (Contos et ál., 2002).

2.2.3 Receptor LPA₃

El receptor LPA₃ se descubrió por técnicas de clonación basadas en PCR con uso de cebadores degenerados combinadas con búsquedas de homología de secuencias, siendo considerado, inicialmente, como un receptor huérfano. Se trata de un receptor acoplado a proteína G, de aproximadamente 40 kDa, que comparte un 50 % de aminoácidos con los receptores LPA₁ y LPA₂ (Bandoh et ál., 1999; Im et ál., 2000; Choi et ál., 2010). La expresión del receptor LPA₃ se encuentra localizada, principalmente, en el pulmón, los riñones, los testículos, el sistema reproductor femenino, y en menor medida, en el cerebro (Choi et ál., 2010, Tabla 2). En el útero, su expresión se relaciona con la fase de implantación del óvulo y se encuentra regulada por estrógenos y progesterona (Choi et ál. 2010). El receptor LPA₃ se conecta a las proteínas G_{αi/o} y G_{αq/11} para mediar la activación de la vía de la fosfolipasa C, movilización de calcio, la activación o la inhibición de la adenilciclase y la activación de MAPK (Ishii et ál., 2000, Figura 6). Este receptor presenta una mayor afinidad por las especies de LPA con ácidos grasos insaturados (18:1, 18:2, 18:3) (Bandoh et ál., 2000).

Los ratones nulos para el receptor LPA₃ son viables y normales en términos generales, pero las hembras presentan graves alteraciones en la reproducción, encontrándose afectada la implantación y localización del embrión, así como al tamaño de la camada (Ye et ál., 2005). Estos efectos posiblemente se deben a su papel en la implantación del óvulo, regulando las prostaglandinas, moléculas lipídicas cruciales en este proceso (Shah y Catt, 2005). Aunque el receptor LPA₃ se expresa en algunas estructuras cerebrales como el hipocampo, la corteza

prefrontal y la amígdala, los datos disponibles hasta la fecha indican que los animales nulos para el receptor LPA₃ no muestran ninguna alteración observable en el sistema nervioso (revisado en Choi et ál., 2010).

ENFERMEDADES	RECEPTOR	FUNCIONES VALIDADAS
Dolor neuropático	LPA ₁	Reducción de las respuestas al dolor a través de un mecanismo periférico (Inoue et ál., 2004; Inoue et ál., 2008; Xie et ál., 2008; Choi et ál., 2010; Nagai et ál., 2010)
	LPA ₃	Reducción de los niveles de LPA (Ma et ál., 2009)
	LPA ₅	Reducción de las respuestas al dolor a través de un mecanismo distinto en el SNC (Lin et al 2012)
Ictus Isquémico	LPA ₁	Aumento de los niveles de LPA o S1P en pacientes o modelos animales (Eichholtz et ál., 1993; Kimura et ál., 2008; Li et ál., 2008)
		Regulación al alza de LPA ₁ y LPA ₂ por lesión isquémica retiniana (Savitz et ál., 2006)
		Disminución de muerte de células ganglionares de la retina por la hipoxia (Yang et ál., 2009)
Neurotrauma		
Traumatismo craneoencefálico	LPA _{1/2/3}	Aumento de LPA ₂ y parcialmente de LPA ₁ en astrocitos reactivos en pacientes (Frugier et ál., 2011)
		Aumento de LPA ₂ o LPA ₃ en astrocitos reactivos o en neuronas después del daño (Goldshmit et ál., 2010)
Lesión de la médula espinal	LPA _{1/2/3}	Aumento de LPA ₁ y LPA ₂ en astrocitos reactivos y LPA ₃ en neuronas tras el daño (Goldshmit et ál., 2010)
Neuropsiquiátricas		
Esquizofrenia	LPA ₁	Inhibición prepulso, alteración de la síntesis de 5-HT y dimorfismos craneofacial en ratones nulos (Harrison et ál., 2003)
		Cambios neuroquímicos y bioquímicos relacionados con la esquizofrenia en los ratones nulos (Roberts et ál., 2005; Cunnigham et ál., 2006; Musazzi et ál., 2011)
		Disminución de la regulación del LPA ₁ en pacientes (Bowden et ál., 2006)

Comportamiento disfuncional	LPA ₁	Alteración de la ansiedad, las alteraciones motoras y la memoria en los ratones nulos (Dash et ál., 2004; Matas-Rico et ál., 2008; Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010)
		Atenuación de la actividad locomotora inducida por la cocaína en ratones nulos (Blanco et ál., 2012)
		Defectos sobre la neurogénesis hipocampal en los ratones nulos en condiciones de estrés crónico (Castilla-Ortega et ál., 2010)
Enfermedad de Alzheimer		Disminución de la producción de LPA o S1P en pacientes (Umemura et ál., 2006, Takasugi et ál., 2011)
		LPA reduce la muerte neuronal causado por la acumulación de β-amiloide (Zheng et ál., 2005)

<u>Trastornos del desarrollo</u>		
Hipoxia fetal	LPA ₁	Atenuación de la desorganización cortical inducida por hipoxia en los ratones nulos (Herr et ál., 2011)
		Desarrollo del modelo de hidrocefalia fetal mediante la inyección de LPA en embrión (Yung et ál., 2011)
Hidrocefalia fetal	LPA ₁	Atenuación de la hidrocefalia fetal inducida por LPA en los ratones nulos (Yung et ál., 2011)

Otros

Convulsión	LPA _{1/2}	Hiperexcitabilidad neuronal evocado por LPA o S1P (MacLennan et ál., 2001; Sim-Selley et ál., 2009; Trimbuch et ál., 2009; Chi y Nicol, 2010)
	LPA ₂	Atenuación de la deficiencia mediada por PRG-1 en las convulsiones en los ratones nulos (Trimbuch et ál., 2009)
Fibrosis pulmonar	LPA ₁	Los niveles de LPA aumentan en el fluido broncoalveolar después de la lesión pulmonar (Tager et ál., 2008)
Fibrosis renal	LPA ₁	El LPA está involucrado en la obstrucción del túbulo intersticial (Pradere et ál., 2007)
Obesidad	LPA ₁	Un mecanismo dependiente de LPA ejerce un control paracrino sobre el crecimiento de preadipocitos a adipocitos (Ferry e tal., 2003; Boucher et ál., 2005)

Tabla 3. Resumen de las funciones identificadas de los receptores de LPA en enfermedades relacionadas con el SNC y periférico. Tabla modificada de Choi y Chun, 2013.

2.2.4 Receptor LPA₄

El receptor LPA₄ está menos relacionado con los receptores clásicos de LPA y S1P, compartiendo mayor similitud con los receptores purinérgicos P2Y. Se trata de una proteína de 42 kDa de masa molecular y con 370 aminoácidos (Janssens et ál., 1997). Entre todos los tejidos examinados tanto en ratones como en humanos, el receptor LPA₄ se expresa principalmente en el ovario, y en menor medida en menor medida, en el cerebro embrionario, el corazón, el timo y el páncreas, entre otros órganos (Tabla 2).

Como ocurre con los otros receptores de LPA, el receptor LPA₄ se acopla a las proteína $G_{\alpha 12/13}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q/11}$ y $G_{\alpha s}$ (Lee et ál., 2007), mediando respuestas asociadas a estas vías de señalización como la esfericidad celular, la formación de fibras de estrés y la movilización de calcio intracelular (revisado en Choi et ál., 2010). Los ratones carentes del receptor LPA₄ no presentan alteraciones evidentes (Lee et ál., 2008) aunque hay una disminución de la supervivencia prenatal causada por hemorragias asociadas con una formación anormal de los vasos sanguíneos. Además, el sistema linfático se encuentra igualmente afectado (Sumida et ál., 2010). Por último, el receptor LPA₄ está implicado en la regulación de la osteogénesis (Liu et ál., 2010) pudiendo estar contrarrestando la osteogénesis mediada por el receptor LPA₁ (Liu et ál., 2009).

2.2.5 Receptor LPA₅

El receptor LPA₅ se identificó por primera vez en el año 2006, a partir de un receptor huérfano de 41 kDa y 372 aminoácidos que demostró tener afinidad por el LPA (Kotarsky et ál., 2006; Joo et ál., 2007). Aunque es estructuralmente diferente a los receptores LPA₁₋₃, comparte un 35 % de homología con el receptor LPA₄. En ratón, el receptor LPA₅ se expresa en numerosos tejidos y se ha detectado su expresión en cerebro embrionario de ratones sugiriendo un papel importante durante el neurodesarrollo (Ohuchi et ál., 2008). El receptor LPA₅ se acopla a las proteínas $G_{\alpha 12/13}$ y $G_{\alpha q}$ (Lee et ál., 2006), induciendo la retracción de

neuritas, formación de fibras de estrés e incremento del calcio intracelular (Figura 5). También, provoca el incremento de los niveles de calcio intracelular, así como la acumulación de AMPc (Lee et ál., 2006).

Los ratones nulos para el receptor LPA₅ muestran una reducción del umbral nociceptivo y exhiben un fenotipo comportamental menos ansioso que los ratones normales, por lo que parece tratarse de un receptor fundamental en la regulación de la nocicepción y la hipersensibilidad al dolor, así como de la conducta emocional (Callaerts-Vegh et ál., 2012).

2.2.6 Receptor LPA₆

El receptor LPA₆ es el receptor de LPA más recientemente identificado y junto con el receptor LPA₄ pertenece a la familia de receptores P2Y (Pasternack et ál., 2008). Este receptor se encuentra acoplado a la vía de señalización mediada por G_{α12/13}, interviniendo en la morfología celular y en la acumulación de AMPc (Yanagida et ál., 2009). Tiene mayor afinidad por las formas saturadas del LPA y necesita de concentraciones más altas (alrededor de 10 μM) para tener un efecto, en comparación con la concentración del orden nanomolar necesaria para activar el resto de los receptores de LPA (revisado en Yanagida et ál., 2009). Por los estudios realizados, el receptor LPA₆ parece estar implicado en el desarrollo del folículo piloso y en el crecimiento capilar siendo necesario para evitar la pérdida del cabello (Pasternack et ál., 2008; Shimomura et ál., 2009; Nahum et ál., 2011).

RECEPTOR LPA₁**3.1 Implicación del receptor LPA₁ en el sistema nervioso y en la conducta**

La expresión del receptor LPA₁, tanto en ratones como en humanos, está ampliamente distribuida en diferentes tejidos y tipos celulares (Contos et ál., 2000; Ye et ál., 2002; Choi et ál., 2010, Tabla 2). Entre las funciones de este receptor en los diferentes sistemas, tiene especial relevancia las que lleva a cabo en el sistema nervioso. Durante el desarrollo del sistema nervioso, el receptor LPA₁ se expresa en precursores neuronales localizándose en la zona subventricular embrionaria donde tiene lugar la neurogénesis cortical (Hecht et ál., 1996; Estivill-Torrús et ál., 2008, Figura 8). Tras el nacimiento, esa expresión disminuye pero continúa en los oligodendrocitos y las células de Schwann, coincidiendo con la mielinización (Hecht et ál., 1996; Weiner et ál., 1998). La expresión de este receptor co-localiza, en dicho periodo, con la de la proteína mielínica básica (MBP, del inglés, *myelin basic protein*) y la proteína proteolípida (PLP, del inglés *proteolipid protein*) (Allard et ál., 1998; Weiner et ál., 1998; Handford et ál., 2001; Cervera et ál., 2002), lo que sugiere un importante papel en la regulación del proceso de mielinización (Stankoff et ál., 2002; Nogaroli et ál., 2009). Esta hipótesis se ha visto refrendada por el hecho de que los ratones carentes del receptor LPA₁, muestran defectos en la diferenciación de los oligodendrocitos y la mielinización, debido a que este receptor es necesario para el adecuado transporte de las proteínas implicadas en la formación de la mielina (García-Díaz et ál., 2007).

Asimismo, se ha detectado expresión de este receptor en neuronas adultas (Allard et ál., 1998; Fukushima et ál., 2002; Fujiwara et ál., 2003; Pilpel y Segal, 2006), y en células gliales como oligodendrocitos (Weiner et ál., 1998; Handford et ál., 2001), astrocitos (Tabuchi et ál., 2000; Shano et ál., 2008) y microglía (Moller et ál., 2001; Tham et ál., 2003). En el hipocampo adulto, el receptor LPA₁ se expresa en las neuronas piramidales de las áreas CA1-3 (Pilpel y Segal, 2006), en las células progenitoras (Rhee et ál. 2006; Matas-Rico et ál., 2008) y en las células gliales (Handford et ál. 2001).

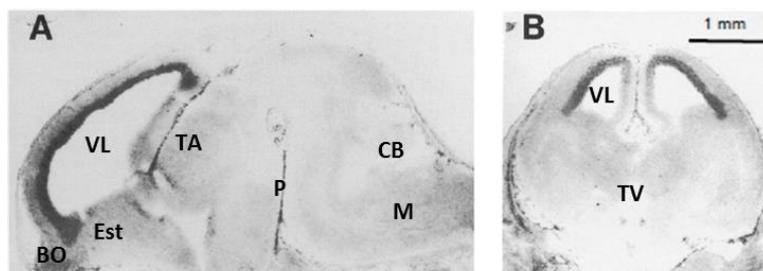


Figura 8. Expresión del gen *Lpar1* en la zona subventricular del sistema nervioso central de embrión de ratón (E14). Corte sagital (A) y coronal (B). VL: ventrículo lateral, BO: Bulbo olfatorio, Est: Estriado, TA: Tálamo, P: Puente, CB: Cerebelo, M: Médula, TV: Tercer ventrículo (Hecht et ál., 1996).

Buena parte de los estudios disponibles hasta la fecha, han sido realizados añadiendo de manera exógena fármacos reguladores del receptor, agonistas y antagonistas, cuya especificidad no es exclusiva del receptor LPA_1 , sino que, en una u otra medida, también actúan sobre el resto de receptores de la misma familia. No es sino hasta el desarrollo, caracterización y estudio de animales nulos carentes del receptor, cuando se tiene un conocimiento más concreto de su función, demostrándose, así, el papel primordial del receptor LPA_1 en el neurodesarrollo, incluyendo el desarrollo cortical. El primer ratón nulo fue descrito por Contos et ál. (2000), obtenido mediante la delección del exón 3 de los dominios transmembrana I-IV del gen *Lpar1* que codificaba para el sitio de unión al ligando. Los principales déficits observados tras esa delección fueron: alta mortalidad perinatal (aproximadamente un 50 %), debido probablemente a déficit olfatorios, alteraciones craneoencefálicas (con hocicos achatados y ojos más separados), menor tamaño corporal, hematomas frontales e incremento de muerte celular en las células de Schwann del nervio ciático (Contos et ál., 2000; Weiner et ál., 2001). Además, sus neuroblastos presentaban menor proliferación, migración y esfericidad celular tras la administración de LPA (Contos et ál., 2000), lo cual indicaba que el receptor LPA_1 mediaba estas respuestas celulares. Años más tarde, Harrison et ál. (2003) publicaron los resultados de otro ratón nulo para el receptor LPA_1 , siendo independiente del primero, y con el que compartía los defectos observados, sin mostrar anomalías estructurales significativas. La relevancia del estudio de Harrison et ál. (2003) fue que describió por primera vez alteraciones fenotípicas en relación al comportamiento. Estos ratones nulos para el receptor LPA_1 presentaban una reducción de la actividad locomotora y un importante déficit en la inhibición pre-pulso del reflejo de

sobresalto. Además, presentaban un déficit en los niveles y el *turnover* de serotonina en numerosas áreas cerebrales que incluían la corteza frontal, el hipocampo, el hipotálamo y el núcleo accumbens, entre otras y por el contrario, un incremento en el estriado (Harrison et ál., 2003). En estudios posteriores del mismo grupo (Roberts et ál., 2005) se observaron que los animales carentes del receptor LPA₁, presentaban otras anomalías neuroquímicas como la reducida liberación de ácido gamma-aminobutírico, GABA (del inglés, *gamma-aminobutyric acid*) y glutamato en el hipocampo, en respuesta a la estimulación. En este sentido, se ha descrito que el LPA aumenta la actividad de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) en la sinapsis de las neuronas piramidales del hipocampo (Lu et ál., 1999), lo que sugiere una función del LPA en la plasticidad sináptica. En los últimos años, varios estudios han puesto de manifiesto que la ausencia del receptor LPA₁ causa una reducción de las oscilaciones de la frecuencia alta, o gamma, en las capas superficiales de la corteza entorrinal, a nivel de hipocampo, así como del número de neuronas GABAérgicas (Cunningham et ál., 2006). Por esta razón, y con objeto de conocer mejor la especificidad de los defectos atribuidos al receptor, así como de determinar su validez como modelo neuropatológico, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral, pretende estudiar la restauración del sistema GABAérgico del hipocampo en los ratones carentes del receptor LPA₁.

Un estudio más reciente de Musazzi et ál. (2011) sobre sinaptosomas de hipocampo de ratones carentes del receptor LPA₁, demostró que existe una desregulación de las subunidades alfa y beta de la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII, del inglés, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) a nivel sináptico, donde la enzima, que actúa como un regulador clave en la potenciación a largo plazo y la excitabilidad neuronal (Lisman et ál., 2002), modula la transmisión glutamatérgica. En dicho trabajo se demostró que, a nivel postsináptico, los ratones nulos para el receptor LPA₁ mostraban cambios en la interacción de la enzima con los receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA y de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico, AMPA (del inglés, *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*). Como consecuencia, los receptores AMPA mostraron una conductancia alterada y una reducción de la respuesta en las vías de señalización intracelular por NMDA (Lisman et ál., 2002). Asimismo, a nivel presináptico la carencia del receptor en estos animales genera una acumulación de los denominados complejos de proteínas SNARE, mediadores de la fusión de las vesículas sinápticas y que tienen relevancia en algunas

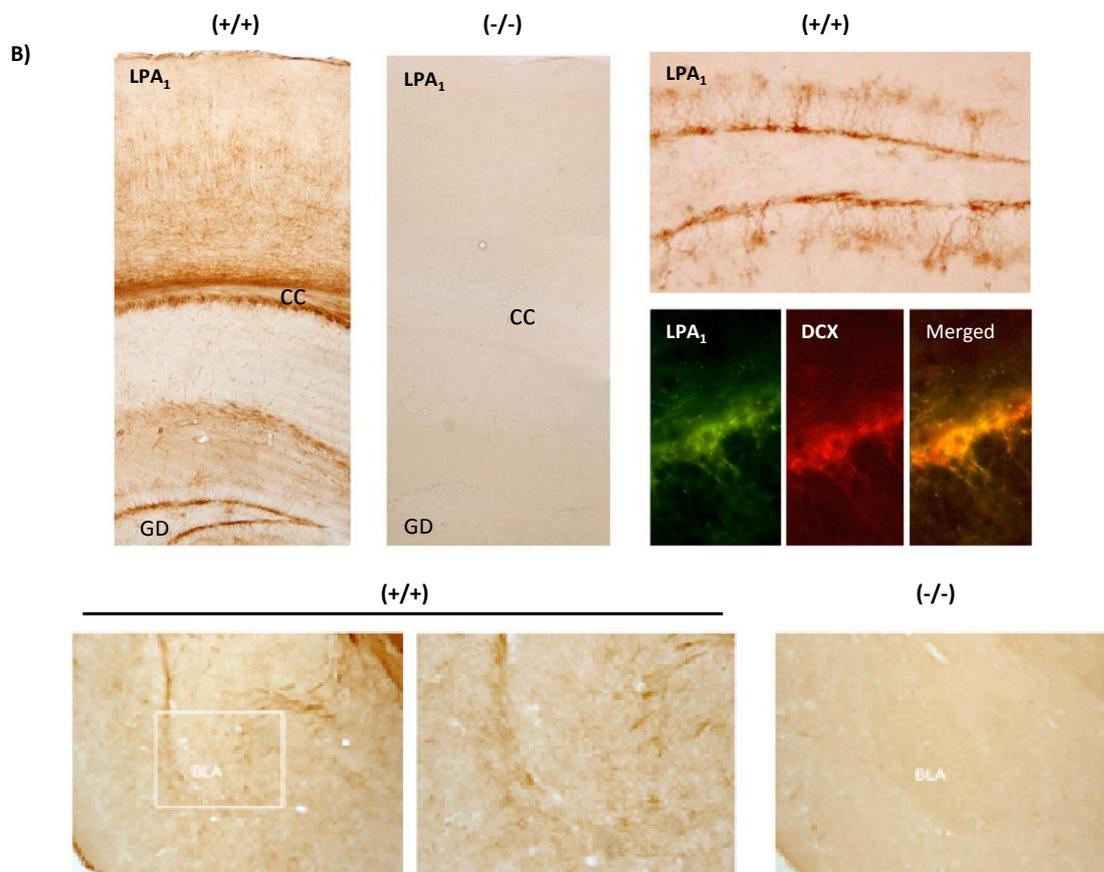
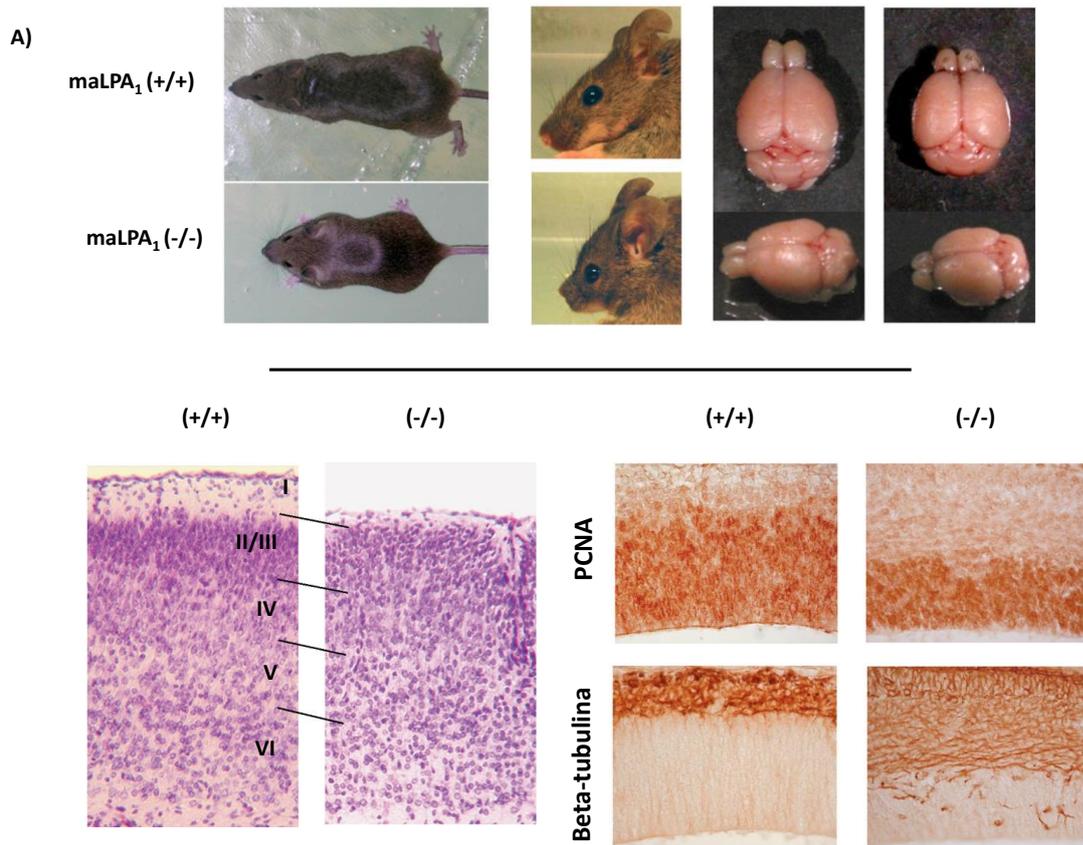
patologías como en la esquizofrenia (Lisman et ál., 2002). En relación con la modulación glutamatérgica hipocampal, es preciso señalar que la señalización mediada por LPA implica no solo al receptor LPA₁ sino también al receptor LPA₂, el cual se ha detectado en terminales presinápticos glutamatérgicos (Trimbuch et ál., 2009). Muchos de los mecanismos que regulan la formación de la memoria y la potenciación a largo plazo son activados y regulados por modificaciones en el estado de fosforilación de diferentes proteínas quinasas, como la quinasa activada por estímulos extracelulares, Erk (del inglés, extracelular *signal-regulated kinases*) y CaMKII cuya actividad puede ser también modulada por neurotransmisores como la serotonina (Cammarota et ál., 2008). De esta forma, el LPA por medio de sus receptores, principalmente el LPA₁, confiere un importante papel sobre estos procesos.

Por otra parte, durante la expansión de la colonia de la línea original nula para *Lpar1* (Contos et ál., 2000), nuestro grupo de investigación obtuvo, de manera espontánea una variante viable y estable que fue denominada *Málaga* (maLPA₁, Estivill-Torrís et ál., 2008). Además de exhibir características morfológicas similares a sus predecesores, el análisis de la corteza cerebral de los ratones maLPA₁-nulos reveló una neurogénesis alterada, con defectos en proliferación y diferenciación, que conllevaban un incremento de la muerte celular embrionaria y postnatal en las capas profundas corticales. Debido a ello, los ratones maLPA₁-nulos en edad adulta presentan una reducción de la masa y volumen cerebral con alteración de la densidad y la distribución de las neuronas de la corteza motora y sensorial (Estivill-Torrús et ál., 2008, Figura 9). Además de una mielinización defectuosa del SNC debido a una alteración en el transporte de las proteínas a la membrana celular para la formación de la mielina (García-Díaz et ál., 2007). Otro defecto fue sobre la neurogénesis hipocampal adulta, a nivel de la proliferación y la diferenciación celular, tanto en condiciones basales como tras la estimulación por la combinación de la exposición al enriquecimiento ambiental y al ejercicio físico voluntario. Además de esta reducción en neurogénesis, estaba afectada la supervivencia y la maduración dendrítica, demostrándose influencias específicas sobre los niveles de factores neurotróficos (Matas-Rico et ál., 2008).

Recientemente, estudios desarrollados por nuestro grupo de investigación muestran que los ratones maLPA₁-nulos presentan una hiperactividad neuronal a nivel hipocampal y prefrontal en condiciones basales, observados mediante la determinación de la proteína c-Fos (Castilla-Ortega et ál., 2012). Esta alteración podría estar relacionada con la transmisión

glutamatérgica hipocampal en ausencia del receptor, debido al patrón que muestran estos animales que se caracterizan por una alteración de la densidad y la actividad de varios receptores de glutamato (Musazzi et ál., 2011; Blanco et ál., 2012), una acumulación de los complejos de SNARE y un aumento de la fosforilación de la proteína CaMKII (Musazzi et ál., 2011). También, puede estar relacionada con la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB, del *inglés*, *cAMP response element-binding*), un importante promotor de la transcripción de *c-fos* en el hipocampo (Zhou et ál., 2006), o por otros factores de transcripción que pueden intervenir en la expresión de *c-fos* (Vanhoutte et ál., 1999). Otra evidencia destacable de los ratones maLPA₁-nulos es la reducción del número de neuronas GABAérgicas que expresan proteínas ligadoras de calcio y el menor volumen de la amígdala (Pedraza et ál., 2013).

Además de caracterizar la neurogénesis cortical durante el desarrollo, y la que tiene lugar en el adulto, a nivel hipocampal, y en relación a la plasticidad estructural, morfológica y neuroquímica, de los ratones maLPA₁-nulos carentes del receptor, nuestro grupo de investigación también realizó un exhaustivo análisis neurológico de estos animales. Los resultados mostraron que la ausencia del receptor venía acompañada de déficits moderados de tipo olfativo, somestésicos y motores, sin presentar alteraciones funcionales en la retina ni en los potenciales evocados auditivos (Santín et ál., 2009). Estos déficits sensoriomotores observados, podrían deberse, al menos en parte, a las ya mencionadas alteraciones en el neurodesarrollo que afectan a la mielinización (Contos et ál., 2000; García-Díaz et ál., 2007) y a la organización de regiones cerebrales tales como el bulbo olfatorio (Contos et ál., 2000) y la corteza motora (Estivill-Torrús et ál., 2008).



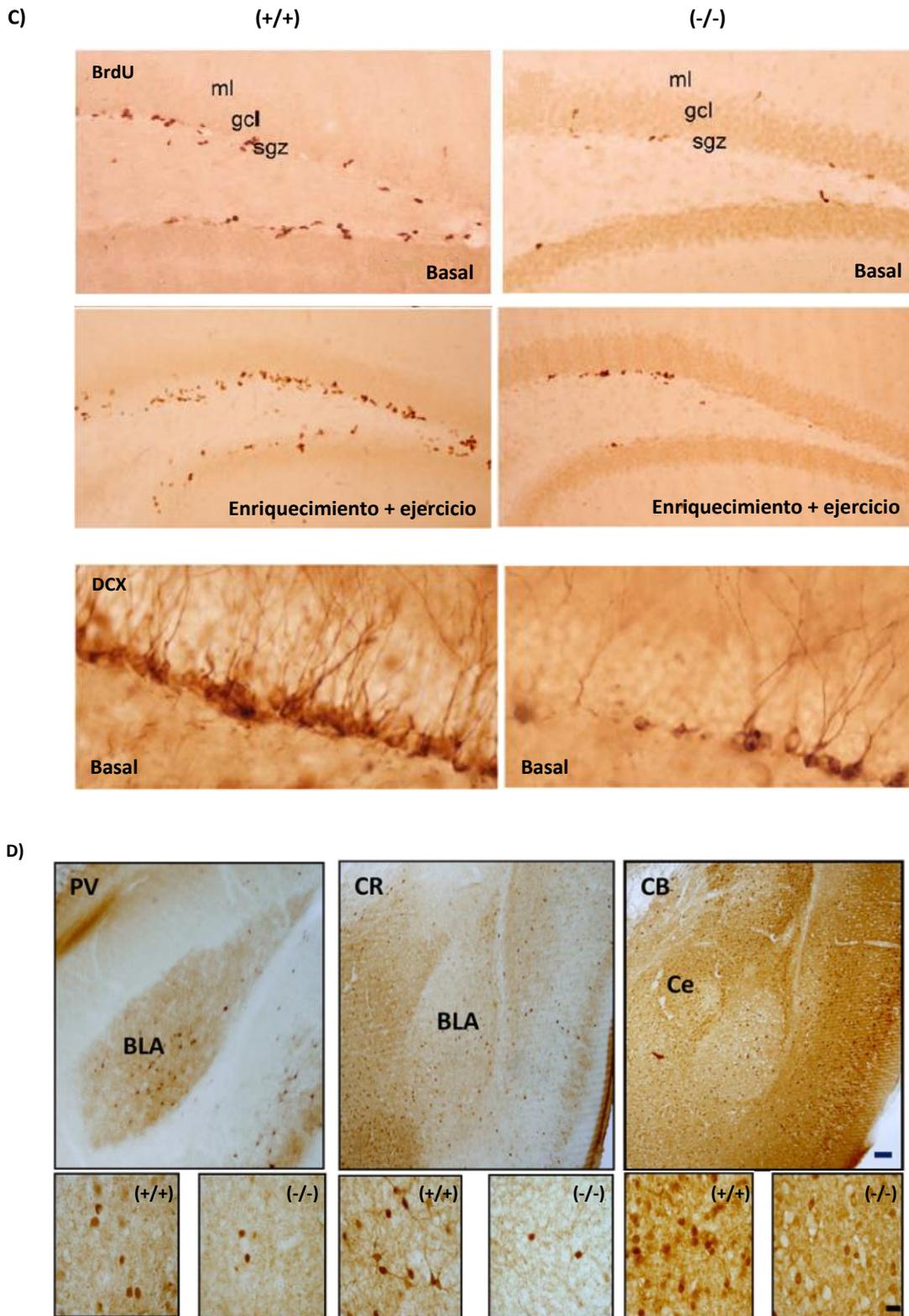


Figura 9. Alteraciones morfológicas y defectos neuronales en los ratones nulos para el receptor LPA_1 . (A) Panel superior. Los ratones homocigotos de la variante *Málaga* LPA_1 -nulos (-/-), carentes del receptor LPA_1 , presentan menor tamaño corporal (izquierda), dimorfismo craneoencefálico (centro) y un cerebro de menor tamaño (derecha), por comparación con el fenotipo

silvestre (+/+) (Estivill-Torrús et ál., 2008). Panel inferior. A nivel histológico, muestran menor grosor de la corteza cerebral y alteración de la celularidad (izquierda), causado por una alteración de la neurogénesis, mostrando una menor capa proliferativa (detectada por su inmunoreactividad al antígeno de proliferación nuclear, PCNA) y una maduración prematura (detectada por inmunoreactividad al antígeno betatubulina) que tiene lugar en la zona presuntamente proliferante. (B) Panel superior. En el animal adulto la expresión del receptor LPA₁ se localiza en las fibras de mielina corticales radicales y del cuerpo caloso (cs) y en la zona del giro dentado (gd) del hipocampo (izquierda), donde se expresa en los precursores neuronales (derecha, arriba) como demuestra la co-localización (*merged*) del receptor con el antígeno doblecortina, DCX, específico de progenitores neuronales inmaduros (derecha, abajo). La imagen central corresponde al animal nulo para el receptor, sin reactividad detectable para LPA₁. Panel inferior. De igual manera la expresión de LPA₁, es detectada a nivel de la amígdala basolateral (bla). (C) A nivel hipocampal y en comparación con los animales normales o control, la ausencia del receptor genera una menor neurogénesis adulta (detectada por estudios con bromodesoxiuridina, BrdU) y una proliferación incompleta (detectada por la inmunohistoquímica para la doblecortina, DCX) en el giro dentado, particularmente tras la estimulación con enriquecimiento ambiental y ejercicio (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011) (D) Reducción de las subpoblaciones de neuronas GABAérgicas que expresan proteínas ligadoras de calcio en la amígdala en los ratones maLPA₁-nulos carentes del receptor. Cc: cuerpo caloso, ml: capa molecular, gcl: capa granular, sgz: zona subgranular, GD: giro dentado, PV: parvalbúmina, CR: calretinina, CB: calbindina, BLA: amígdala basolateral. Ce: centro lateral.

En los últimos años, hemos descrito el fenotipo conductual de los ratones maLPA₁-nulos a través de una serie de pruebas conductuales examinando el comportamiento exploratorio, las conductas emocionales, la memoria relacional y aversiva, entre otras (Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010; Blanco et ál., 2012; Castilla-Ortega et ál., 2012; Pedraza et ál., 2013). La exhaustiva evaluación comportamental de estos animales ha venido a demostrar la relevancia de este ratón como modelo para el estudio de trastornos psicopatológicos, además de hacer evidente el papel que desempeña la señalización mediada por el receptor LPA₁ en la conducta normal (revisado en Estivill-Torrús et ál., 2013). En consonancia con el trabajo inicial de Harrison et ál. (2003), en ausencia del receptor LPA₁, y por comparación con el fenotipo silvestre, los ratones maLPA₁-nulos manifiestan un claro déficit exploratorio cuando son expuestos a contextos espaciales novedosos en la prueba de campo abierto, así como un aumento del comportamiento de tipo ansioso en la prueba del

laberinto en cruz elevado permaneciendo más tiempo en los brazos cerrados del laberinto (Santín et ál., 2009). Una posible causa de estas anomalías, podría relacionarse con las deficiencias en el sistema serotorinérgico presentes en los ratones nulos para el LPA₁, ya que esta carencia puede modificar e influir sobre las respuestas emocionales como la ansiedad, el estrés o la depresión (Parks et ál., 1998; Lopez et ál., 1999; Mueller y Beck, 2000; Belzung y Griebel, 2001; Joca et ál., 2007; Savitz et ál., 2009).

Hasta la fecha, los estudios experimentales realizados por nuestro grupo de investigación muestran claramente la importancia del receptor LPA₁ en el aprendizaje de tareas dependientes del hipocampo. En este sentido, hemos evaluado la capacidad del aprendizaje y la memoria espacial a través de la prueba del laberinto acuático de Morris. La ausencia del receptor LPA₁ no parece causar un déficit general del aprendizaje espacial, al ser los ratones capaces de aprender a localizar la plataforma sumergida. No obstante, en el ensayo de prueba se observa que la memoria espacial a largo plazo de los ratones maLPA₁-nulos es notablemente deficitaria, no presentando una preferencia clara por la exploración del cuadrante en el que se encontraba la plataforma sumergida durante el entrenamiento. De forma complementaria, estos ratones exhiben un uso anómalo de las estrategias de búsqueda, con predominio de estrategias no espaciales y trayectos con bucles repetitivos (Santín et ál., 2009). Estos resultados demuestran la importancia de este receptor en la memoria espacial y sugieren que la mejora del aprendizaje espacial inducida por la administración intrahipocampal de LPA (Dash et ál., 2004), puede deberse a la estimulación del receptor LPA₁, y que en su ausencia provoca un déficit en la formación de la memoria espacial a largo plazo.

Para profundizar en la relación ente el receptor LPA₁ y la memoria espacial, también se estudió la ejecución de ratones carentes de este receptor en la prueba del laberinto de hoyos. En esta tarea, el animal es expuesto a un campo abierto que consta de una serie de hoyos reforzados y no reforzados, teniendo que aprender a visitar los hoyos que contienen el reforzador, evitar los que no los contienen y evitar repetir los hoyo que previamente habían visitados. Esta tarea permite evaluar de forma simultánea en una misma tarea, la memoria de trabajo y de referencia espaciales. Los resultados obtenidos muestran que los animales carentes del receptor del LPA₁, presentan un grave déficit en la memoria de referencia espacial, déficit que fue mayor conforme aumentaba la dificultad de la tarea descrita (Castilla-Ortega et ál., 2010). Complementariamente, se observa que durante la tarea de memoria de

trabajo, los ratones $maLPA_1$ -nulos cometen más errores que los ratones salvajes, pero sólo durante el primer día de entrenamiento. Este resultado se ha interpretado como un déficit para aprender las reglas de la tarea de la memoria de trabajo, un componente asociado, de nuevo, con la memoria a largo plazo de tipo espacial (Castilla-Ortega et ál., 2010). En este mismo estudio, y en consonancia con estudios anteriores, también se consta el incremento de las conductas de ansiedad y los problemas de habituación a largo plazo de la conducta exploratoria. El análisis de componentes principales (PCA) empleando variables relacionadas con la conducta exploratoria, emocional y de memoria, permite destacar la influencia de factores emocionales y/o exploratorios en los déficits de memoria observados, subrayando el papel del receptor LPA_1 en la especificidad de los mismos (Castilla-Ortega et ál., 2010).

Los estudios llevados a cabo hasta la fecha por nuestro grupo y otros equipos de investigación hacen pensar que, al igual que sucede con otros receptores en el sistema nervioso, la actividad de los receptores de LPA_1 funciona a demanda. Así, en el hipocampo, la estimulación neurogénica mediante el ejercicio y el enriquecimiento ambiental es la que acaba por hacer evidente el requerimiento del receptor en los procesos que precisan de una respuesta neurogénica (Matas-Rico et ál., 2008). De manera similar, moduladores negativos de la neurogénesis hipocampal, como el estrés, terminan por generar un cuadro dramático en ausencia de la vía de señalización por LPA_1 (Castilla-Ortega et al, 2011; García-Fernandez et ál., 2012) agravando el patrón neurogénico y conductual que, per se, mostraban los animales nulos (Castilla-Ortega et ál., 2010) y demostrando, una vez más, cómo la señalización por LPA_1 es capaz de regular de manera tan exquisita estos sistemas.

Recientemente, también hemos extendido los estudios a otras pruebas comportamentales que dependen de la integridad del hipocampo. De este modo, hemos demostrado la importancia del receptor LPA_1 en el establecimiento de la memoria episódica. En este sentido, observamos que los ratones carentes del receptor LPA_1 no son capaces de aprender una tarea de memoria episódica, sin embargo, ejecutan correctamente tareas más simples como la discriminación de objetos en función de su grado de familiaridad o novedad (Castilla-Ortega et ál., 2012). Además, también hemos descrito la importancia del receptor LPA_1 en el establecimiento de las asociaciones droga-contexto, una forma de memoria contextual dependiente del hipocampo (Blanco et ál., 2012). Así, los ratones $maLPA_1$ -nulos presentan alteraciones para establecer asociaciones entre un contexto y la administración de

cocaína, sin verse afectadas conductas asociadas al consumo crónico de cocaína independiente del hipocampo. Y por último, hemos vinculado por primera vez el receptor LPA₁ con la capacidad para extinguir asociaciones complejas y dependientes del hipocampo, en modelos de miedo condicionado contextual (Pedraza et ál., 2013). Estos resultados muestran que tanto la ausencia del receptor LPA₁ como su bloqueo farmacológico afectan gravemente la capacidad de los animales para extinguir la memoria de miedo condicionado.

En resumen, los estudios conductuales desarrollados hasta la fecha, demuestran la importancia del receptor LPA₁ para el correcto desarrollo de tareas dependientes del hipocampo como la memoria espacial, la memoria episódica, el establecimiento de asociaciones droga-contexto o la formación/extinción de memorias aversivas. Basándonos en la necesidad de un hipocampo normal y funcional para que estas asociaciones se puedan desarrollar con normalidad, hemos propuesto que la ausencia del receptor LPA₁ provoca una disfunción hipocampal severa y que ésta puede constituir la base fundamental que explique, al menos parcialmente, los déficits comportamentales observados en los ratones carentes de este receptor. Como se ha mencionado anteriormente, las numerosas alteraciones estructurales y funcionales presentes en el hipocampo de ratones nulos para el LPA₁ (Roberts et ál., 2005; Cunningham et ál., 2006; Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011a; Musazzi et ál., 2011; Blanco et ál., 2012; Castilla-Ortega et ál., 2012; Pedraza et ál., 2013, Tabla 4), podrían estar contribuyendo a los déficits conductuales descritos.

DÉFICITS	DESCRIPCIÓN
Sistema serotorinérgico	Disminución de HT-5 en corteza, hipocampo, hipotálamo y núcleo accumbens (Harrison et ál., 2003)
	Incremento de HT-5 en el estriado (Harrison et ál., 2003)
Sistema GABAérgico	Menor liberación de GABA (Roberts et ál., 2005)
	Menor número de neuronas GABAérgicas en hipocampo (Cunnigham et ál., 2006) y en amígdala (Pedraza et ál., 2013)
A nivel sináptico	Desregulación de las subunidades α y β de CaMKII (Musazzi et ál., 2011)
	Acumulación de proteínas SNARE a nivel presináptico (Lisma et ál., 2002)
	Cambios en los receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA y AMPA (Lisma et ál., 2002)
Factores de crecimiento	Reducción de los factores de crecimiento (Matas-Rico et ál., 2008)
Oscilación cerebral	Reducción de las oscilaciones de frecuencias alta en las capas superficiales de la corteza entorrinal (Cunnigham et ál., 2006)

DÉFICITS	DESCRIPCIÓN
Alteración de reflejos motores	Fuerza neuromuscular disminuida (Santín et ál., 2009)
	Equilibrio alterado moderadamente (Santín et ál., 2009)
	Reflejo de <i>grasping</i> alterado (Santín et ál., 2009)
Inhibición prepulso	No inhiben el reflejo de sobresalto ante un tono tras haberse presentado un tono previo (Harrison et ál., 2003)
Neurológicos	Déficit en olfacción (Contos et ál., 2000; Santín et ál., 2009)
	Somestesia (Santín et ál., 2009)
	Percepción de dolor neuropático (Inoue et ál., 2004)
	Reflejo de enderezamiento, funciones de la retina y audición preservadas (Santín et ál., 2009)
Reducción de la exploración	En contextos novedosos y familiares (Santín et ál., 2009)
Memoria espacial a largo plazo	Localización de la plataforma oculta en el laberinto acuático más lentamente. Menor empleo de estrategias espaciales en el último día y menor tiempo en el cuadrante que contenía la plataforma en el ensayo de recuerdo (24 horas después) (Santín et ál., 2009)
Incremento de la ansiedad	En contextos novedosos: mayor respuesta de ansiedad cuando son expuestos por primera vez a contextos ansiogénicos
	En contextos familiares: incremento de la respuesta de ansiedad. Déficit de habituación de la ansiedad (Santín et ál., 2009)
Memoria episódica	No son capaces de hacer la tarea correctamente
	Realización de tareas más simples (Castilla-Ortega et ál., 2012)
Miedo condicionado contextual	Afectación de la capacidad de extinguir la memoria del miedo condicionado (Pedraza et ál., 2013)

Tabla 4. Resumen de los déficits neuroquímicos, fisiológicos y conductuales presente en los ratones nulos para el receptor LPA_1 .

3.2 Moduladores farmacológicos: agonistas y antagonistas de los receptores de LPA

Por el papel que desempeñan no sólo en el desarrollo normal sino en numerosas patologías, la modulación farmacológica de los receptores de LPA resulta de un interés clínico evidente. Hasta la fecha, se han descrito diversos agonistas y antagonistas de los receptores de LPA (revisado en Choi et ál., 2010), dirigidos, principalmente, a los receptores LPA₁₋₃ aunque algunos experimentos recientes se han centrados en estudiar al receptor LPA₄ (Jiang et ál., 2007; Gajewiak et ál., 2008, Tabla 5). Sin embargo, estos compuestos no son específicos para uno solo receptor y serían necesarios, por tanto, el desarrollo de fármacos agonistas y antagonistas más selectivos para cada subtipo de receptores. Los primeros trabajos que empezaron a estudiar moléculas que actuaran como antagonistas para los receptores de LPA mostraron que el ácido N-palmitoil serina fosfato y el ácido N-palmitoil tirosina fosfato no presentaban agregación de plaquetas en humano pero bloqueaban la actividad del receptor LPA₁ en *Xenopus* (Sugiura et ál., 1994; Liliom et ál., 1996). Más tarde, ambas moléculas se describieron como agonistas parciales de los receptores de LPA en mamíferos (Hooks et ál., 1998; Durgam et ál., 2005). Otro grupo de investigación introdujo el ácido N-acil aminoetanol fosfórico como un potente agonista con propiedad de agregación de plaquetas (Sugiura et ál., 1994; Heise et ál., 2001). A partir de estos compuestos se fueron creando moléculas capaces de inhibir o incrementar las respuestas inducidas por el LPA endógeno a través de los receptores de LPA (Tabla 5).

La gran mayoría de los trabajos han basado la validación de los antagonistas en estudios in vitro, aunque hay algunos que sí lo han constatado en condiciones in vivo. Así, el antagonista AM966 para el LPA₁ ha mostrado eficacia, tras su administración oral, en la inhibición de la fibrosis de pulmón en un modelo de lesión con bleomicina (antibiótico que detiene el crecimiento de células cancerígenas) (Swaney et ál., 2010), y el antagonista para los receptores LPA_{1/3}, Ki16425, ha demostrado ser un buen reductor de la metástasis de cáncer de mama en un modelo de tumor de injerto óseo (Boucharaba et ál., 2006).

En la Tesis Doctoral que se presenta, se estudiará la inhibición, principalmente, del receptor LPA₁ en condiciones in vivo a través de los dos antagonistas que muestran mayor afinidad para este receptor: el VPC32183, (éster del (S)-ácido monofosfórico-(2-octadeca-9-enoilamino-3-[4-(piridina-2-ilmetoxy)-fenil]-propil) éster), y el Ki16425, 3-4-[4-([1-(2-clorofenil)

etoxi] carbonil amino)-3-metil-5-isoxazolil] benzilsulfonil) ácido propanóico. El VPC32183 es un antagonista selectivo que inhibe al receptor LPA₁ (K_i en rango 10-100 nM) y al LPA₃ (K_i = 106 nM) (Heasley et ál., 2004, Figura 10). El antagonista Ki16425 bloquea la acción del receptor LPA₁ (K_i = 340 nM), LPA₂ (K_i = 6500 nM) y LPA₃ (K_i = 930 nM) (Ohta et ál., 2003, Figura 10). En una revisión realizada por Im et ál. (2010) se describen valores que mantienen órdenes de inhibición y afinidad similares con determinaciones para VPC32183 de k_i = 109 nM para LPA₁, y K_i = 175 nM para LPA₃. En el mismo estudio, para Ki16425 muestra una K_i igual a 250 nM, 5600 nM y 360 nM, para los receptores LPA₁, LPA₂ y LPA₃, respectivamente. La inhibición de los receptores de LPA (LPA₁₋₃) por parte de estos dos antagonistas tiene diferentes consecuencias a nivel celular, inhibiendo, lógicamente, las respuestas celulares inducidas por LPA, entre otras, la disminución del flujo de calcio intercelular inducida por LPA (Ohta et ál., 2003; Dubin et ál., 2010; David et ál., 2012; Shin et ál., 2012), la inhibición de la respuesta de retracción de neuritas (Sato et ál., 2005) o la inhibición de la migración celular (Kim et ál., 2008; David et ál., 2012).

Por otra parte, nuestro estudio también contempla la administración central de moléculas agonistas para el receptor LPA₁. El agonista más usado en la mayor parte de los trabajos publicados hasta la fecha es el oleil-LPA (18:1, 1-oleoil-2-hidroxi-*sn*-glicerol-3-fosfato) en su forma de sal sódica, o bien modificaciones estables de la misma, menos lábiles, como la que se usa en este trabajo. Este agonista presenta una mayor afinidad por el LPA₁ respecto al resto, mostrando una concentración de eficacia media (CE₅₀) de 11,7 nM (Heise et ál., 2001, 1-10 nM según Choi et ál., 2010) y una eficacia máxima (E_{max}) de 100 nM, aunque también se une a los demás receptores pero con menor afinidad, en el orden de 10-100 nM (Choi et ál., 2010, Tabla 5).

COMPUESTO	LPA ₁	LPA ₂	LPA ₃	LPA ₄	LPA ₅	LPA ₆
Agonistas						
LPA (18:1)	++++	+++	+++	+++	+++	+
T15	++++		+++			
Oleoyl-tiofosfato	++	++	++			
Antagonistas						
DGPP 8:0	+/-	-	++			
VPC12249	++		++			
Ki16425	++	+/-	++		-	
VPC32183	+++		++			
Farnesil difosfato		+	++	+	++++ (agonista)	

Tabla 5. Lista de algunos agonistas y antagonistas actuales para los receptores del LPA. Se representa los valores de EC₅₀, IC₅₀ y/o Ki siendo +++++ < 1-10 nM; +++ 10-100 nM; ++ 100-1000 nM; + 1000-5000 nM; +/- > 5000 nM; - ninguna actividad. Tabla modificada de Choi y Chun, 2013.

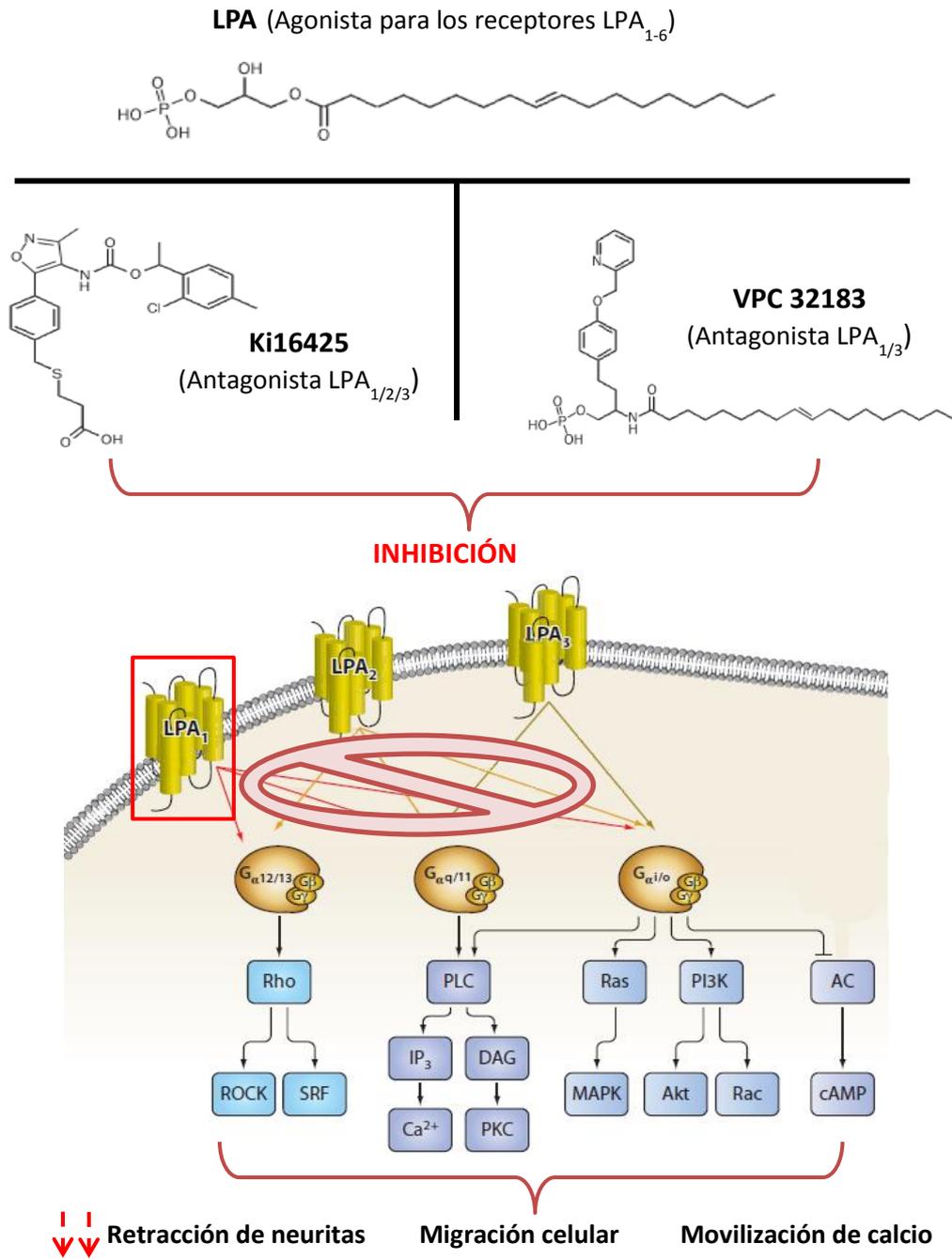


Figura 10. Estructura química del agonista (oleil-LPA) y los antagonistas (Ki16425 y VPC32183) de los receptores LPA. Los antagonistas Ki16425 y VPC32183 bloquean la acción de los receptores LPA₁₋₃ (con mayor inhibición para el LPA₁) causando la retracción de neuritas (Sato et ál., 2005), inhibiendo la movilización de calcio intercelular (Shin et ál., 2012; David et ál., 2012; Dubin et ál., 2010) y la migración celular (David et ál., 2012; Kyoung-Kim e tal., 2008). El agonista oleil-LPA activa las respuestas intracelulares de los receptores LPA₁₋₆, si bien muestra la mayor afinidad para el LPA₁, CE₅₀ = 11,7 nM y E_{max} = 100 nM (Heise et ál., 2001). Figura de los receptores de LPA adaptada de Choi et ál., 2010.

Capítulo II:

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Cada vez más disponemos de grandes estudios sobre el papel del ácido lisofosfatídico (LPA) en los procesos celulares (proliferación, migración, diferenciación celular, entre otros) y en numerosas patologías (aterosclerosis, cáncer, fibrosis renal o neuropatológicas como la hidrocefalia fetal, dolor neuropático, daño cerebral por trauma, esquizofrenia). El LPA actúa a través de receptores acoplados a proteínas G (LPA₁₋₆) activando diferentes rutas de señalización internas. En las últimas décadas, se ha demostrado que la ausencia del receptor LPA₁, en concreto, da lugar a ciertas anomalías en la estructura y plasticidad del hipocampo y de la amígdala. Esto es así ya que, en animales carentes de este receptor, presentan alteraciones en sistemas neuronales principales, como el sistema serotoninérgico, glutamatérgico y GABAérgico, aparte de mostrar reducción de las oscilaciones de las frecuencias altas en las capas superficiales de la corteza entorrinal. Como consecuencia, los efectos directos a estas alteraciones funcionales del hipocampo, principalmente, dan lugar a cambios conductuales que dependen de esta región, tales como la consolidación de la memoria a largo plazo, las respuestas de tipo ansiosas, o la actividad exploratoria. Los estudios desarrollados en los últimos años por nuestro grupo de investigación, han demostrado el papel que el receptor LPA₁ desempeña la neurogénesis en desarrollo y la hipocampal adulta, además de su importancia para formar memorias relacionales dependientes del hipocampo y su participación en la emocionalidad y la extinción de la respuesta de miedo.

Con la información obtenida hasta el momento tenemos base suficiente como para abordar, en un paso más, el desarrollo de herramientas que nos permitan profundizar en los mecanismos de actuación del receptor LPA₁, y, a su vez, modular y regular los defectos observados a objeto de validar terapias efectivas para nuestro modelo experimental con clara orientación, en última instancia, a la patología, en clínica.

Las terapias celulares o los tratamientos farmacológicos están dirigidas a mejorar la calidad de vida de aquellos individuos que padecen de algunas patologías. Por tanto, basándonos en estas técnicas se planteó como primera hipótesis que la modulación farmacológica del receptor LPA₁ es capaz de influir en los parámetros neurológicos afectados por la ausencia del receptor, demostrando con ello su participación específica. Así, la

modulación farmacológica en condiciones in vivo a través de dos antagonistas (VPC 32183 y Ki16425) y un agonista (LPA c18:1). Con ello, se confirmará el papel del LPA₁ en los procesos de proliferación celular en la zona subgranular y subventricular, y diferenciación de las nuevas neuronas en el giro dentado, así como en la muerte celular y en la actividad neuronal. Además, a nivel conductual la administración farmacológica modulará el comportamiento emocional y los procesos de aprendizaje y memoria dependientes de la actividad del receptor. Como segunda hipótesis planteamos que la terapia celular con precursores de interneuronas GABAérgicas representa un tratamiento adecuado para restuarar el entorno neural deficitario del ratón carente del receptor LPA₁ y, con ello, generar una mejora de respuesta conductual. Planteamos, por tanto, que el trasplante de precursores de interneuronas GABAérgicas derivados de la eminencia ganglionar medial deberá restaurar el circuito neuronal hipocampal en los ratones nulos para el LPA₁ repercutiendo, con ello, a nivel conductual, lo que conllevará a una mejora de los parámetros de conducta evaluados, entre ellos los asociados a ansiedad, reduciendo las respuestas de tipo ansiosas.

Para demostrar estas dos hipótesis, se dividirá por objetivos que se corresponderá con cada bloque experimental de esta Tesis Doctoral.

1. **Primer bloque experimental:** Estudiar el papel del receptor LPA₁ en animales normales administrados con antagonistas y agonista del mismo para:
 - a) Determinar el efecto sobre el proceso de neurogénesis hipocampal y en la zona subventricular y verificar si el receptor LPA₁ es un factor decisivo en la regulación de la misma.
 - b) Determinar la muerte neuronal en los diferentes ambientes.
 - c) Determinar la actividad neuronal a través de la expresión de la proteína c-Fos en el hipocampo.
 - d) Determinar la expresión del receptor LPA₁ y la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina.
 - e) Estudiar la conducta bajo condiciones de bloqueo permanente del receptor LPA₁.
 - f) Estudiar la conducta bajo condiciones de sobreexposición del LPA exógeno.

2. **Segundo bloque experimental:** Estudiar el efecto del trasplante de precursores de interneuronas GABAérgicas en animales normales y carentes del receptor LPA₁. Se evaluará las consecuencias del trasplante para:
- a) Determinar la supervivencia celular de las células trasplantadas en ambos genotipos.
 - b) Determinar la diferenciación de los precursores neuronales trasplantados a interneuronas GABAérgicas maduras.
 - c) Comparar el efecto del nicho hipocampal de los ratones normales y los ratones carente del receptor LPA₁.
 - d) Determinar el efecto de las nuevas interneuronas maduras, como nueva fuente de GABA, sobre la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo.
 - e) Estudiar la consecuencia del trasplante sobre la conducta emocional (ansiedad y depresión) y sobre la coordinación motora.

Capítulo III:

**MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DEL
RECEPTOR LPA₁: IMPLICACIONES
CONDUCTUALES Y NEUROGÉNICAS
HIPOCAMPALES**

INTRODUCCIÓN

El ácido lisofosfatídico (LPA), a través de los receptores de LPA (LPA₁₋₆), actúa en multitud de procesos biológicos vitales. Sin embargo, más allá de estas funciones, la presencia de receptores de LPA en una amplia variedad de tejidos le confiere una especial importancia fisiopatológica. Así, como se ha mencionado en la introducción, son numerosos los estudios que relacionan de manera extensiva la vía de señalización mediada por el LPA con diversas enfermedades tales como el cáncer (revisado en Willier et ál., 2013), la aterosclerosis (revisado en Schober y Siess, 2012), la obesidad (Rancoule et ál., 2014), la pérdida del cabello (Pasternack et ál., 2008; Inoue et ál., 2011), la fibrosis pulmonar (Shea y Tager, 2012) o la fibrosis renal (Pradere et ál., 2007), entre otras. A nivel neural, se ha descrito su participación en el dolor neuropático (Inoue et ál., 2004; Ueda et ál., 2013), el desarrollo de hidrocefalia en el feto (Yung et ál., 2011), las alteraciones morfológicas inducidas por hipoxia fetal (Herr et ál., 2011), el daño cerebral por trauma (Frugier et ál., 2011), el infarto cerebral (Li et ál., 2010) y la enfermedad de Alzheimer (Umemura et ál., 2006). También, se le ha vinculado con enfermedades psicopatológicas que presentan un origen en el neurodesarrollo como es el autismo o la esquizofrenia (Bowden et ál., 2006; revisado en Estivill-Torrús et ál., 2013). Desde las últimas décadas, la búsqueda de antagonistas selectivos para los receptores de LPA está teniendo mayor interés por sus implicaciones en el neurodesarrollo y en los procesos cognitivos. De esta manera, se podrían estudiar mejor tanto los mecanismos de acción de los diferentes receptores de LPA, como también, su modulación en situaciones patológicas, a objeto de valorar su relevancia como nuevas dianas terapéuticas.

La ausencia del receptor LPA₁ presenta grandes complicaciones tanto a nivel fisiológico como a nivel cognitivo. Nuestro grupo de investigación ha estado estudiando en esta última década, el fenotipo conductual y neuroquímico de la variante *Málaga* de los ratones carentes del receptor LPA₁ (Estivill-Torrús et ál., 2008; Matas-Rico et ál., 2008; Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010; 2011a; 2012; Blanco et ál., 2012; García-Fernandez et ál., 2012; Pedraza et ál., 2013, para más detalle, ver el capítulo introductorio y la Tabla 4). Todos estos estudios han sido realizados, principalmente, mediante el uso del modelo animal nulo para el

receptor LPA₁. Sin embargo, el complejo fenotipo mostrado por el animal nulo dificulta valorar el peso que, sobre numerosos defectos en el adulto, puede representar un desarrollo anómalo. Los estudios de nuestro grupo en esta década han sido exhaustivos y demuestran específicamente la implicación de este receptor en las funciones neuronales adultas. No obstante, a objeto de su aplicación en aproximaciones terapéuticas, contar con herramientas adicionales que permitan no sólo corroborar lo observado, sino la modulación de la señal en estados neuropatológicos, es una necesidad.

Hasta la fecha, nuestro grupo de investigación ha demostrado el papel del receptor LPA₁ en funciones cognitivas y emocionales, así como en la neurogénesis adulta asociada a estos procesos, además de trabajar con moduladores externos (estrés, ejercicio o enriquecimiento) que actúan reprimiendo o reforzando, según se tratara, el sistema. En este contexto actúa la vía de señalización por LPA, a demanda de la necesaria plasticidad cerebral (ver introducción). De particular interés ha sido el estudio de su papel en los mecanismos de estrés, habida cuenta de que representa una vía muy próxima, por la similitud de respuesta cerebral que desencadena, a los procesos depresivos, además de favorecerlos (Lloyd et ál., 1980, Folkman y Lazarus, 1986, Jayatissa et ál., 2006).

Por todo ello, el objetivo de parte del trabajo experimental mostrado en esta Tesis no fue repetir los estudios de neurogénesis y conductuales realizados sobre el animal nulo porque, de hecho, son varios los autores que han trabajado ya en ese sentido a nivel farmacológico y además, el ratón nulo para el receptor LPA₁ permite una especificidad funcional muy determinante. El objetivo fue ver si, con las funciones en neurogénesis y conducta que ya hemos atribuido al receptor LPA₁, podemos avanzar un paso más y modularlas mediante el uso de fármacos reguladores, utilizando administración farmacológica continuada, seguida de análisis histológico y de nuevos estudios que permitan observar su conducta en relación a la ansiedad, la actividad exploratoria, la actividad locomotora, la memoria de trabajo o la conducta de afrontamiento pasivo o activo del animal, utilizando diferentes pruebas de comportamiento.

Por ello, en nuestro caso, se han administrado de manera crónica los antagonistas, VPC 32183 y Ki16425 (para más información sobre su capacidad inhibitoria para cada receptor, ver el capítulo introductorio) a fin de bloquear los receptores LPA. Este antagonismo

supone transformar un entorno neural normal en otro en el que no tener lugar la activación de las proteínas G acopladas a estos receptores: G_{α12/13}, G_{αi/0}, G_{αq/11} (Choi et ál., 2010), causando, por ello, una inhibición de las respuestas habituales cerebrales mediadas por los receptores LPA₁₋₃. Así, este antagonismo generaría, cuanto menos, una disminución del flujo de calcio intercelular inducida por LPA (Dubin et ál., 2010; David et ál., 2012; Shin et ál., 2012), una inhibición de las respuestas de retracción de las neuritas (Sato et ál., 2005) y una disminución de la migración celular (Kim e tal., 2008; David et ál., 2012). Igualmente, se analizaron los efectos de la administración de un agonista del mismo receptor. Para ello se usó una molécula similar al oleil-LPA, el oleil-LPA c18:1, que consta de una modificación de estructura éster a éter a objeto de dotarle de propiedades no hidrolizables, evitando su pronta degradación y permitiendo así su disponibilidad en un medio durante un tiempo mayor, lo cual la hizo más adecuada para su administración crónica.

La administración de los fármacos se llevó a cabo mediante la utilización de minibombas osmóticas Alzet® que liberaron de manera estable los fármacos mencionados. El efecto se valoró a diferentes niveles. Por una parte, se analizó su influencia en, la conducta a través de tres pruebas de comportamiento, realizadas a tiempo final de la administración crónica: campo abierto, laberinto en Y y test de natación forzada. La prueba de campo abierto permitió analizar las respuestas exploratorias y la locomoción, así como las conductas relacionadas con la ansiedad (Simon et ál., 1994; Crawley, 1999; Prut y Belzung, 2003; Lamprea et ál., 2008), la prueba de laberinto en Y se usó para estudiar la memoria de trabajo (Olton y Papas, 197; Mamiya y Ukai, 2001), y por último, en la prueba de natación forzada se analizaron las conductas de afrontamiento pasivo y activo que pueden estar asociadas con conductas depresivas (Cryan et ál., 2002a; Cryan et ál., 2002b; Mazarati y Wasterlain, 2002). También, a fin de establecer las posibles correlaciones de las respuestas comportamentales con los procesos de génesis neuronal, y con las áreas activas por el tratamiento farmacológico, se analizaron el efecto de los diferentes tratamientos sobre el proceso neurogénico en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y en la zona subventricular, así como la expresión de genes de activación temprana, a tiempo final del tratamiento. De manera rutinaria y a objeto de destacar factores asociados al propio procedimiento de la administración, se estudió si ésta podría ocasionar un proceso inflamatorio mantenido en la zona de implantación de las minibombas osmóticas Alzet®.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales

Para realizar el primer estudio de esta Tesis Doctoral, se utilizaron ratones derivados por retrocruzamiento (12 generaciones) de la cepa B6129SF2/J (www.jax.org) sobre el fondo mixto genético 129/c57. Estos animales proceden del cruce de hembras C57BL/6J con machos 129S1/SyImJ, siendo, tras retrocruzamiento, el control más aproximado al fondo mixto sobre el que se obtuvieron los ratones *Málaga* nulos para el receptor LPA₁. De esta manera se evitó la posibilidad de que el tratamiento farmacológico estuviera influido por un fondo genético/cepa diferente al del ratón nulo, permitiendo así la comparación de los resultados entre el antagonismo del receptor y su correspondiente nulo.

Se emplearon 54 animales, machos, con 3 meses de edad al inicio del experimento. Se dividieron al azar en 5 grupos experimentales: grupo control (vehículo) (n = 11); grupo antagonista VPC 32183 (n = 11), grupo antagonista Ki16425 (n = 11) y grupo agonista c18:1 LPA a dos concentraciones diferentes (n = 11 para LPA a 20 nM; n = 10 para LPA a 200 nM). Los animales se estabularon en condiciones estándar, con acceso libre a comida y bebida, y con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (encendido de las luces a las 7:00 h). Tras la cirugía, los ratones se estabularon individualmente y durante los cuatro días anteriores al análisis conductual se manipularon durante 5 minutos al día en la habitación experimental, para adaptarse a las condiciones de las tareas. La evaluación del comportamiento se realizó entre las 9:00 y las 12:00 en una habitación con 300 lux de intensidad lumínica. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Málaga (CEUMA: 2012-0006-A; 2012-0007-A) y de acuerdo la normativa legal vigente: Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (B.O.E. de 8 Noviembre de 2007), así como la Ley 9/2003, de 25 de abril (B.O.E. de 26 de abril de 2003), el Real Decreto 178/2004, de 30 de enero (B.O.E. de 31 de enero de 2004), y el Decreto 320/2010 (B.O.J.A. de 16 de julio

de 2010) en relación al uso de organismos modificados genéticamente, y la legislación en materia animal de acuerdo a las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea 2010/63/UE, 90/219/CEE, y Regulación (EC)nº1946/2003.

2.2 Tratamiento farmacológico crónico

2.2.1 Fármacos

Para realizar la dilución de los fármacos se utilizó como vehículo una solución de albúmina bovina sérica libre de ácidos (Sigma-Aldric Química S.L., Madrid; en adelante, Sigma-Aldrich), a una concentración final del 3 % en suero fisiológico. En el grupo control, a los animales se les administró únicamente el vehículo. Para actuar sobre el receptor LPA₁ se usaron los siguientes fármacos:

- a) Antagonista VPC 32183, (éster del (S)-ácido monofosfórico-(2-octadeca-9-enoilamino-3-[4-(piridina-2-ilmetoxi)-fenil]-propil), (Avanti® Polar Lipids Inc.; Alabaster, Alabama; Estados Unidos). Se administró a una concentración final de 20 nM. Se utilizó esta concentración debido a que su constante de inhibición (K_i) para el receptor LPA₁ está alrededor de los (10-100) nM, en un orden de diez veces mayor afinidad respecto al receptor LPA₃, en cuyo caso habría que trabajar con concentraciones de (100-1000) nM (Heasley et ál., 2004; Im et ál., 2010; Mirendil et ál., 2013).
- b) Antagonista Ki16425, 3-4-[4-([1-(2-clorofenil) etoxi] carbonil amino)-3-metil-5-isoxazolil] benzilsulfonil] ácido propanóico (Selleck Chemicals LLC, Houston, Texas, Estados Unidos). Se usó a una concentración final de 400 nM, próxima a su K_i para el receptor LPA₁ (K_i = 340 nM, Ohta et ál., 2003).
- c) c18:1 LPA ó 1-O-9-(Z)-octadecenil-*sn*-glicero-3-fosfato (en forma de sal amónica) (Avanti® Polar Lipids Inc.; Alabaster, Alabama; Estados Unidos). Se trata de un éter oleil-LPA estable, no hidrolizable y, al igual que el oleil-LPA, es insaturado de 18 átomos de carbono en su cadena y enlace doble en la posición 9 en configuración *cis*. Se utilizó a dos concentraciones, 20 nM, la cual estaba más cercana a la concentración de eficacia media (CE₅₀) del oleil-LPA para el receptor LPA₁ (CE₅₀ = 11,7 nM, Heise et ál.,

2001; Choi et ál., 2010) y a 200 nM, 10 veces superior a dicha CE₅₀ (Tabla 6). Para simplificar la nomenclatura y evitar repetir la especie molecular concreta de LPA, se mencionará en adelante en el texto como LPA.

2.2.2 Minibombas osmóticas Alzet®

Para administrar por vía intracerebroventricular los fármacos a los animales, y hacerlo de manera continua, fiable, controlada y constante durante la duración del experimento, se recurrió al uso de minibombas osmóticas Alzet® modelo 1004 (Durect Corporation, Cupertino, California, Estados Unidos). Estos aparatos son unas bombas osmóticas de tamaño muy pequeño que se utilizan para la administración sistémica que se implantan bien por vía subcutánea, bien por vía intraperitoneal, pudiendo estar unidas a un catéter para la infusión intravenosa, intracerebral o intraarterial. Una vez implantada la minibomba en el animal, la administración se realiza de manera automática, lo que evita recurrir a programas de inyección repetidos, minimizando el estrés de los animales debido a dichas manipulaciones o a dosificaciones periódicas.

El funcionamiento de las minibombas consiste en crear una diferencia de presión osmótica entre una capa de la bomba, llamada capa osmótica, y el medio del tejido donde estará implantada en el animal. Esta diferencia hace que haya una alta osmolaridad en la capa osmótica haciendo que el agua fluya a través de la membrana semipermeable, que es la capa exterior de la bomba. A medida que va entrando el agua en la capa osmótica, se va comprimiendo el reservorio flexible (en el que previamente se habrá colocado la solución del fármaco) desplazando la solución por el tubo moderador de flujo, con una velocidad controlada y predeterminada según el modelo de la minibomba Alzet® (para más información visitar la página web www.alzet.com, Figura 11).

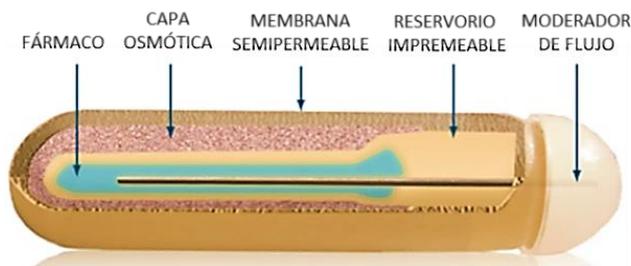


Figura 11. Representación de las partes que componen la minibomba osmótica Alzet®.

Gracias a la diferencia de presión osmótica entre el interior de la minibomba y el lugar donde está implantado en el animal, se genera de manera automática, el flujo constante y controlado de los fármacos.

La velocidad de flujo está controlada por la permeabilidad del agua a través de la membrana exterior semipermeable. Por tanto, el flujo es constante e independiente del fármaco, u otras sustancias que se quiera administrar. La velocidad de flujo viene establecida por los fabricantes y en el caso del modelo 1004, la velocidad está fijada en 0,11 µl/h durante 28 días. En cuanto a las dimensiones de la minibomba, ésta mide 1,5 cm de longitud, mostrando un diámetro de 0,6 cm, un peso (vacío) de 0,4 g y un volumen total de 500 µl. En nuestros experimentos, el volumen total administrado en el animal fue de 55,44 µl ((0.11 µl/h x 24h) x 21 días de tratamiento) y la dosis que se administró al día se expresó en µg de sustancia por Kg de peso animal por día, calculándola a partir de la siguiente fórmula:

Dosis del fármaco (µg/Kg/día) = (concentración del fármaco (mol/l) x peso molecular del fármaco (g/mol) x volumen administrado (l/h)) x 24 h/día x peso medio del ratón (Kg)

Las dosis usadas para cada fármaco se detallan en la tabla 6.

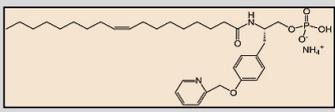
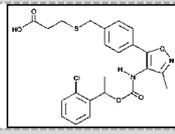
FÁRMACOS	CONCENTRACIÓN [nM]	DOSIS (µg/kg/día)	Ki [nM]	CE ₅₀ [nM]	ESTRUCTURA QUÍMICA
VPC32813	20	1,3 x 10 ⁻⁴	LPA ₁ ~10-100 LPA ₃ = 106 (Im et al., 2010; Choi y Chun, 2013)		
Ki16425	400	20 x 10 ⁻³	LPA ₁ = 340 LPA ₂ = 6500 LPA ₃ = 930 (Otha et al., 2003)		
c18:1 LPA	20	9,28 x 10 ⁻⁴		11,7 (Heise et al., 2001; Choi et al., 2010)	
	200	9,28 x 10 ⁻³			

Tabla 6. Resumen de los fármacos utilizados en las minibombas osmóticas Alzet® durante los 21 días de tratamiento. La tabla recoge las concentraciones y la dosis administrada al día para cada fármaco, la constante de inhibición (Ki) para los antagonistas VPC 32183 y Ki16425, y la concentración de eficacia media (CE₅₀) para el agonista c18:1 LPA. En todos los casos se utilizó una solución de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 3 % en suero fisiológico.

Las minibombas osmóticas Alzet® se prepararon y activaron en condiciones de esterilidad 48 h antes de su implantación. Los pasos fueron los siguientes:

1. Se colocaron 3 espaciadores (0,5 mm de grosor cada uno) en la aguja de la cánula de infusión cerebral (5 mm de longitud) para situar ésta a la altura del ventrículo lateral del animal (3,5 mm de profundidad). Los espaciadores, una vez colocados en la aguja, se pegaron con pegamento de contacto rápido Loctite® para evitar que se obstruyese la entrada de la aguja (Figura 12).
2. Se cortó un fragmento de tubo colector de, aproximadamente 3 cm, que se unió a la cánula de infusión cerebral y al tubo del moderador de flujo (es el tubo que une la minibomba osmótica con la parte de la cánula de infusión cerebral). Tras este paso, se llenó la minibomba con la solución del fármaco, empleando, para ello, la aguja suministrada en el kit y evitando las burbujas para no obstruir el sistema.
3. Posteriormente, se procedió a llenar la minibomba osmótica con la solución del fármaco utilizando la misma jeringuilla (evitando siempre las burbujas), hasta que la solución

rebotó por el orificio de la minibomba. Con cuidado, se ensambló la parte de la cánula de infusión cerebral con la minibomba.

- Una vez preparado, se sumergió el sistema de la minibomba a excepción de la cánula de infusión cerebral en un tubo de centrífuga de 50 ml con solución salina de cloruro sódico al 0,9 % estéril dejándolo incubar en una estufa a 37°C durante 48 h previamente a la cirugía.

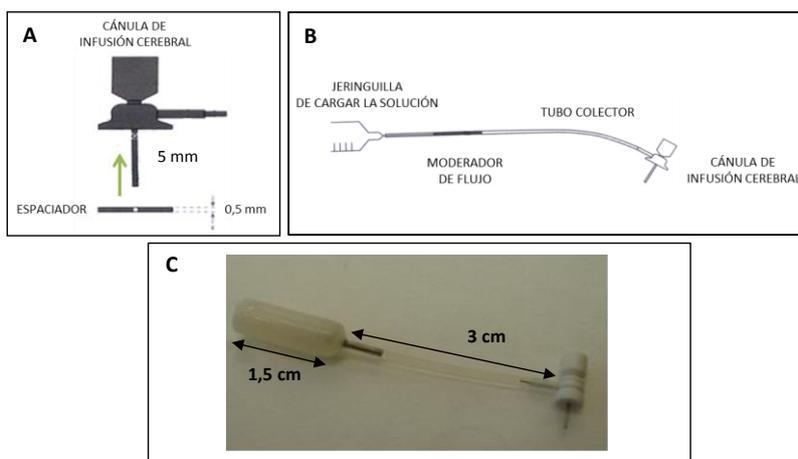


Figura 12. Representación de los pasos a seguir para montar las minibombas osmóticas Alzet®. (1) En primer lugar, se deben colocar los espaciadores en la cánula de infusión cerebral para conseguir la longitud necesaria para acceder a la zona de interés. (2) En segundo lugar, se deben montar el tubo colector conectándolo a la cánula de infusión cerebral y al tubo del moderador de flujo para llenar con la solución del fármaco. (3) Por último, se carga la minibomba con la solución y se ensamblan las dos partes.

2.2.3 Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo durante 21 días. El primer día consistió en la implantación de las minibombas osmóticas Alzet® a los animales, y los días 17, 18, 19, y 20 se administró 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU) a fin de valorar posteriormente los procesos proliferativos. El día 21 se llevaron a cabo las pruebas de comportamiento, en el siguiente orden de menor a mayor estrés causado al animal: campo abierto, laberinto en Y y test de natación forzada. Tras la última prueba se procedió en un grupo de animales, a la perfusión

daño en la piel. Se limpió bien la zona con suero fisiológico, y se hizo una pequeña incisión con la cuchilla limpiando con suero fisiológico de nuevo.

Posteriormente, se localizó el punto de referencia Bregma para calcular las coordenadas ICV de implantación de la cánula de infusión cerebral (Figura 14). Con la ayuda de un puntero, de la misma longitud que la aguja de la cánula, se perforó, girando lentamente, el cráneo del animal. Se limpió bien la zona con suero fisiológico y se procedió a abrir la región medioescapular de la parte superior de la región torácica del ratón, en su espalda, para alojar la minibomba. Las minibombas osmóticas siempre quedaron colocadas en la región izquierda del animal para evitar que la posición de la misma pudiera influir en las pruebas de comportamiento. Por último, se procedió a colocar la aguja de la cánula en el orificio realizado en el cráneo con cuidado de no dañar las zonas internas del cerebro. El sistema de inyección (aguja con los separadores) se fijó al cráneo mediante el uso de pegamento de contacto rápido Loctite® teniendo precaución de no dañar los ojos del ratón. Una vez pegado, se cerró la herida con 3 puntos de sutura. Tras la cirugía, los ratones se mantuvieron debajo de una lámpara de luz roja para que no perdieran su temperatura corporal hasta recuperarse y, una vez que se despertaron, fueron trasladados y colocados individualmente en sus jaulas (Figura 15).

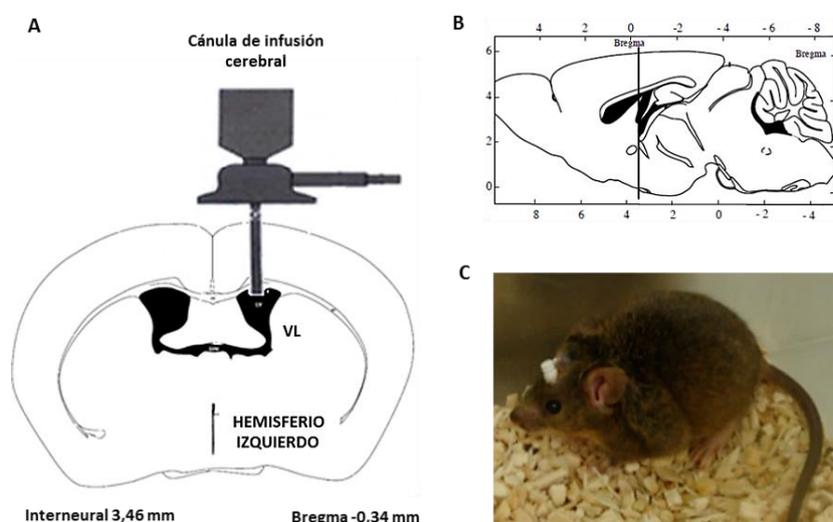


Figura 14. Implantación de la minibomba osmótica Alzet®. (A) La zona de la implantación de la minibomba corresponde a las coordenadas de -0,34 mm anteroposterior, +1 mm lateral y +2,3 mm de profundidad, con respecto a Bregma, para alcanzar el ventrículo lateral (VL) del hemisferio izquierdo. (B) Corte sagital del cerebro del ratón que representa la sección coronal en el punto de -0,34 mm de Bregma. (C) Imagen de un ratón con el sistema de la minibomba osmótica implantada en el hemisferio

izquierdo quedando la minibomba en la parte superior izquierda de la región torácica.



Figura 15. Imágenes representativas de los pasos del protocolo de cirugía con el aparato estereotáxico. En orden numérico temporal se muestran los pasos importantes de la cirugía para implantar las minibombas osmóticas Alzet® para administración ICV en el hemisferio cerebral izquierdo de los animales.

2.2.3.1 Administración de BrdU

La bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma-Aldrich) se administró intraperitonealmente durante 4 días consecutivos, inyectándose una dosis diaria, según peso del animal, de 75 mg/Kg de BrdU, disuelta en suero fisiológico durante los días 17, 18 y 19, y 3 dosis adicionales durante el día 21. La BrdU es un análogo del nucleótido timidina que se incorpora en el ADN nuclear durante la fase S del ciclo celular y que se mantiene en el ADN de las células hijas, permitiendo su detección y estudio, características éstas que la han convertido en una herramienta imprescindible y ampliamente usada a la hora de estudiar el marcaje y seguimiento de las poblaciones proliferantes en los estudios de neurogénesis (Taupin, 2007). Para estudiar el impacto de la administración farmacológica sobre la proliferación celular, la administración de BrdU coincidió con los 4 últimos días del tratamiento. La perfusión vascular y fijación, previa a la obtención de los órganos de interés, tuvo lugar al día siguiente de la última administración de BrdU (Figura 13).

2.3 Pruebas de comportamiento

Para analizar el efecto de la administración crónica de los fármacos (vehículo, VPC 32183, Ki16425 y LPA) en conducta se optó por una serie de baterías de comportamiento experimentales que permitieran observar el efecto en conductas relacionadas con la ansiedad, la actividad exploratoria, la actividad locomotora, la memoria de trabajo o la conducta de afrontamiento pasivo o activo del animal. Se realizaron las pruebas de comportamiento en orden de menor a mayor estrés causado al animal, siendo éstas, campo abierto, laberinto en Y y test de natación forzada dejando pasar siempre media hora entre la exposición a cada una de ellas.

Como se ha citado anteriormente, durante los cuatro días anteriores al análisis conductual se manipularon durante 5 minutos al día en la habituación experimental, para adaptarse a las condiciones de las tareas. Cada grupo experimental estuvo formado por: control: 11 animales; VPC 32183: 11 animales; Ki16425: 11 animales; LPA 20 nM: 11 animales; LPA 200 nM: 10 animales.

2.3.1 Campo abierto

Desde que Hall (1934) originalmente describiera el campo abierto para el estudio de la emocionalidad en ratas, ésta se ha convertido en una prueba de comportamiento de referencia en prácticamente todos los estudios de comportamiento que se realizan. La prueba consiste en la exposición repentina del animal a un área abierta, generalmente cuadrada, bien iluminada, y rodeada de paredes verticales y utiliza, como base, el comportamiento innato de los roedores tanto a explorar ambientes novedosos como a permanecer al resguardo de entornos abiertos. En sí, la prueba causa una confrontación forzada a un contexto nuevo para el animal, el cual, tiende, en condiciones normales, a permanecer en la zona de la periferia respecto a la zona central, que es una zona abierta, donde la exposición sin poder resguardarse de posibles peligros le provocará temor y mayor estrés. Al tiempo que permanece el animal en la periferia del campo abierto o área de la prueba, se le denomina tigmotaxis, siendo el incremento de la tigmotaxis indicador de angustia; por el contrario, el aumento de tiempo de permanencia en dicha zona o bien la disminución de la latencia de entrada a la zona central son indicadores, generalmente, de ansiólisis. Se ha propuesto el

campo abierto, por ello, como una buena prueba para el estudio de la conducta relacionada con la ansiedad, aunque también con la actividad exploratoria, la locomoción y la sedación (Prut y Belzung, 2003). De hecho, el comportamiento relacionado con la ansiedad en el campo abierto es provocado por dos factores: por ser un test individual y por la agorafobia que se genera (debido a que el área donde se realiza el test es de mayor tamaño en relación al área de entorno del roedor en condiciones de estabulación) (Prut y Belzung, 2003).

Para nuestro estudio se utilizó una pista de prueba o un campo cuadrado fabricado en madera y de medidas (50 x 50 x 38) cm (Figura 16). Los animales se colocaron en el centro del campo y su conducta fue grabada por una cámara digital durante 5 minutos. Para el análisis de las variables de la actividad locomotora (distancia recorrida y velocidad media) y del tiempo que permanecieron en el centro, se utilizó un sistema informático de análisis de imagen (Ethovision XT 5.0, Noldus Information Technology, Waningen, Países Bajos). Las conductas de valoración del riesgo (consistente en que el ratón estira su cabeza y patas delanteras hacia delante volviendo a su postura inicial sin que se de locomoción de sus patas traseras; medida en nº/min), acicalamiento o *grooming* (la acción en la que el ratón se lame o su piel o su cola; medida en nº/min), la defecación (medida como número de defecaciones en la pista al terminar el ensayo) y la exploración alzada o *rearing* (acción por la que el ratón se sostiene sobre sus patas traseras, alzándose, mientras que las delanteras pueden estar apoyadas o no en las paredes; medida en nº/min) fueron cuantificadas observacionalmente (se detalla más información sobre las conductas en la tabla 7). Para cuantificar el tiempo de permanencia en el centro de la pista, mediante el programa informático Ethovision XT 5.0 se dividió el campo abierto en 2 cuadrados, uno, que correspondería a la zona externa (separado a 8,3 cm de las paredes) y otro en la zona interna (a 8,3 cm del otro rectángulo). Al finalizar con el ensayo realizado a cada ratón, la pista se limpiaba con una solución con etanol al 70 % y el ratón era devuelto a su jaula.

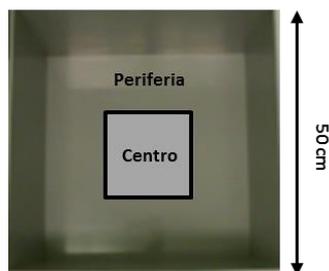


Figura 16. Imagen del campo abierto utilizado para el estudio de la conducta de tipo ansiosa.

Las medidas del campo abierto fueron 50 cm de lado por 38 cm de altura. Para analizar la tigmotaxis se dividió en 2 cuadrados con el programa Ethovision XT 5.0.

CONDUCTA	SIGNIFICADO
Locomoción	Es una medida de exploración del entorno. Suele ser elevada en ambientes nuevos y se reduce cuando el ambiente es conocido por el animal (Bothe et ál., 2004; Leussis y Bolivar, 2006).
Tigmotaxis	Es una frecuente medida de ansiedad que refleja la tendencia de los roedores a permanecer en la zona protegida por las paredes (periferia), por miedo a explorar el espacio abierto (Crawley, 1999; Simon et ál., 1994).
Exploración alzada	Se considera una medida de exploración y actividad general en el entorno, ya que el animal tiene una visión más completa del espacio al apoyarse en sus patas traseras. Sucede sobre todo en contextos nuevos y/o durante el aprendizaje espacial (p.ej. Es habitual la exploración vertical alzada sobre la plataforma del laberinto acuático, especialmente al principio de la tarea). Suele correlacionar con la locomoción (Fernandes et ál., 1999; Gross et ál., 2000; Lever et ál., 2006).
Valoración de riesgo	Es una conducta de defensa en la cual el animal valora la existencia de una amenaza. Sin embargo, también se ha relacionado con exploración, ansiedad y arousal (Ramos y Mormede et ál., 1998; Carola et ál., 2002; Carobrez y Bertoglio, 2005; Bertoglio et ál., 2006; Lever et ál., 2006).
Acicalamiento	Se considera una medida de ansiedad, en función de su frecuencia y de la secuencia de conductas que lo componen (Kalueff y Touhimaa, 2004). Sin embargo, también son muchos los trabajos que otorgan al acicalamiento un significado independiente, que relacionan con el aseo o el arousal (Carola et ál. 2002; Ohl et ál. 2002).
Defecación	Se considera una medida de ansiedad (Kalueff y Tuohimaa, 2004), pero se cuestiona este significado (Lister, 1990).

Tabla 7. Resumen del significado de las conductas registradas en la prueba de campo abierto.

Las variables se registraron a lo largo de los 5 minutos de duración de la prueba para cada animal.

2.3.2 Laberinto en Y

Una de las formas más simples de aprendizaje espacial de los ratones es la capacidad de alternar sus respuestas al explorar un nuevo entorno. Esto quiere decir, que si un animal ha explorado un entorno será menos probable que vuelva a explorarlo y por tanto, alternará con otro entorno diferente. Este comportamiento se puede asemejar al que el ratón pudiera tener en la naturaleza al buscar nuevas fuentes de alimentos (Sanderson y Bannerman, 2012). Por ello, el comportamiento de alternancia que tiene lugar en el laberinto en Y se ha relacionado con la memoria de trabajo espacial (Olton y Papas, 1979), tarea ésta en la que es esencial.

El hipocampo es una región que es esencial para la memoria espacial (Roberts et ál., 1962; Olton y Papas, 1979; Rawlins y Olton, 1982; Bannerman et ál., 1999), aunque si bien es cierto que existe cierta discrepancia respecto a si ésta región es necesaria para representar la ubicación de los brazos del laberinto o bien para la recuperación de la memoria de que ya se había visitado antes ese lugar (Sanderson y Bannerman, 2012). Uno de los aspectos interesantes de esta prueba es poder testar la memoria de trabajo, habida cuenta de sus implicaciones patológicas, ya que en humanos los déficits en la memoria de trabajo se han relacionado con la esquizofrenia (Goldman-Rakic, 1994), demencia (Morris y Baddeley, 1988) y con los trastornos del desarrollo como el trastorno de hiperactividad y el déficit de atención (Barkley, 1997).

El aparato consistió en un laberinto de 3 brazos, con forma de Y, construido en madera de color blanco, siendo las medidas por brazo 40 cm de largo por 4,5 cm de ancho por 14 cm de alto (Figura 17). La iluminación fue constante e igual en cada brazo. Los ratones se colocaron en el brazo de salida (cualquiera de los brazos) y se les permitió moverse libremente por el laberinto durante 8 minutos. La conducta de los animales se grabó con una cámara digital y posteriormente se analizó la actividad locomotora (distancia recorrida y velocidad media) mediante el sistema informático de imagen (*Ethovision XT*, Noldus, Information Technology, Waningen, Países Bajos). Se registró el número de entradas en los brazos para calcular el porcentaje de alternancia, definido como: $[\text{n}^\circ \text{ de alternancias correctas} / (\text{n}^\circ \text{ total de entradas en los brazos} - 2)] \times 100$ (Maurice et ál., 1994; Mamiya y Ukai, 2001). Para cuantificar las alternancias correctas, se denominó al brazo de salida como A, otro brazo como B y el tercer brazo como C. Se anotó la secuencia que realizaba cada animal, separándolas en

triadas. Cada triada empezaba por el primer brazo al que acudió el animal, seguido de las dos siguientes entradas a cualquiera de los brazos (Figura 18). De esta manera, y considerando la tendencia natural del animal para no repetir la exploración en un mismo brazo, el porcentaje de alternancia fue un indicador del índice de memoria de trabajo del ratón (Mamiya y Ukai, 2001). Al finalizar con cada ensayo, se limpiaba el laberinto con una solución con etanol al 70 % y el ratón era devuelto a su jaula.

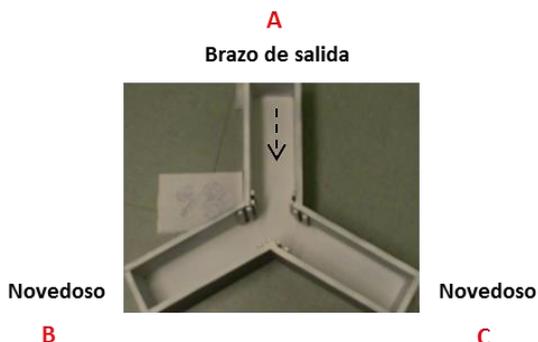


Figura 17. Imagen de la prueba del laberinto en Y. Los animales se colocaron en el brazo de salida, al cual se le denominó A (cualquiera de los 3 brazos, siendo el mismo para todo los ratones) y pudiendo optar por ir a un brazo, denominado B, o al otro, denominado C, convirtiéndose en familiar al igual que el brazo de salida, por lo que en el siguiente movimiento, el ratón, presumiblemente, optaría por acudir al brazo que le quedaba por explorar. Con ello, y asignadas triadas de elección de brazo, se calculó el porcentaje de alternancia, directamente relacionado con la memoria de trabajo espacial (Olton y Papas, 1979).

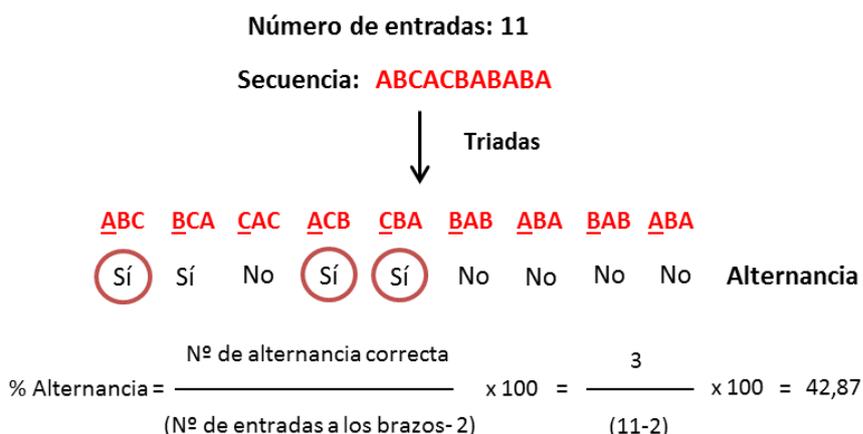


Figura 18. Ejemplo sobre cómo calcular el porcentaje de alternancia en el laberinto en Y. Tomando como ejemplo que el animal realizó 11 entradas en total durante los 8 minutos, se anotó la secuencia de alternancia que hizo. Se fueron cuantificando las alternancias en triadas (A-B-C) que

realizaba el animal a los 3 brazos del laberinto partiendo de la última entrada. El porcentaje de alternancia se calculó a partir de la ecuación dada en el ejemplo (Maurice et ál., 1994; Mamiya y Ukai, 2001).

2.3.3 Test de natación forzada

El comportamiento de afrontamiento pasivo y activo se analizó a través de una de las pruebas más comúnmente usada en el estudio sobre el trastorno de depresión, el test de natación forzada (Porsolt et ál., 1977a, b; Porsolt et ál., 1979; 1997). Para ello, se utilizó el protocolo descrito por Cryan et ál. (2002 a, b) en el que se introduce al animal en un cilindro transparente (de medidas 30 cm de altura y 10 cm de diámetro) lleno de agua, a $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, hasta 15 cm de altura. El agua fue cambiada para cada animal en cada prueba. El animal se introdujo cuidadosamente en el cilindro y se grabó con una cámara digital durante 6 minutos. Se analizó, por observación directa, la primera latencia de inmovilidad (s) y, durante los 4 últimos minutos, se analizaron el porcentaje de inmovilidad, definido como una conducta pasiva en la que el animal deja de nadar y sólo se mueve para flotar en el agua manteniendo la cabeza por encima del agua (Petit-Demouliere et ál., 2005), el porcentaje de natación y el porcentaje de escalada (definidas como conductas de escape en las que el animal nada vigorosamente con las cuatro patas, trepa verticalmente por las paredes del cilindro y bucea). La inmovilidad puede reflejar tanto un fallo para permanecer en las conductas dirigidas al escape como el desarrollo de la conducta pasiva frente a formas activas de afrontamiento de estímulos estresantes (Cryan et ál., 2002 a y b, Figura 19).

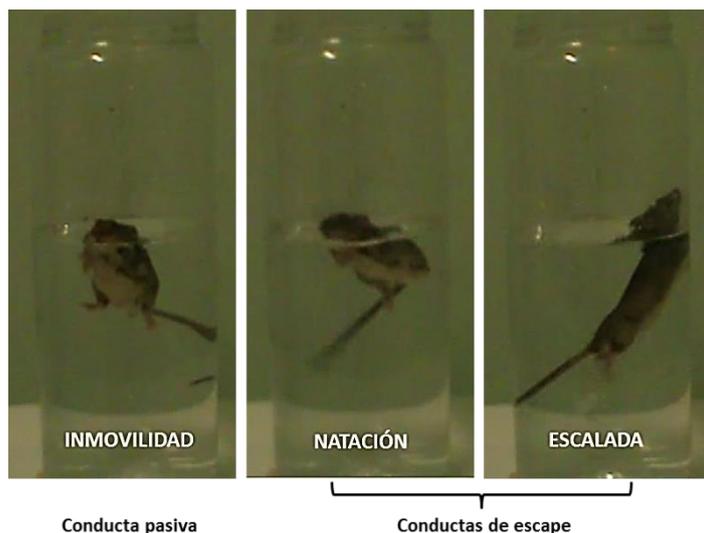


Figura 19. Imágenes representativas de las conductas analizadas en el test de natación forzada. La conducta pasiva se refiere al animal inmóvil, realizando sólo movimientos para mantenerse flotando. Las conductas de escape se definen como natación y escalada (el animal trepa vigorosamente por las paredes del cilindro).

2.3.4 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en las pruebas de comportamiento fueron analizadas a través de ANOVA de una vía comparando los grupos correspondientes a los distintos fármacos administrados (VPC 32183, Ki16425 y LPA) con el grupo control (administrado con el vehículo). Cuando en el ANOVA la *F* resultó estadísticamente significativa, se aplicó para las comparaciones inter-grupos, la prueba de Fisher de significación a posteriori (*post hoc*) que establece la mínima diferencia significativa (LSD, del inglés *Least Significant Difference*). En cualquier caso, sólo se consideraron significativas las probabilidades iguales o menores al valor 0,05 ($p \leq 0,05$). Los análisis se realizaron con el software STATISTICA 7.1 (*Stat Soft Inc.*, Oklahoma, Estados Unidos). El error estándar de la media (SEM, del inglés, *Standard Error of the Mean*) de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

2.4 Técnicas inmunohistoquímica: neurogénesis, actividad neuronal y muerte celular

2.4.1 Fijación, corte y seriado del tejido

Como paso previo a la detección mediante inmunohistoquímica, los cerebros de los ratones analizados se fijaron por perfusión intravascular seguida de 48 h de postfijación para, posteriormente, usarse para la obtención de secciones en congelación y su posterior procesamiento. Cada grupo experimental para el estudio histológico estuvo formado por 6 animales.

Para ello, se anestesió al animal de acuerdo a su peso, mediante una dosis intraperitoneal de solución anestésica (ketamina (80 mg/Kg)/xilacina (12 mg/Kg); Sigma-Aldrich), suficiente para que el ratón no demostrara reflejos ante la estimulación dolorosa. Una vez anestesiado, el animal se situó en posición de cúbito supino y se practicó una incisión en el torso, cortando el diafragma y exponiendo el corazón. Se insertó una cánula en el ventrículo izquierdo conectada a una bomba de perfusión (modelo D-25V, DINTER SA-DINKO Instruments, Barcelona) y se seccionó la aurícula derecha para permitir el vaciado sanguíneo del animal. En primer lugar, se administró una solución de lavado, tampón fosfato salino 0,1 M a pH 7,4 (PBS, del inglés, *Phosphate Buffer Saline*, Anexo I) durante, aproximadamente, 15 minutos, seguida de una solución fijadora de peryodato-lisina paraformaldehído (PLP; McLean y Nakane, 1974; Anexo I) durante, aproximadamente, otros 15 minutos. Tras la perfusión, el animal se decapitó y se procedió a la extracción del cerebro. Los cerebros se sometieron a 48 h de postfijación en el mismo fijador, PLP, a 4°C y en agitación suave. Después de las 48 h y previamente a su corte se realizó una criopreservación del cerebro mediante inmersión en una solución de sacarosa (Panreac Química S.A.U; Barcelona; en adelante, Panreac, Anexo I) al 30 %, para evitar que éste se dañara con las bajas temperaturas. La criopreservación se consideró efectiva cuando la pieza de tejido se hundió definitivamente en el fondo del bote con la solución, de manera estándar, se consideró una semana.

Transcurrido ese tiempo, se tomó cada cerebro y se separaron los hemisferios para realizar, por una parte, el estudio de neurogénesis, muerte celular y actividad neuronal, contralateral, en el hemisferio derecho evitando así la zona de la administración directa del fármaco; y el estudio de control de ausencia de respuestas inflamatorias o gliales asociadas a la inyección, ipsilateral, en el hemisferio izquierdo, donde estuvo implantada la cánula de

infusión cerebral de la minibomba osmótica Alzet®. Para la sección del tejido se utilizó un micrótopo de congelación (Modelo Microm HM460, Microm Laborgerate S.L., Barcelona; parte de Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Se obtuvieron cortes coronales de cerebro, conteniendo tanto ventrículos laterales como hipocampo, de 50 µm de grosor y distribuidos en cuatro series equivalentes (1/4, espaciadas en 200 µm) que fueron colocadas en placas de 24 pocillos con PBS 0,1 M, pH 7,4 (Figura 20). Para ello, los cerebros se colocaron sobre una capa de O.C.T (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound; Sakura Finetek Japan Co., Japón) en la placa de corte del micrótopo de congelación y se fueron cubriendo poco a poco con solución crioprotectora de sacarosa al 30 % (Panreac), hasta congelarse. Los cortes se depositaron en los pocillos (conteniendo PBS 0,1 M, pH 7,4) de una placa de 24 pocillos convencional, de fondo plano. Una vez cortado el tejido, o bien se usó inmediatamente, o bien se colocaron las secciones, en el mismo orden de cada pocillo, en microtubos de centrifuga de 1,5 ml conteniendo una solución crioprotectora (Anexo I) para, así, guardarlo a - 80º C hasta su uso.

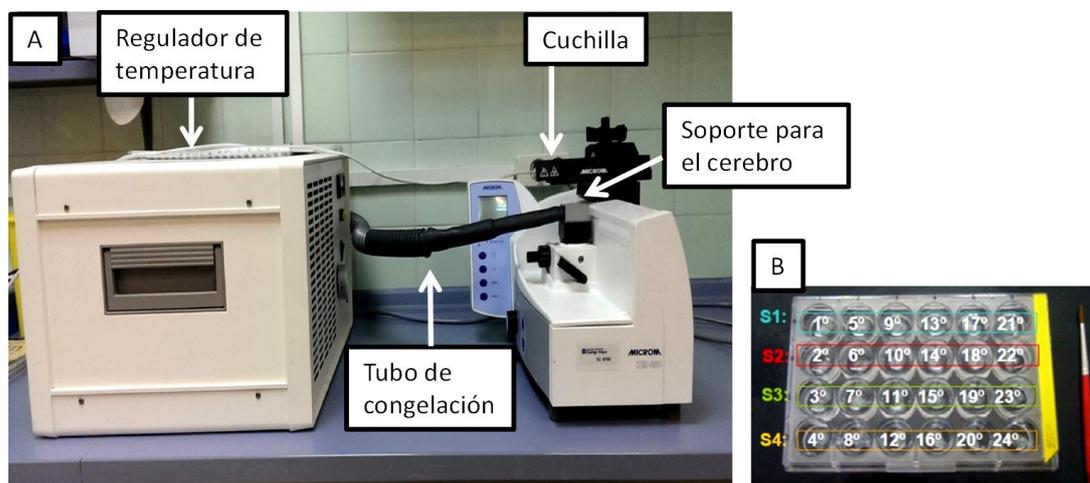


Figura 20. Corte y seriación. (A) Microtopo de congelación utilizado para cortar el tejido. Tras adherir el cerebro al soporte con una capa de O.C.T, se iba congelando gradualmente con sacarosa al 30 %. Las secciones se recogieron con un pincel para depositarlas, después, en una placa de 24 pocillos. (B) Seriación del tejido: cada fila de la placa incluía una de las 4 series de tejido equivalente (S1-S4). Los números de cada pocillo correspondieron al orden en el que se fueron colocando las secciones (tras llegar al pocillo nº 24, se continuó con el nº 1).

2.4.2 Inmunohistoquímica

Para la detección de los antígenos y moléculas marcadoras de interés, se empleó inmunohistoquímica. Esta técnica de detección se basa en la afinidad de los anticuerpos por moléculas con capacidad antigénica (Peinado et ál., 1996). Para la evaluación de la neurogénesis, actividad neuronal (contralateral) y el proceso de inflamación (ipsilateral), se realizó la determinación inmunohistoquímica de los siguientes marcadores que se resumen, además en la tabla 8:

BrdU (*5'-bromo-2'-desoxiuridina*) es un análogo sintético del nucleótido timidina. Tras su administración por vía intraperitoneal se incorpora (aproximadamente a lo largo de las 2 h siguientes a su administración), en el ADN nuclear de las células que se encuentran en proliferación, concretamente en la fase S, permaneciendo en su material genético y permitiendo así su seguimiento y destino, detectándose igualmente en las células hijas (Taupin, 2007). Como se ha comentado en el apartado anterior, los animales se sacrificaron un día después de la última inyección de BrdU para evaluar la proliferación celular.

DCX (*Doblecortina*, del inglés, *X-linked gene doublecortin*) es una proteína de unión a microtúbulos que interviene en la reorganización axonal, la sinaptogénesis y la migración celular durante el neurodesarrollo, siendo considerada como marcador de neuronas inmaduras (Nacher et ál., 2001). En el hipocampo adulto, se expresa en las neuronas jóvenes de la zona subgranular (ZSG), desde que la célula postmitótica elige el fenotipo neuronal (a las pocas horas después de la división) hasta que madura en neurona adulta a las 3-4 semanas, hallándose su máxima expresión entre los 7 y 14 días (Brown et ál., 2003). Inicialmente, las células DCX⁺ tienen una morfología unipolar o bipolar con procesos muy cortos o inexistentes, orientados horizontalmente, de forma paralela a la ZSG. En estas primeras etapas, las DCX⁺ tienen capacidad de proliferación y dan lugar a otras nuevas neuronas. A partir de una semana, extienden sus axones en vertical, radialmente, hacia el área 3 de cuerno de Ammon del hipocampo (CA3) y su árbol dendrítico aumenta progresivamente en complejidad. A partir de una o dos semanas, estas células DCX⁺ parecen intervenir en procesos de memoria y aprendizaje hipocampal (Brown et a., 2003; Christie y Cameron, 2006; Leuner y Gould, 2010). En este trabajo, la DCX se utilizó para evaluar el número de neuronas jóvenes en la ZSG.

c-fos es un proto-oncogén celular perteneciente a la familia de factores de transcripción de genes de expresión temprana. La proteína c-Fos se expresa rápidamente en neuronas cuando son estimuladas (Berghorn et ál., 1994) por lo que es un potente indicador para identificar la activación neuronal (Sagar et ál., 1988). Su aplicación al estudio de neurogénesis hipocampal está bien documentada y ha permitido realizar, entre otros, análisis de neurogénesis en giro dentado para correlacionar la actividad de las poblaciones del giro dentado con aprendizaje y memoria (Stone tal., 2011), estudios de procesos epigenéticos reguladores de funciones cognitivas dependientes de hipocampo (Reul et ál., 2009; Trollope et ál., 2012), o, desde nuestro grupo de investigación, activación hipocampal en giro dentado frente a estudios de memoria episódica (Castilla-Ortega et ál., 2012).

La proteína c-Fos presenta un dominio de unión a ADN de tipo cremallera de leucina, así como otro dominio de transactivación en el extremo C-terminal (van Straaten et ál., 1983). La fosforilación efectuada por MAP quinasas, PKA, PKC o cdc2 altera significativamente la actividad y la estabilidad de *c-fos* (Yang et ál., 1999). Los miembros de la familia c-Fos dimerizan con la proteína c-Jun para formar el factor de transcripción de la proteína activadora 1, el cual activa la transcripción de numerosos y diversos genes implicados en todos aquellos procesos relacionados con la proliferación y la diferenciación celular con el fin de evitar procesos de invasión y daño celular (Ubeda et ál., 1999).

GFAP (*Proteína Glial Fibrilar Ácida*, del inglés, *Glial Fibrillar Acidic Protein*) es una proteína de los filamentos intermedios (constituyentes del citoesqueleto) que es característica de los astrocitos maduros (Eliasson et ál., 1999) y por tanto, en el hipocampo, se expresa en las nuevas células de la ZSG que se diferencian en astrocitos (Steiner et ál., 2004). La GFAP también se expresa en las células radiales precursoras de la ZSG que proliferan para dar origen a las nuevas neuronas o células gliales. Curiosamente, estas células progenitoras no sólo expresan GFAP en reposo sino también cuando entran en el ciclo celular, en la fase de mitosis (Seri et ál., 2004). Es posible distinguir la célula precursora del astrocito porque, aunque ambas expresan GFAP, el precursor presenta una morfología radial mientras que el astrocito posee morfología estrellada (Seri et ál., 2004; Steiner et ál., 2004). La expresión de GFAP desaparece si la célula postmitótica elige el destino neuronal (Steiner et ál., 2004). En nuestro caso se usó como marcador astrocitario, a fin de poder determinar si la lesión causada por la

colocación de la cánula podía generar astrogliosis generalizadas o limitarse a la reacción astrogliosa en la cicatriz dejada por la aguja en el momento de la inyección

CD3 es un complejo de proteína de superficie expresada en los linfocitos T y está compuesta por 4 cadenas diferentes. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ y 2 cadenas CD3 ϵ , las cuales se asocian con el receptor T y la cadena ζ formando un complejo que desencadena la señal de activación de los linfocitos (Zarcone et ál., 1987). Las proteínas de superficie son muy útiles como marcadores poblacionales. En nuestro caso se usó como marcador linfocitario para valorar la posible presencia de inflamación asociada a la inyección.

Iba1 (Molécula 1 adaptadora de unión a calcio ionizado, del inglés, *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) es una proteína de 17 kDa de unión de calcio específica de macrófagos (Imai et ál., 1996) y microglía, en el cerebro (Imai et ál., 1996; Ito et ál., 1998). En macrófagos y microglía Iba1 actúa en el entrecruzamiento de la actina para permitir el pliegue de la membrana y la fagocitosis en la célula activa (Sasaki et ál., 2001) y está implicada en la señalización de calcio y de la señalización de Rac (Ohsawa et ál., 2000), que es esencial en la regulación de la reorganización de la actina en la membrana (Ridley et ál., 1992; Allen et ál., 1997; Hall, 1998). En este estudio, el Iba1 se empleó para la posible presencia de microglía asociada a la lesión local causada por la aguja en el momento de la inyección.

MARCAJE DE LA SECCIÓN	SIGNIFICADO	HEMISFERIO UTILIZADO
BrdU	Proliferación celular en la ZSV y ZSG	Derecho
DCX	Neuronas jóvenes en la ZSG y su grado de desarrollo	Derecho
c-Fos	Actividad neuronal en el hipocampo dorsal	Derecho
GFAP	Células precursoras en la ZSG Astrocitos implicados en el proceso inflamatorio	Izquierdo
Iba1	Macrófagos activos implicados en el proceso inflamatorio tras un daño	Izquierdo
CD3	Linfocitos T activos implicados en el proceso inflamatorio	Izquierdo

Tabla 8. Resumen de los marcadores utilizados.

La inmunohistoquímica se realizó sobre secciones de tejido a temperatura ambiente y en flotación en placas de varios pocillos, en los cuales se añadían y retiraban las diferentes soluciones de reactivos. La detección de los anticuerpos primarios se realizó con sistemas basados en la interacción avidina-biotina, uso de avidina modificada conjugada a peroxidasa (Extravidin®; Sigma-Aldrich), y revelado de la actividad enzimática con diaminobenzidina (DAB, tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina). A continuación se detallan los protocolos correspondientes a los distintos marcadores.

Protocolo de inmunohistoquímica

Salvo indicación, todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente y en agitación.

Primer día:

- Inactivación de la peroxidasa endógena mediante incubación durante 30 minutos en oscuridad, en una solución de metanol al 10 % (v/v) (Panreac) y peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v) (Panreac), en tampón fosfato salino, PBS, 0,1M, pH 7,4.

- 3 lavados durante 10 min cada uno con PBS 0,1 M, pH 7,4.

- Incubación, durante toda la noche, en solución de anticuerpo primario. Todos los anticuerpos se diluyeron en PST, es decir, una solución de PBS 0,1 M, pH 7,4 con suero del animal en el que estaba desarrollado el anticuerpo secundario, al 2,5 % (conejo, cerdo) y Triton X-100® (Panrea) al 0,5 % (detallado en tabla 9).

ANTICUERPO PRIMARIO	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN	DILUYENTE
Anti-DCX	Santa Cruz Biotechnology Ref.: sc-8066	IgG, policlonal obtenido en cabra	1:200	PST conejo
Anti-GFAP	Dako Ref.: Z0334	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:1000	PST cerdo
Anti-CD3	Abcam Ref.: ab5690	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:1000	PST cerdo
Anti-Iba1	Abcam Ref.: ab5076	IgG, policlonal obtenido en cabra	1:1000	PST conejo

Tabla 9. Resumen de anticuerpos primarios.

Segundo día:

- Tras retirar la solución de anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados durante 10 min cada uno con PBS 0,1 M, pH 7,4.

- Incubación durante 2 h en la solución de anticuerpo secundario biotinilado, diluido a 1:800 en PST complementado con suero, en este caso, de otro animal no relacionado con el anticuerpo primario ni secundario (detallado en tabla 10).

ANTICUERPO SECUNDARIO	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN	DILUYENTE
Anti IgG de cabra biotinilado	Dako Ref.: E0466	IgG, policlonal, obtenido en conejo	1:800	PST cerdo
Anti IgG de conejo biotinilado	Dako Ref.: E0353	IgG, policlonal, obtenido en cerdo	1:800	PST cabra

Tabla 10. Resumen anticuerpos secundarios.

- 3 lavados durante 10 min cada uno con PBS 0,1 M, pH 7,4.

- Incubación durante 1 h y en oscuridad en solución de Extravidin® (Sigma-Aldrich) conjugada a peroxidasa, diluida a 1:1000 en PBS 0,1 M, pH 7,4.

- 3 lavados durante 10 min cada uno con PBS 0,1 M, pH 7,4.

- Revelado con una solución de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich) al 0,05 %, y peróxido de hidrógeno (Panreac) al 0,03 %, en PBS 0,1 M, pH 7,4, durante 15-25 min, en oscuridad. La solución de DAB se preparó en el momento del uso. El revelado tuvo lugar durante el tiempo necesario para visualizar el marcador (entre 3-5 minutos).

- Lavado exhaustivo en agua destilada.

Dos marcadores precisaron de un protocolo específico, c-Fos y BrdU.

Imunohistoquímica para c-Fos.

En este caso el protocolo precisó de tratamiento de desenmascaramiento antigénico, mediante el uso de la solución Envision de pH alto (Dako). La incubación en esta solución se

realizó durante 90 s en microondas, seguida de atemperado 20 min a temperatura ambiente, y tuvo lugar previamente a la incubación con el anticuerpo primario y tras la inactivación de la peroxidasa endógena y posterior lavado.

El resto del protocolo siguió los mismos pasos que se han citado anteriormente, siendo el anticuerpo primario anti-cFos policlonal desarrollado en conejo (ref.: sc-52; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Estados Unidos; dilución 1:500).

Inmunohistoquímica para BrdU.

Por un lado, el protocolo completo se realizó usando Tris-PBS 0,01 M, pH 7,8 (ver anexo I) en todos los pasos, en lugar de PBS 0,1 M, pH 7,4. Así, el Tris-PBS reemplazó al PBS en la solución de inactivación, lavados, diluciones de anticuerpos y revelado.

Por otro, la incorporación de la bromodesoxiuridina al ADN requiere de un procedimiento específico para su detección, que permita la apertura y el acceso a la hebra de ADN. Para ello, tras la inactivación de la peroxidasa y lavado, se realizó una digestión del tejido en proteinasa K (Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C. Tras ello, se realizaron tres lavados de 10 min con Tris-PBS y se desnaturalizó el ADN por incubación en una solución de ácido clorhídrico 2N (Panreac) durante 30 min, a 37°C.

Tras neutralizar el ácido mediante dos lavados de 5 min en tampón borato 0,1 M, pH 8,5 (ver anexo I), se realizó lavado en Tris-PBS y se siguió con el protocolo convencional, usando anti-BrdU monoclonal desarrollado en ratón (Sigma, dilución 1:1000, en PST, suero de conejo) y anti IgG de ratón policlonal, biotinilado, desarrollado en conejo (Dako, dilución 1:800 en PST, suero de oveja).

En todos los casos, tras la inmunohistoquímica, las secciones se lavaron en PBS y se montaron sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Una vez secadas las secciones, se deshidrataron por inmersión en alcoholes de gradación creciente (70º, 90º, 100º I, 100º II) y xileno (dos pasos) durante 5 min en cada paso para, finalmente, montarlas DPX (Sigma-Aldrich).

2.4.3 Detección de apoptosis

La apoptosis (revisión en Elmore, 2007) es un tipo de muerte celular, bajo control genético, que conlleva colapso celular, condensación de la cromatina (picnosis) y fragmentación del ADN. La apoptosis implica la compactación y posterior segregación de la cromatina y la condensación del citoplasma, posteriormente tanto el núcleo como el citoplasma se fragmentan y forman diversas masas esféricas, rodeadas de membrana citoplasmática que se denominan cuerpos apoptóticos (Häcker, 2000). Las células apoptóticas desintegradas y los cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por células vecinas o macrófagos, previniendo así una reacción inflamatoria.

La apoptosis, a nivel cerebral, es necesaria para múltiples procesos que permitan seguir con una funcionalidad normal. Así, es necesaria para el ajuste poblacional durante el desarrollo, para la eliminación de conexiones neuronales innecesarias, que afectan a la eficiencia sináptica, y, a nivel hipocampal, para el ajuste de los mecanismos de neurogénesis e para la integración neuronal, afectando incluso a procesos cognitivos asociados a hipocampo (Buss et ál., 2006; Dupret et ál., 2007; Kim et ál., 2009; revisado en Kim y Sun 2011) razón por la cual ha sido evaluada en este trabajo.

La apoptosis se determinó con un kit de detección de apoptosis in situ específico para tejido neuronal (NeuroTACS II, Trevigen, Gaithersburg, Estados Unidos) que marca el ADN fragmentado siguiendo el método TUNEL, donde los fragmentos de ADN generados por apoptosis son marcados en su extremo con nucleótidos modificados usando una enzima desoxinucleotidil transferasa terminal, que serán detectados posteriormente usando un sistema colorimétrico de peroxidasa que cataliza, y permite visualizar, la conversión de la diaminobenzidina. Se siguió el protocolo indicado por la casa comercial, que se detalla a continuación.

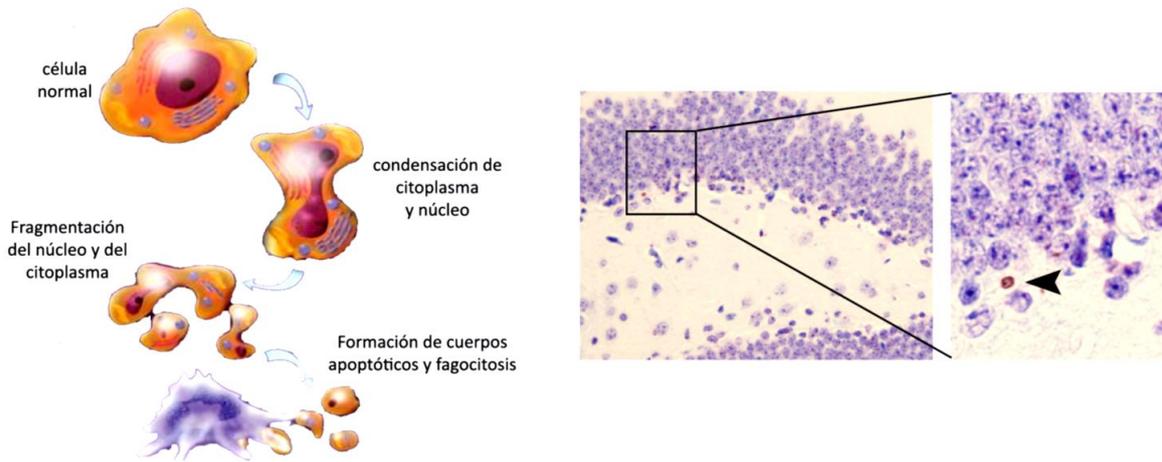


Figura 21. Apoptosis. Esquema de las etapas de la apoptosis e imagen mostrando un núcleo apoptótico (flecha) en la capa granular del giro dentado del hipocampo, contrateñido.

Detección de apoptosis con el kit NeuroTACS II

El kit se utilizó sobre secciones del hemisferio derecho montadas en portaobjetos, y dajas secar durante un día. El protocolo se realiza en frascos de lavado de tipo Coplin, salvo los pasos en gota que se realizan en una cámara húmeda, delimitando las secciones con un lápiz grueso para controlar la propagación del líquido. Los reactivos mencionados en el protocolo estaban incluidos en el kit. A continuación se detallan los pasos seguidos:

- Lavado en PBS 0,1 M, pH 7,4 (10 min, en agitación).
- Incubación en solución de proteinasa K, 25 a 37°C.
- 2 lavados en PBS (5 min por lavado, en agitación).
- Lavado en solución de aclarado, *Quenching solution* (45 ml de metanol con 5 ml de H₂O₂ al 30%) durante 5 min.
- Lavado en PBS 0,1 M, pH 7,4 (1 min, en agitación).
- Lavado en solución de marcaje de la enzima desoxinucleótido transferasa terminal (*TdT Labelling Buffer*) a 1 M (5 ml de *TdT Labelling buffer* 10 M con 45 ml de agua destilada) durante 5 min.

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

Para 500 ml:

TdT Labeling Buffer a 1x -- 500 ml

TdT dNTP Mix -----10 ml

TdT Enzyme ----- 10 ml

50x Mn²⁺ Cation ----- 10 ml

- Lavado en solución de paro de la enzima a 1 M (5 ml de *TdT Stop buffer* 10 M con 45 ml de agua destilada) durante 5 min.

- 2 lavados en PBS 0,1 M, pH 7,4 (5 min por lavado, en agitación).

- Incubación en cámara húmeda con solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa, a temperatura ambiente y en oscuridad:

Para 500 ml:

PBS 1 M ----- 500 ml

Strep-HRP-----10 ml

- 2 lavados en PBS 0,1 M, pH 7,4 (5 min por lavado, en agitación).

- Revelado en solución de diaminobenzidina con potenciador y H₂O₂ durante 2-7 min en oscuridad.

Solución de revelado (50 ml):

PBS 1 M ----- 50 ml

DAB -----250 ml

DAB *enhancer* ----- 50 ml

H₂O₂ al 30 % ----- 50 ml

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

2.4.4 Cuantificación

Proliferación celular, neuronas jóvenes, actividad neuronal y muerte celular (apoptosis).

Para la evaluación de la neurogénesis (proliferación en la zona subgranular y subventricular, neuronas jóvenes, y apoptosis) y de la actividad neuronal, la cuantificación se realizó en una de cada cuatro (para la BrdU) o en una de cada ocho (para el resto de marcadores) secciones del hipocampo. Aunque inicialmente cada hemisferio estaba distribuido en cuatro series (1/4), era posible escoger las secciones no consecutivas de una serie y obtener así una fracción de 1/8 del tejido. En cualquier caso, las secciones empleadas en cada conteo estuvieron ordenadas en el eje rostrocaudal e igualmente espaciadas entre sí. Cada serie comenzaba a - 1,22 mm respecto a Bregma y finalizaba aproximadamente a - 2,46 mm respecto a Bregma (Paxinos y Franklin, 2001), abarcando principalmente la región dorsal del hipocampo dorsal. La cuantificación se realizó en la ZSG del giro dentado en el hemisferio derecho. Excepcionalmente, la apoptosis se evaluó sólo en la ZSG del hipocampo. Las células positivas en cada sección se cuantificaron con un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara digital en color (CCD-Iris, Sony España), utilizando el objetivo de 1000 aumentos. Posteriormente, el total de células por hipocampo se estimó multiplicando el número de células contadas x 4 (BrdU) o x 8 (resto de marcadores), según el procedimiento de Kempermann et ál. (2003). Este método es una simplificación de la estereología y ha demostrado ser válido para evaluar la neurogénesis hipocampal (Kempermann et ál., 2003; Steiner et ál., 2004; Egeland et ál., 2010).

2.4.5 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía comparándolos con el grupo control (vehículo) seguidos del análisis *post hoc* de la diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD). Se consideró significativa la probabilidad igual o menor a 0,05. Los análisis se realizaron con el software STATISTICA 7.1 (StatSoftInc, Oklahoma, Estados Unidos). El error estándar de la media (SEM) de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

2.5 Electrotransferencia e inmunotinción (Western Blot)

Desde que la técnica de electrotransferencia e inmunotinción o *western blot* fuese introducida en 1979 (Towbin et ál., 1979), se ha convertido en una prueba rutinaria en los laboratorios y es tradicionalmente usada para detectar cantidades baja de proteínas específicas de una muestra determinada. En sí, en esta técnica, las proteínas son electrotransferidas desde un gel de poliacrilamida a una membrana específica para detectar a través de inmunotinción con anticuerpos la proteína de interés. En este trabajo, esta técnica fue desarrollada para cuantificar la expresión del receptor LPA₁ y la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII) en sus formas inactiva y fosforilada, utilizándose 4 animales de cada grupo agrupando de dos en dos los hipocampos derechos para obtener dos medidas de cada grupo experimental.

La elección de CaMKII como proteína de interés a nivel hipocampal se debe a que es una enzima dependiente de Ca²⁺ que juega un papel importante en la regulación de la transmisión glutamatérgica (Nelson et ál., 1998; Shenton et ál., 2001; Heckers, 2004), en la inducción de la potencialización a largo plazo y además, en la regulación de la excitabilidad neuronal, la transmisión sináptica y la plasticidad cerebral (Hudmon y Schulman, 2002; Lisman et ál., 2002). El complejo CaMKII es una holoenzima serina/treonina quinasa regulada por el complejo calcio-calmodulina compuesto por un dominio catalítico, un dominio auto-inhibidor, un segmento variable y un dominio auto-asociación (Hudmon y Schulman, 2002). La característica estructural del complejo es el residuo de treonina 286 (Thr²⁸⁶) de la subunidad alfa, que tras ser fosforilado, el dominio auto-inhibidor es bloqueado permitiéndose la activación permanente de la enzima CaMKII independientemente del calcio y de la calmodulina (Yang y Schulman, 1999) y potenciando su funcionalidad.

2.5.1 Preparación del tejido y cuantificación de proteína

Transcurrido el tratamiento de 21 días con los fármacos administrados con las minibombas osmóticas Alzet® se sacrificaron los animales mediante dislocación cervical. Una vez retirado el cráneo y extraído el cerebro, sobre una placa fría se procedió a la extracción del hipocampo. Se guardaron los hipocampos de cada animal de manera independiente en

microtubos de centrifuga enfriados en nieve carbónica pulverizada y, posteriormente, se almacenaron a - 80° C hasta su análisis.

Los hipocampos derechos se agruparon de dos en dos de los animales que tuvieron el mismo tratamiento, y se homogenizaron en 200 µl de tampón de lisis conteniendo conteniendo tampón ácido [4-(2-(hidroxietil)-1-piperazinetano- sulfónico] o HEPES (del inglés, *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*), ácido etilendiaminotetra acético o EDTA (del inglés, *ethylenediaminetetraacetic acid*), y ácido etilenglicol bis (2-aminoetileter) N,N,N',N'tetraacético o EGTA (del inglés, *ethylene glycol tetraacetic acid*), con las siguientes concentraciones: cloruro sódico 125 mM, HEPES 20 mM a pH 7, EDTA 1 mM, EGTA 1mM y glicerol al 10 % (v/v). Para evitar la degradación de las proteínas se añadió una pastilla de inhibidores de proteasas (SigmaFAST™; Sigma-Aldrich). Se realizó una primera centrifugación a 2000 xg durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante se añadió en tubos de microcentrífuga para volver a centrifugar a 100.000 xg durante 1 h a 4°C (ultracentrífuga Optima Beckman TL 100 TLX). El sobrenadante correspondiente contuvo la fracción de las membranas plasmáticas, que se guardaron en alícuotas a - 20°C hasta su posterior uso.

Para cuantificar la cantidad de proteína extraída por cada 2 hipocampos derechos de cada grupo experimental, se utilizó el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Este ensayo está basado en el cambio de color del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. La unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomasie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína (Bradford, 1976).

El método de cuantificación de proteína necesita el desarrollo de una curva estándar de concentraciones conocidas de cualquier proteína para que a través de la relación lineal entre la absorbancia y la concentración de proteína conocida, se pueda determinar la concentración de la muestra. En el estudio actual, el colorante de Bradford (Sigma-Aldrich) se mezcló con concentraciones conocidas de la proteína albúmina de suero bovino (soluciones estándar; Sigma-Aldrich) en un rango lineal de 2-0,0009 mg/ml. Para ello, se utilizó una placa

de 96 pocillos añadiendo 5 µl de cada muestra comparado con el control, o blanco, compuesto de 5 µl de agua. Para la curva patrón se añadió 5 µl de cada concentración conocida de BSA. Posteriormente, a todos los pocillos se añadieron 250 µl del reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, Figura 22) y se esperó un mínimo de 5 min hasta que la reacción fue estable colorimétricamente. La absorbancia de cada patrón y de cada muestra fue medida a 595 nm y, a partir de la pendiente de la recta lineal y la intersección de la ecuación derivadas, se calculó la concentración de las proteínas de las muestras. Se utilizó, para ello, un espectrofotómetro (VERSAmax, MDS Tecnologías analíticas; Molecular Devices Corp., California, Estados Unidos) y el programa informático SOFTmax® ProVersion 3.2.1 (Molecular Devices Corp.).

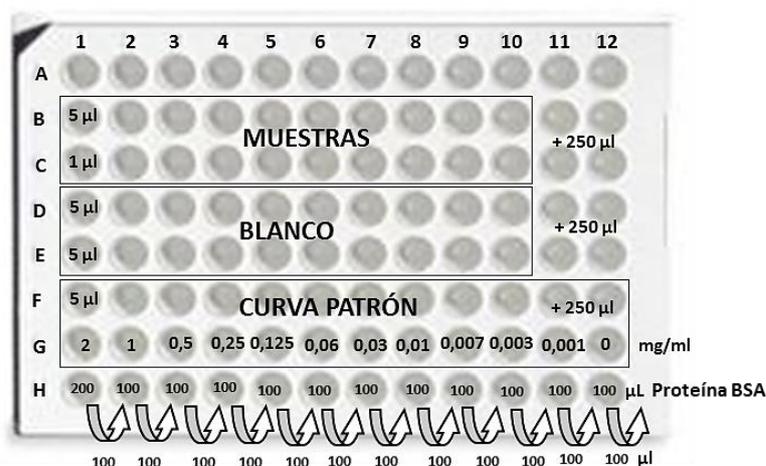


Figura 22. Representación de la placa de 96 pocillos utilizada para la determinación de la concentración de proteínas de las muestras a través del ensayo de Bradford. Las filas B y C se utilizaron para las muestras (en la fila C se añadió 1 µl para tener la concentración diluida). Las filas D y E se utilizaron para hacer el blanco compuesto de 5 µl de agua. La fila H se usó, no para medir, sino para confeccionar las diluciones de curva patrón a partir de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés, *bovine serum albumine*), partiendo de una concentración conocida de 2 mg/ml. Con una dilución 1:2 se fue diluyendo cada concentración a la mitad hasta llegar a 0,0009 mg/ml. Se añadieron 5 µl de cada pocillo de la curva patrón a las filas F y G. Una vez terminado, se añadieron 250 µl del reactivo de Bradford a todos los pocillos salvo a la fila H.

2.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas de cada muestra se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés SDS, *sodiumdodecyl*

sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970). La electroforesis realizada de esta manera consigue mantener los polipéptidos en un estado desnaturalizado por lo que permite la separación de las proteínas por su peso molecular, debido a que se cubren con la carga negativa del SDS, facilitando así su movimiento hacia el electrodo cargado positivamente a través de la malla del gel de poliacrilamida. Una vez separadas por peso, se electrotransferieron a una membrana de polímero para, fijadas a ésta, realizar inmunotinción y detección (*western blot*) mediante el uso de anticuerpos específicos y sistemas de detección por colorimetría.

Las proteínas analizadas por fueron los receptores LPA₁, la subunidad alfa de la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina, α CaMKII inactiva y su forma fosforilada en el residuo de treonina (p-Thr²⁸⁶ α CaMKII) comparados con la proteína constitutiva gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, del inglés, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) y fueron separadas según su peso molecular (LPA₁₋₃: 39 kDa-42 kDa; α CaMKII y p-Thr²⁸⁶ α CaMKII: 42 kDa; GAPDH: 37 kDa). Como control y patrón de tamaño, se utilizó una solución de pesos moleculares estándar de amplio rango que, en el caso de uso para transferencia e inmunotinción estaban previamente conjugados a una secuencia detectable (*Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards, Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards Strep Tactin-HRP*, Bio-Rad Laboratories SA, Barcelona). El equipo utilizado para la electroforesis fue la cubeta *Mini-Protean® Tetra Cell* (Bio-Rad Laboratories S.A.; Barcelona; en adelante, Bio-Rad) y el gel de poliacrilamida al 12 % ya polimerizado (*Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel*; Bio-Rad). Las muestras se mezclaron a igual volumen (1:1) con tampón de carga Laemmli (Bio-Rad) y, tras añadir β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) como agente reductor, se calentaron durante 3 minutos a 96°C. Se cargaron entre 20-15 μ l en total de cada muestra (correspondiente a 30 μ g de proteína) en cada pocillo de cada calle del gel de poliacrilamida. En cada gel se añadieron en dos pocillos distanciados, 5 μ l de la solución patrón estándar de pesos moleculares de amplio rango. La cubeta y los pocillos del gel se rellenaron con tampón Tris a 25mM, con glicina 192mM, SDS 0,1 % (Bio-Rad). La electroforesis se realizó a un voltaje de 200 durante 35 min, a 4°C. La eficiencia de la electroforesis se confirmó a través de la tinción de azul de Coomassie® por la incubación en solución de Coomassie (metanol al 50 % (v/v), ácido acético al 10 % (v/v), Coomassie R-250 al 0,1125 %; todos los reactivos de Sigma-Aldrich) durante 2-4 h a temperatura ambiente. Para ver las

bandas de las proteínas se realizó lavado con solución de desteñido (metanol al 10 % (v/v), ácido acético al 10 % (v/v), en agua destilada) durante toda la noche.

2.5.3 Electrotransferencia

Después de la electroforesis, se realizó la electrotransferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, del inglés, *polyvinylidene difluoride*). Para ello, se utilizó el equipo *Trans-Blot® Turbo™ Transfer-System* y el kit de membrana *Trans-Blot® Mini PVDF Transfer Packs* (Bio-Rad) que no requiere pretratamiento de la membrana, y se acopló junto al gel siguiendo las instrucciones del fabricante. La electrotransferencia se realizó a 13 V, 2,5 A durante 20 min, a temperatura ambiente. Igualmente, se confirmó la integridad de la electrotransferencia tiñendo el gel de poliacrilamida en azul de Coomassie®, como se ha descrito anteriormente.

2.5.4 Inmunotinción

Tras la transferencia y, como paso previo a la inmunotinción de las proteínas de interés se realizó el bloqueo de la membrana de transferencia con leche en polvo descremada al 3 % (Central Lechera Asturiana, Asturias) en PBS 0,1 M pH 7,4 durante 40 minutos. Tanto éste como cada uno de los pasos de la inmunotinción se llevaron a cabo en agitación y a temperatura ambiente. Después del bloqueo, las membranas se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos correspondientes, diluïdos en PBS 0,1 M pH 7,4 con Tween®20 (Sigma-Aldrich) al 0,1 % y con albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich) al 1 %, (ver detalle en tabla 11).

ANTICUERPO PRIMARIO	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
Anti-LPA1	Assay Biotechnology Ref.: g083	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:1000
Anti-LPA2	Thermo Scientific Ref.: PA1-23557	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:1000
Anti-LPA3	Assay Biotechnology Ref.: g088	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:1000
Anti- α CaMKII (M-176)	Santa Cruz Biotechnology Ref.: sc-9035	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:1000
Anti-p-Thr ²⁸⁶ α CaMKII	Santa Cruz Biotechnology Ref.: sc-12886-R	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:1000
Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology Ref.: sc-32233	IgG, policlonal obtenido en ratón	1:1000

Tabla 11. Resumen de anticuerpos primarios.

Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron 3 veces, 10 min por lavado, en PBS 0,1 M pH 7,4 con Tween[®]20 (Sigma-Aldrich) al 0,1 % y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, del inglés, *horseradish peroxidase protein*) y diluido en PBS 0,1 M pH 7,4 con Tween[®]20 (Sigma-Aldrich) al 0,1 % y albúmina bovina (Sigma-Aldrich) al 1 % (Tabla 12). La incubación del anticuerpo secundario tuvo lugar durante 1 h a temperatura ambiente. Los pesos moleculares en este caso se usaron conjugados a una secuencia de detección sintética reconocida por un conjugado a peroxidasa (dilución 1:4000, *Precision Protein™ StrepTactin-HRP conjugate*, Bio-Rad).

ANTICUERPO SECUNDARIO	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
Anti IgG de conejo conjugado con HRP	Bio-Rad Ref.: 170-6515	IgG, policlonal, obtenido en cabra	1:3000
Anti IgG de ratón conjugado con HRP	Bio-Rad Ref.:170-6516	IgG, policlonal, obtenido en cabra	1:4000

Tabla 12. Resumen de anticuerpos secundarios.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario y el conjugado para pesos moleculares, las membranas se lavaron 3 veces en PBS 0,1 M pH 7,4 con Tween®20 (Sigma-Aldrich) al 0,1% y se procedió a la detección de las bandas por un método colorimétrico. Para ello, se incubaron en una solución optimizada de 4-cloro-1-naftol (Opti4CN™; Bio-Rad) siguiendo el protocolo del fabricante y dejando revelar durante un mínimo de 15 min para que se visualicen adecuadamente las bandas. La reacción se paró con agua y las membranas se dejaron secar al aire libre. La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo mediante el programa informático ImageJ 1.41 (Rasband, W.S., ImageJ, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

2.5.5 Análisis estadístico

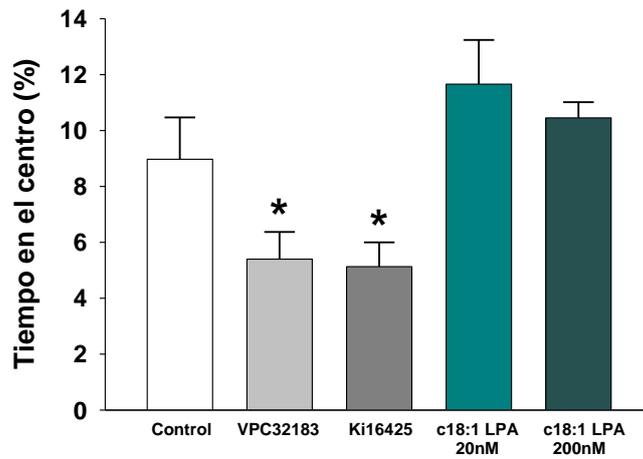
Los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía. Se consideró significativa la probabilidad igual o menor a 0,05. Los análisis se realizaron con el software STATISTICA 7.1 (*Stat Soft Inc.*, Oklahoma, EEUU). El error estándar de la media de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

RESULTADOS
3.1 Análisis conductual3.1.1 Exploración y ansiedad

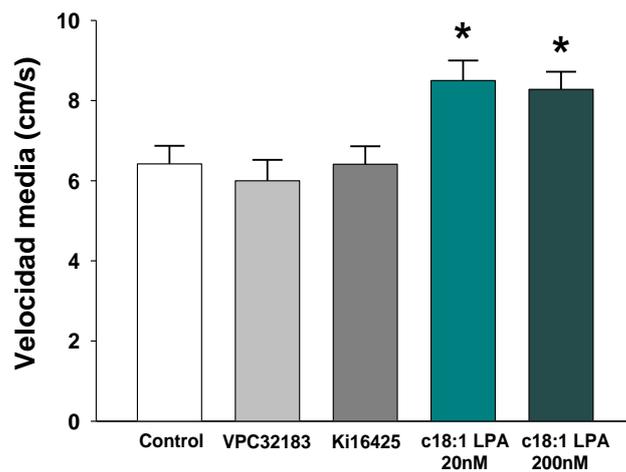
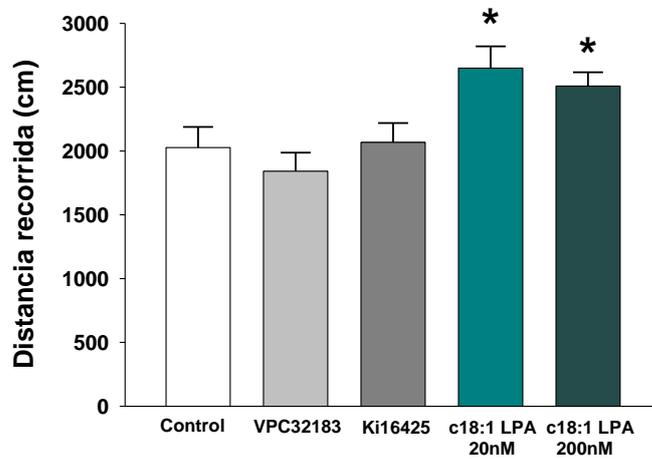
El campo abierto permite estudiar la conducta exploratoria del animal y conductas asociadas con la ansiedad ante un contexto novedoso. Como se ha mencionado anteriormente, la elección por esta prueba se debe a su capacidad para valorar la conducta relacionada con la ansiedad, la actividad exploratoria, y la locomoción (Prut y Belzung, 2003). Resultados previos de nuestro grupo (Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010) han demostrado conductas específicas en esta prueba y similares, relacionadas con la ansiedad y la exploración, asociadas a la ausencia de señalización por el receptor LPA₁, siendo de especial interés su estudio bajo regulación farmacológica. En esta prueba, se registraron la locomoción (distancia recorrida y velocidad media), tiempo que permanecieron en el centro, la exploración alzada (*rearing*) con y sin apoyo a la pared, acicalamiento (*grooming*), valoración de riesgo y defecación. El análisis mediante ANOVA de una vía mostró un efecto del tiempo de permanencia en el centro ($F_{(1,46)} = 6,244$; $p < 0,001$) (medias \pm SEM (%): control: $8,9 \pm 1,5$; VPC 32183: $5,4 \pm 0,9$; Ki16425: $5,1 \pm 0,8$; LPA 20 nM: $11,6 \pm 1,5$; LPA 200 nM: $10,9 \pm 0,4$), la distancia recorrida ($F_{(1,46)} = 5,521$; $p < 0,002$) (medias \pm SEM (cm): control: $2010,2 \pm 146,9$; VPC 32183: $1841,6 \pm 144,9$; Ki16425: $1993,1 \pm 152,1$; LPA 20 nM: $2649,4 \pm 170,2$; LPA 200 nM: $2508,6 \pm 123,1$), la velocidad media ($F_{(1,46)} = 5,215$; $p < 0,002$) (medias \pm SEM (cm/s): control: $6,5 \pm 0,4$; VPC 32183: $6,1 \pm 0,5$; Ki16425: $6,4 \pm 0,4$; LPA 20 nM: $8,5 \pm 0,5$; LPA 200: $8,2 \pm 0,5$), la exploración alzada sin apoyo ($F_{(1,45)} = 8,881$; $p < 0$) (medias \pm SEM (nº/min): control: $0,4 \pm 0,1$; VPC 32183: $0,3 \pm 0,1$; Ki16425: $0,4 \pm 0,1$; LPA 20 nM: $1,6 \pm 0,4$; LPA 200 nM: $2,4 \pm 0,3$), la exploración alzada con apoyo ($F_{(1,45)} = 3,223$; $p < 0,021$) (medias \pm SEM (nº/min): control: $5,1 \pm 0,8$; VPC 32183: $3,9 \pm 0,6$; Ki16425: $4,8 \pm 0,2$; LPA 20 nM: $6,9 \pm 0,6$; LPA 200 nM: $5,2 \pm 0,6$), la exploración alzada total ($F_{(1,45)} = 6,522$; $p < 0$) (medias \pm SEM (nº/min): control: $5,5 \pm 0,9$; VPC 32183: $4,2 \pm 0,7$; Ki16425: $4,8 \pm 0,2$; LPA 20 nM: $8,5 \pm 0,9$; LPA 200 nM: $7,4 \pm 0,6$), la valoración del riesgo ($F_{(1,45)} = 6,035$; $p < 0,001$) (medias \pm SEM (nº/min): control: $0,7 \pm 0,1$; VPC 32183: $1,1 \pm 0,1$; Ki16425: $1,2 \pm 0,1$; LPA 20 nM: $0,5 \pm 0,1$; LPA 200 nM: $0,4 \pm 0,1$), acicalamiento ($F_{(1,45)} =$

5,773; $p < 0,001$) (medias \pm SEM (nº/min): control: $0,5 \pm 0,1$; VPC 32183: $0,6 \pm 0,1$; Ki16425: $1,1 \pm 0,2$; LPA 20 nM: $0,4 \pm 0,1$; LPA 200 nM: $0,3 \pm 0,1$) y la defecación ($F_{(1,45)} = 4,35$; $p < 0,005$) (medias \pm SEM: control (nº): $1,6 \pm 0,5$; VPC 32183: $2,6 \pm 0,4$; Ki16425: $3,8 \pm 0,4$; LPA 20 nM: $1,8 \pm 0,2$; LPA 200 nM: $1,7 \pm 0,3$) sobre el tratamiento (Figura 23). En relación con la valoración de conductas asociadas clásicamente a ansiedad, las comparaciones *post hoc* mostraron una reducción significativa del porcentaje de tiempo de permanencia en la zona central en los animales tratados con los antagonistas VPC 32183 ($p < 0,05$) y Ki16425 ($p < 0,03$), respecto al control. Igualmente, demostraron incremento en la locomoción y en la actividad exploratoria (exploración vertical alzada) de los animales con tratamiento de LPA tanto a la concentración de 20 como a 200 nM. Este patrón consistió en un aumento de la distancia recorrida (LPA 20 nM $p < 0,004$; LPA 200 nM $p < 0,04$ con respecto al grupo control o vehículo) y de la velocidad media (LPA 20 nM, $p < 0,006$; LPA 200 nM $p < 0,03$, con respecto al grupo control, Figura 23B). En cuanto a la exploración, los animales con LPA mostraron una mayor frecuencia de exploración alzada sin apoyarse a la pared (LPA 20 nM $p < 0,002$; LPA 200 nM $p < 0$, Figuras 23C) comparados con el grupo control. Respecto al resto de conductas de valoración de riesgo y acicalamiento, el grupo de animales tratado con el antagonista Ki16425 aumentó muy significativo la frecuencia de ambas variables ($p < 0,016$; $p < 0,001$, respectivamente, Figuras 23D y 23E) comparados con el grupo control. En cambio, el grupo tratado con el antagonista VPC 32183 únicamente mostró una tendencia a aumentar la conducta de valoración de riesgo ($p < 0,07$). Finalmente, el grupo de los animales tratados con Ki16425 también mostró una mayor frecuencia de defecación ($p < 0,001$). Estos datos apoyan la relación de la vía de señalización por LPA a través del receptor LPA₁ con las conductas de exploración, que concuerdan, además, con los resultados de los estudios realizados anteriormente sobre los animales carentes del receptor LPA₁ (Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010). Igualmente coinciden con dichos estudios en el papel que, sobre conductas asociadas a ansiedad (porcentaje de tiempo en zona central del campo, valoración de riesgo, acicalamiento, defecación) muestra la regulación del eje LPA-LPA₁, particularmente ansiogénica, por los resultados obtenidos, en condiciones de inhibición o bloqueo de la vía de señalización.

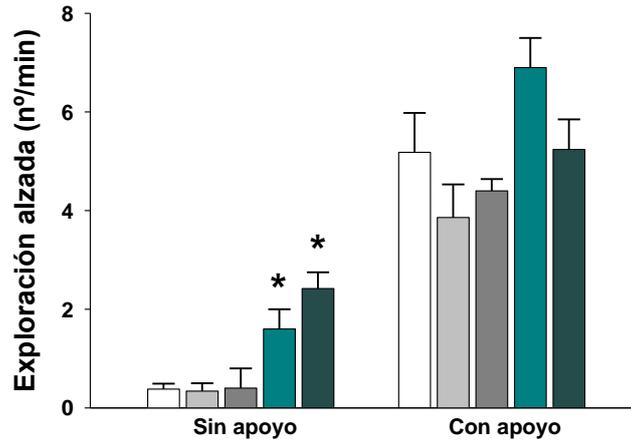
A) Permanencia en el centro



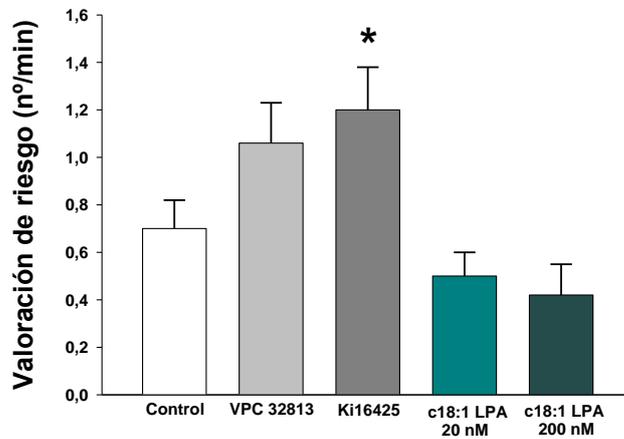
B) Actividad locomotora



C) Actividad exploratoria



D)



E)

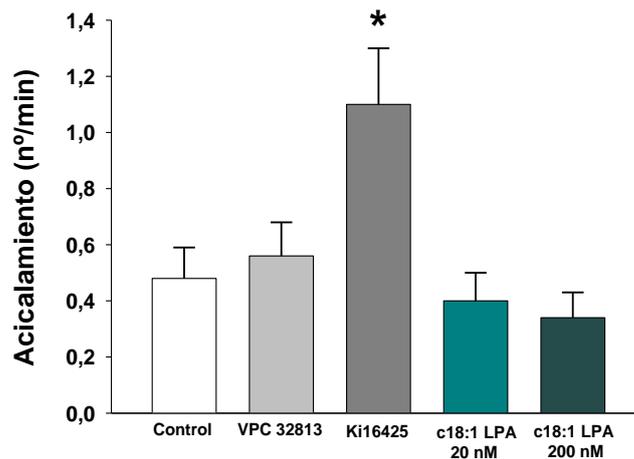


Figura 23. Conductas analizadas durante la prueba de campo abierto. Las gráficas muestran la valoración de cada conducta en campo abierto, para cada tratamiento, y expresadas como medias \pm SEM. Los animales con tratamiento con LPA (20 y 200 nM) tuvieron mayor locomoción y mayor frecuencia de alzado exploratorio sin apoyo comparado con el grupo control, así como tendencia a

permanencia en centro. Por contra, la inhibición o bloqueo de la señalización por LPA₁ mediante antagonistas fue asociada en todo momento a un menor tiempo de permanencia en la zona central, tendencia a una menor exploración y frecuencias mayores de valoración de riesgo y de acicalamiento. Se muestran los análisis *post hoc* LSD: diferencias con el grupo control (* $p < 0,05$).

3.1.2 Memoria de trabajo espacial

La prueba de laberinto en Y permite estudiar la memoria de trabajo espacial a través de las alternancias realizadas por los animales en los tres brazos sin que tengan reforzador en alguno de ellos. La ejecución de esta prueba, respecto a memoria, es dependiente de hipocampo (Roberts et ál., 1962; Olton y Papas, 1979; Rawlins y Olton, 1982; Bannerman et ál., 1999; Sanderson y Bannerman, 2012) y presenta relevancia patológica. Habida cuenta del papel que desempeña el receptor LPA₁ en la función hipocampal y su posible implicación en neuropatología (ver introducción), resultaba de sumo interés el estudio de esta prueba en condiciones normales y tras la administración de fármacos reguladores de la vía de señalización. Junto al análisis del porcentaje de alternancias correctas mostrada por los ratones, se registraron parámetros de la locomoción, es decir, la distancia recorrida y la velocidad media realizada por los ratones. El análisis mediante ANOVA de una vía demostró que no hubo diferencias significativas en cuanto a locomoción, pero sí en el porcentaje de alternancias correctas ($F_{(1,34)} = 7,321$; $p < 0,001$). La comparación *post hoc* mostró, respecto al control, que hubo una disminución del porcentaje de alternancias correctas en los animales tratados con los fármacos antagonistas VPC 32183 y Ki16425 ($p < 0,05$ y $p < 0,025$, respectivamente) a la par que la administración del agonista LPA mostraba una tendencia a aumentar dicho porcentaje a la concentración de 20 nM ($p < 0,06$), tendencia que se observó significativa cuando se aumentó la concentración a 200 nM ($p < 0,05$) (Tabla 13 y Figura).

Grupo	Distancia recorrida (cm)	Velocidad media (cm/s)	Alternancia correcta (%)
Control	3483,8 ± 315,4	7,1 ± 0,6	63,5 ± 2,4
VPC32183 20 nM	3282,3 ± 342,9	6,84 ± 0,7	56,45 ± 3,5*
Ki16425 400 nM	3763,8 ± 201,,4	7,8 ± 0,4	54,77 ± 1,5*
c18:1 LPA 20 nM	3866,2 ± 258,2	7,6 ± 0,7	70,23 ± 2,4
c18:1 LPA 200 nM	3529,8 ± 308,3	7,4 ± 0,64	70,89 ± 2,2*

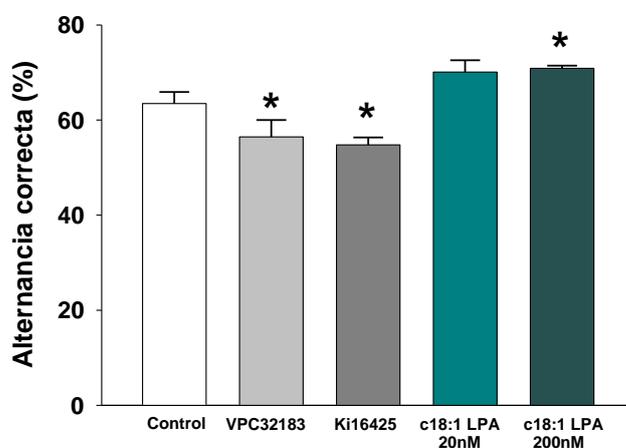


Tabla 13. Variables analizadas durante la prueba del laberinto en Y. La tabla muestra los datos de las variables medidas para locomoción (distancia y velocidad) así la capacidad cognitiva de los animales en el test para evitar la repetición de elección de brazo, medida como porcentaje de alternancia correcta. Los datos se detallan para cada tratamiento, expresados como medias ± SEM. Los 5 grupos experimentales mostraron una locomoción similar, destacando las diferencias en relación al porcentaje de alternancias donde los tratameintos con los fármacos antagonistas y agonistas muestran una reacción inversamente proporcional con disminución, en el primer caso, y un aumento, en el segundo, de elegir correctamente el brazo a explorar. LSD: diferencias con el grupo control (* $p < 0,05$).

Si bien globalmente, a efectos de porcentaje total, los tratamientos muestran efecto significativo en la capacidad de alternar adecuadamente la elección del brazo por parte de los animales, cuando se intentó analizar de forma más detallada, agrupando las triadas de elección de brazo de diez en diez, sólo se pudo observar la tendencia de ambos grupos, antagonistas y agonistas, a llevar a cabo, bien de manera más inadecuada (en los tratados con

antagonistas), o bien de forma más adecuada (en los tratados con agonistas), la alternancia correcta (Figura 24).

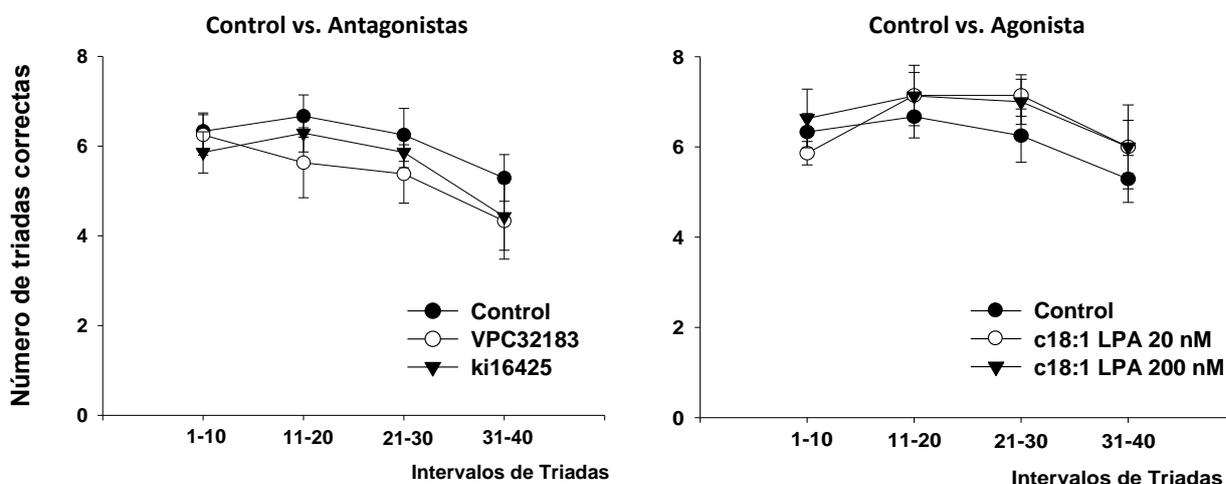


Figura 24. Número de alternancias realizadas en el laberinto en Y. Ambas gráficas muestran el análisis por triadas en grupos de diez y demuestran la tendencia seguida por los animales tras el tratamiento farmacológico. Así, los grupos de ratones tratados con los antagonistas VPC 32183 y Ki16425 tendieron a mostrar un menor número de alternancias correctas que el grupo control, mientras que el grupo tratados con el agonista mostraron tendencia a aumentar el número de triadas correctas.

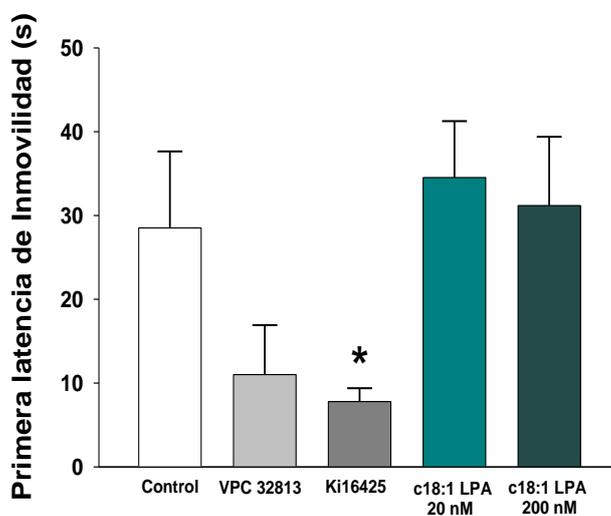
3.1.3 Comportamiento de afrontamiento pasivo y activo

El test de natación forzada permite estudiar conductas de indiferencia frente a lo que deberían ser respuestas innatas de supervivencia. Es una prueba donde el animal mostraría, ante una situación límite (un ratón forzado a responder tras ser colocado en un recipiente con agua), un comportamiento activo, o bien pasivo, asociado éste último, generalmente, a una conducta de tipo depresiva (revisado en Petit-Demouliere et ál., 2005). En esta prueba se valoró la latencia de la primera inmovilidad, las conductas pasivas, definidas paramétricamente como *inmovilidad* y las conductas activas, definidas como *natación* y *escalada* (instinto de escape) del animal ante el paradigma sin solución que se le presenta. Las conductas pasivas y activas fueron evaluadas en los últimos 4 minutos de la prueba. El análisis mediante ANOVA de una vía mostró que hubo un efecto significativo del tratamiento para la latencia de la primera inmovilidad ($F_{(1,45)} = 3,221$; $p < 0,021$, Figura 25A) (medias \pm SEM (s):

control: $28,5 \pm 9,1$; VPC 32183: $11 \pm 5,9$; Ki16425: $7,8 \pm 1,6$; LPA 20nM: $34,5 \pm 6,7$; LPA 200 nM: $31,2 \pm 8,2$), la conducta de inmovilidad ($F_{(1,45)} = 10,04$; $p < 0$, Figura 25B) (medias \pm SEM (%): control: $59,3 \pm 4,1$; VPC 32183: $68,2 \pm 2$; Ki16425: $70,3 \pm 2,4$; LPA 20nM: $50,1 \pm 2,6$; LPA 200 nM: $49,1 \pm 3,7$) y las conductas activas ($F_{(1,45)} = 9,656$; $p < 0$) (medias \pm SEM (%): control: $40,7 \pm 4,1$; VPC 32183: $31,8 \pm 2,2$; Ki16425: $29,3 \pm 2,4$; LPA 20nM: $49,9 \pm 2,6$; LPA 200 nM: $50,9 \pm 3,7$). Las comparaciones *post hoc* mostraron que, de manera significativa y comparados con el grupo control (vehículo): a) el grupo de animales tratados con el antagonista Ki16425 presentó una menor latencia de la primera inmovilidad ($p < 0,038$, Figura 25A); b) los grupos de animales tratados con los antagonistas VPC 32183 y Ki16425 mostraron un incremento en el tiempo de inmovilidad ($p < 0,046$, $p < 0,015$, respectivamente, Figura 25B) y c) los grupos de animales con el agonista LPA (a 20 y 200 nM) mostraron, por el contrario, una disminución de la inmovilidad ($p < 0,045$, $p < 0,025$, respectivamente, Figura 25B). En cuanto a la conducta de natación, siempre respecto al grupo tratado con el vehículo, únicamente los grupos tratados con LPA (a 20 y 200 nM) mostraron un mayor tiempo nadando ($p < 0,023$, $p < 0,031$, respectivamente).

Estos datos sugieren que el receptor LPA₁ interviene en la regulación del comportamiento de afrontamiento activo del animal, ya que su bloqueo a través de los antagonistas de manera continuada produce un comportamiento de tendencia depresiva. Por contra, cuando la activación del receptor es mediada por LPA exógeno favorece la conducta activa del animal, apoyando estos datos, así, la posibilidad de regulación farmacológica de estas conductas.

A)



B)

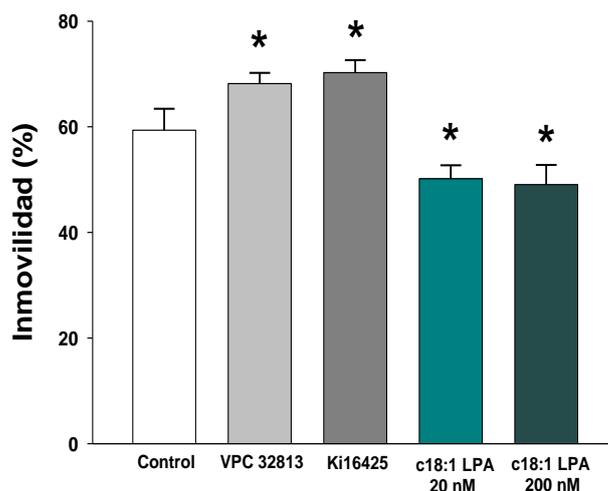


Figura 25. Conductas registradas en el test de natación forzada. (A) Los grupos de ratones tratados con los antagonistas VPC 32183 y Ki16425 tienen a tardar muy poco tiempo en presentar una primera inmovilidad, siendo significativa a esta conducta en el grupo tratado con Ki16425. (B) El análisis de la inmovilidad registrada en los últimos 4 min de la prueba demostró que los grupos de animales tratados con los compuestos antagonistas presentaron un nivel de inmovilidad superior al del grupo control, siendo mayor del $65 \% \pm 2,5 \%$, frente a la reducción observada en el grupo de animales tratados con el agonista LPA (20 nM y 200 nM), con niveles por debajo del $50 \% \pm 3,2 \%$.

3.2 Neurogénesis

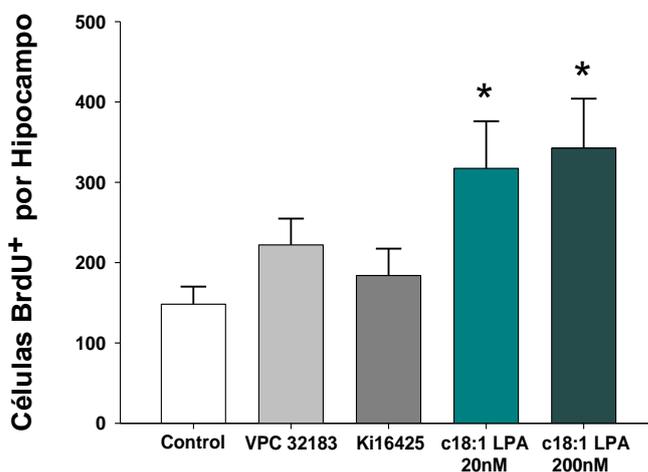
Como se ha mencionado en la introducción, los estudios llevados a cabo hasta la fecha por nuestro grupo de investigación con los ratones *Málaga* carentes del receptor LPA₁ han demostrado la necesidad del mismo para la proliferación y diferenciación de los precursores neuronales durante el desarrollo y en el cerebro adulto y que dicha vía de señalización es participe en la respuesta neuronogénica mediada por estímulos externos, en la modulación de respuesta ante factores inhibidores de la neurogénesis, y en los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje así como de conductas emocionales paralelas a ellos (Estivill-Torrús et ál., 2008; Matas-Rico et ál., 2008; Santín et ál.; 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010, 2011, 2012, 2013). Los trabajos previos de administración de agonistas y antagonistas con efectos sobre diferentes procesos cognitivos y emocionales (Dash et ál., 2004; Pedraza et ál., 2013; Castilla-Ortega et ál., 2014) demuestran la posibilidad de regulación farmacológica. Por todo ello, de manera lógica y entre otras razones, en nuestro estudio se analizó la respuesta neuronogénica

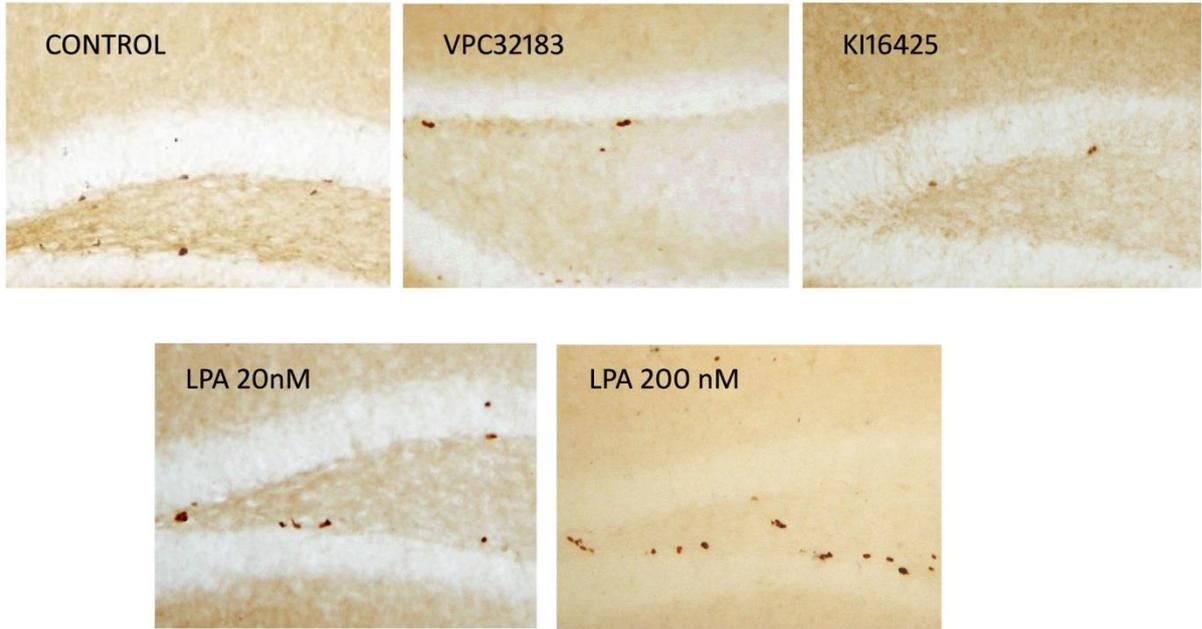
en relación a las pruebas de conducta expuestas en este capítulo, a objeto de inferir correlaciones y asociaciones entre estos procesos.

3.2.1 Proliferación celular y desarrollo de las nuevas neuronas

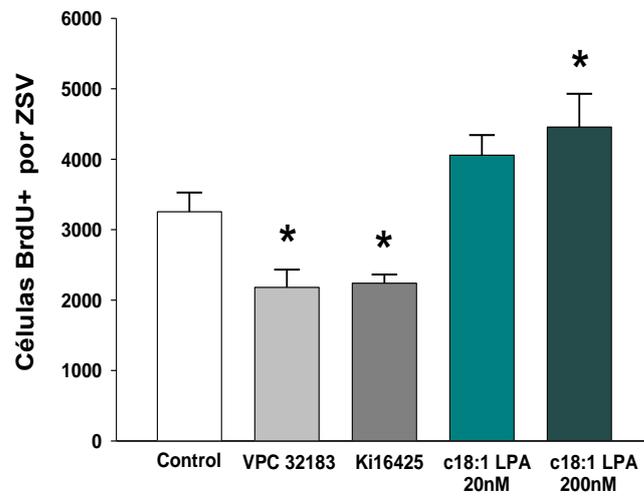
La proliferación celular se estudió en la ZSG del hipocampo y en la ZSV por medio de la administración (en los últimos 4 días anteriores a la perfusión) de BrdU y su posterior inmunotinción y cuantificación. Los análisis mostraron que, a nivel del hipocampo, hubo un efecto del tratamiento ($F_{(1,25)} = 4,247$; $p < 0,009$) (medias \pm SEM (nº células BrdU⁺): control: $148,3 \pm 21,8$; VPC 32183: $222 \pm 32,8$; Ki16425: $184 \pm 33,4$; LPA 20nM: $317,3 \pm 58,7$; LPA 200 nM: $342,6 \pm 61,5$) correspondiente a una mayor estimulación de la proliferación en los grupos de ratones tratados con LPA (a 20 y 200 nM, LSD: $p < 0,035$, $p < 0,001$ respectivamente, Figura 26A). El tratamiento con los antagonistas VPC 32183 y Ki16425 no fue capaz de generar una inhibición y reducción de la proliferación en la ZSG hipocampal. Sin embargo, el tratamiento con los antagonistas sí que produjo un deterioro notable en la proliferación celular en la ZSV ($F_{(1,25)} = 11,038$; $p < 0$, LSD: control vs. VPC32183 $p < 0,024$; control vs. Ki16425 $p < 0,032$, Figura 26B) (medias \pm SEM (nº células BrdU⁺): control: $3253,2 \pm 274,2$; VPC 32183: $2180 \pm 252,2$; Ki16425: $2240 \pm 123,2$; LPA 20nM: $4051,2 \pm 285,7$; LPA 200 nM: $4456,8 \pm 471,8$), proliferación que, de manera correspondiente, se vio mayoritariamente favorecida de manera significativa por el tratamiento con LPA a 200 nM (LSD: control vs. LPA 200 nM $p < 0,013$) mostrando igualmente una tendencia al aumento con el tratamiento de LPA a 20 nM si bien no alcanzó valor estadísticamente significativo (LSD: control vs. LPA 20 nM $p < 0,08$).

A) Proliferación en la zona subgranular





B) Proliferación en la zona subventricular



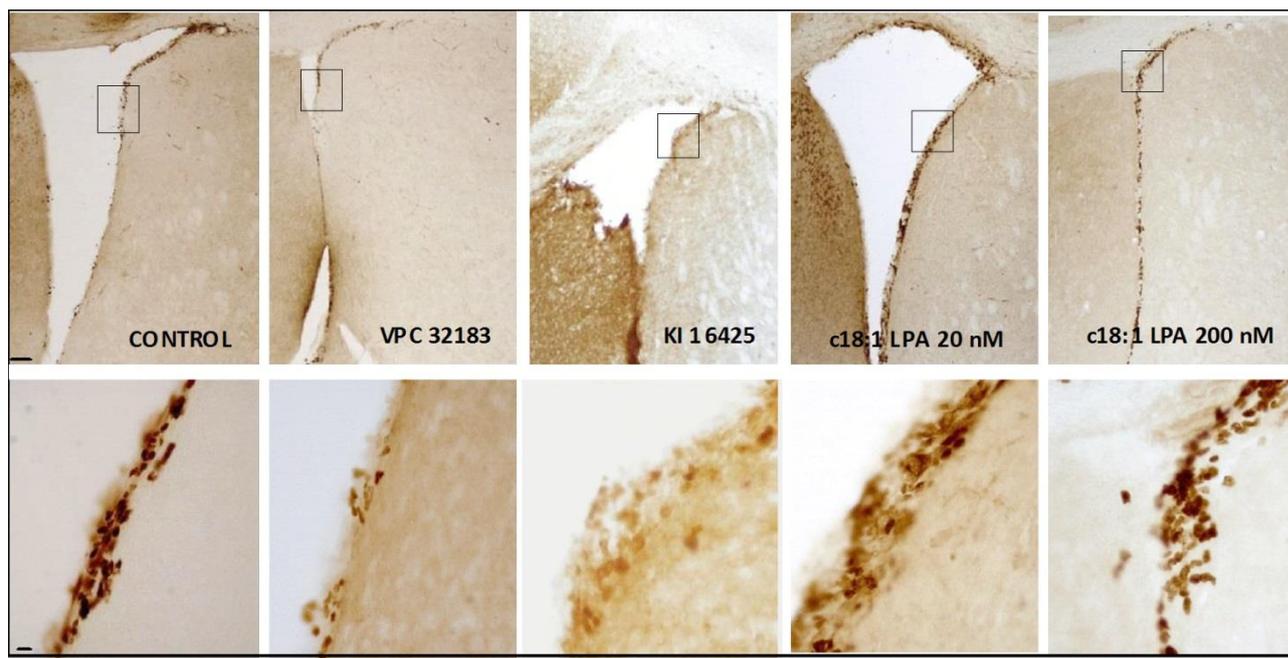
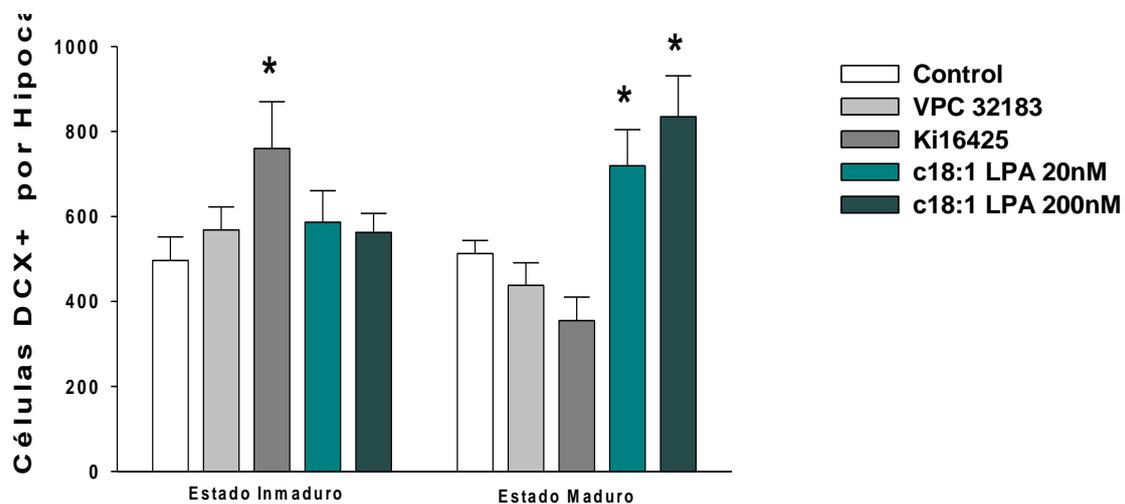


Figura 26. Proliferación celular en la ZSG y en la ZSV. Las gráficas muestran el número de células por área evaluada, para cada tratamiento, y expresadas como medias \pm SEM. LSD: diferencias con el grupo control (* $p < 0,05$). Las imágenes son representativas de cada una de las situaciones experimentales, mostrando la inmunodetección de células BrdU⁺. En las correspondientes a la ZV, las imágenes inferiores son ampliaciones de la zona marcada con el cuadrado. Escalas: panel superior, 100 μ m y panel inferior, 20 μ m

Una vez determinada la población proliferativa de las áreas neuronogénicas en cada tratamiento, por su implicación en la conducta, se analizó la neurogénesis propiamente dicha en el giro dentado del hipocampo mediante el uso de un marcador neuronal, en este caso el marcador endógeno DCX, específico de neuronas inmaduras (Nacher et ál., 2001) y que permite estudiar no sólo el número de neuronas inmaduras sino su grado de maduración en esa etapa inicial (Plümpe et ál., 2006). Tras la inmunodetección y posterior cuantificación respecto al grupo control, los análisis revelaron que en el grupo de animales tratados con el antagonista Ki16425 tuvo lugar un incremento significativo del número de neuronas jóvenes en la etapa inmadura (definida como el estado proliferativo e intermedio donde la neurona aparece con una o dos dendritas de corta longitud; Plümpe et ál., 2006) (LSD: control vs. Ki16425 $p < 0,022$, Figura 27) (medias \pm SEM (nº células DCX⁺ en la etapa inmadura): control: 504,9 \pm 63,3; VPC 32183: 508,3 \pm 68,8; Ki16425: 760 \pm 161,3; LPA 20nM: 586,5 \pm 74,1; LPA 200

nM: $562,3 \pm 44,9$). Este incremento, en el caso de los animales tratados con VPC 32183, no llegó a ser significativo y sólo se registró la tendencia marcada por el antagonista. Por contra, en los grupos de animales tratados con el agonista LPA, tanto a 20 nM como a 200 nM, se observó un incremento del número de neuronas jóvenes en etapa madura (definida como el estado postmitótico donde la neurona presenta una dendrita arborizada, Plümpe et ál., 2006) (LSD: control vs. LPA 20 nM $p < 0,044$; control vs. LPA 200 nM $p < 0,009$) (medias \pm SEM (nº células DCX⁺ en la etapa madura): control: $488,6 \pm 66,5$; VPC 32183: $419,1 \pm 60,3$; Ki16425: $358 \pm 66,5$; LPA 20nM: $704,3 \pm 91,9$; LPA 200 nM: $834,9 \pm 96,3$). Paralelamente, los grupos de animales tratados con los antagonistas Ki16425 y VPC 32183 presentaron una reducción de neuronas jóvenes de etapa madura, particularmente en los tratados con Ki16425, aunque no fue estadísticamente significativa (LSD: control vs. Ki16425 $p < 0,062$). En términos globales, únicamente el grupo de animales tratados con LPA a 200 nM aumentó significativamente el número total de DCX⁺ en comparación con el grupo control ($p < 0,043$) (medias \pm SEM (nº células DCX⁺ total): control: $993,5 \pm 64,9$; VPC 32183: $927,4 \pm 64,6$; Ki16425: $1118 \pm 113,9$; LPA 20nM: $1290,8 \pm 83$; LPA 200 nM: $1397,2 \pm 70,6$). Estos datos están en la línea de los resultados obtenido anteriormente por nuestro grupo de investigación, demostrando el papel del LPA a través del receptor LPA₁ en la correcta regulación de la neurogénesis hipocampal adulta, así como en la maduración de las células generadas (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011) y en la que tiene lugar en los ventrículos laterales (Matas-Rico et ál., 2009). Como se acaba de mostrar, estos procesos son lo que están, particularmente afectados cuando se produce una inhibición de la vía de señalización con antagonistas. Además, los datos mostrados avalan el potencial regulador de la administración farmacológica para la estimulación exógena de formación de neuronas así como de su diferenciación y maduración.



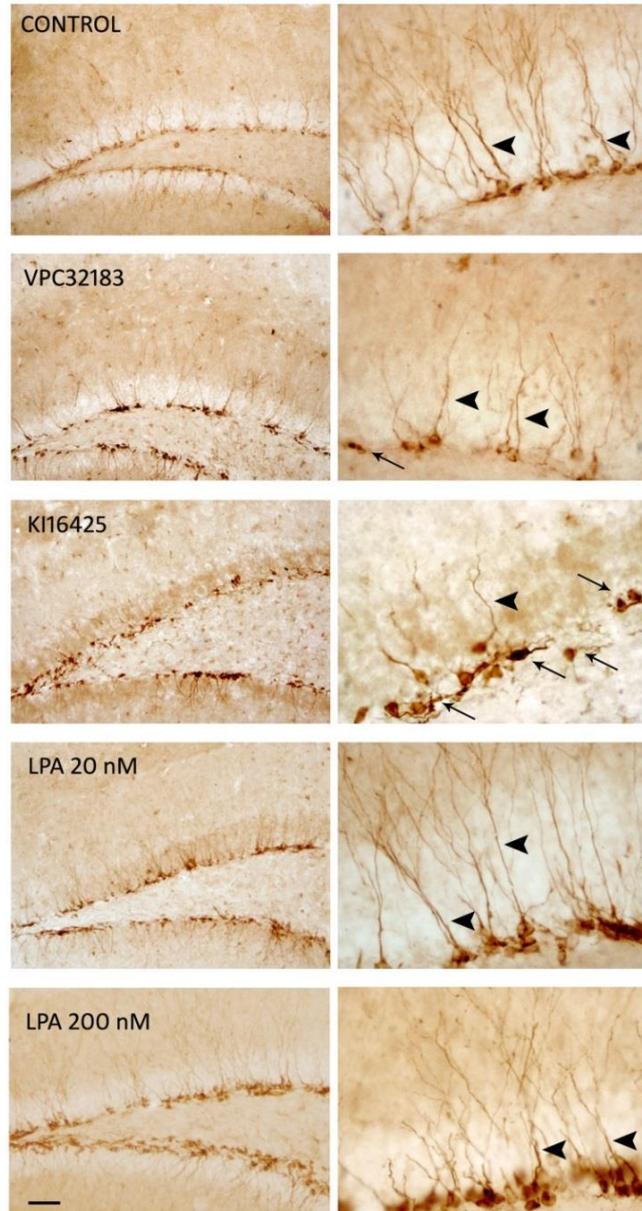


Figura 27. Desarrollo de las nuevas neuronas en la ZSG. Las gráficas muestran el número de neuronas de reciente formación (DCX+) en el giro dentado hipocampal, diferenciadas en estado inmaduro, cuando aún no han podido desarrollar una arborización considerable, y maduro, cuando ésta ya es visible. Se muestran los datos para cada tratamiento, y expresados como medias \pm SEM. LSD: diferencias con el grupo control (* $p < 0,05$). Las imágenes son representativas de cada una de las situaciones experimentales, mostrando la inmunodetección de células DCX⁺. El desarrollo de la arborización de las dendritas (cabeza de flecha) muestra, respecto al control, un mayor nivel en los animales tratados con el agonista. El antagonista, particularmente el Ki16425 no sólo impide el desarrollo de la misma sino que provoca una mala diferenciación, siendo frecuente, observar neuronas muy inmaduras incapaces de orientar sus procesos radialmente (flechas). Escalas: panel izquierdo, 100 μ m y panel derecho, 20 μ m.

3.3 Apoptosis

Los procesos de neurogénesis hipocampal, así como la resolución de las conductas dependientes de ellos, precisan de una correcta regulación de los mecanismos de muerte celular programada (Buss et ál., 2006; Dupret et ál., 2007; Kim et ál., 2009; revisado en Kim y Sun, 2011). Por otra parte, los datos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que la ausencia de la vía mediada por el receptor LPA₁, además de impedir una correcta neurogénesis, conllevan un aumento de apoptosis durante el desarrollo cortical (Estivill-Torrús et ál., 2008) y, en el giro dentado hipocampal de animales sometidos a estrés crónico (Castilla-Ortega et ál., 2011). Además, son numerosos los estudios que describen efecto exógeno de LPA sobre el control de la muerte celular neuronal (Kingsbury et ál., 2003; Sun et ál., 2010). Es por ello que se consideró preciso estudiar los mecanismos de apoptosis que podrían concurrir con los resultados obtenidos a nivel de conducta y neurogénesis bajo el tratamiento farmacológico.

El estudio de la muerte celular se realizó en la zona del giro dentado del hipocampo. El análisis estadístico mostró que hubo un efecto del tratamiento ($F_{(1,25)} = 2,861$, $p < 0,044$) (medias \pm SEM (nº núcelos apoptóticos): control: $4,5 \pm 0,9$; VPC 32183: $8 \pm 1,3$; Ki16425: $10,4 \pm 2,1$; LPA 20nM: $4,8 \pm 1,6$; LPA 200 nM: $4,7 \pm 1,6$) en el grupo de animales tratados con el antagonista Ki16425, que mostró un mayor número de núcleos apoptóticos ($p < 0,012$, Figura 28) con respecto al grupo control. En el caso de los animales tratados con el antagonista VPC 32183 aumentó el número de núcleos aunque no mostró un efecto significativo. Los animales tratados con LPA mostraron valores similares a los del grupo control, lo que sugiere ausencia de alteraciones celulares significativas por efecto exógeno, siendo únicamente los procesos celulares asociados a la inhibición o al bloqueo de la señal por el receptor LPA₁ los que se acompañaron de incremento de muerte celular.

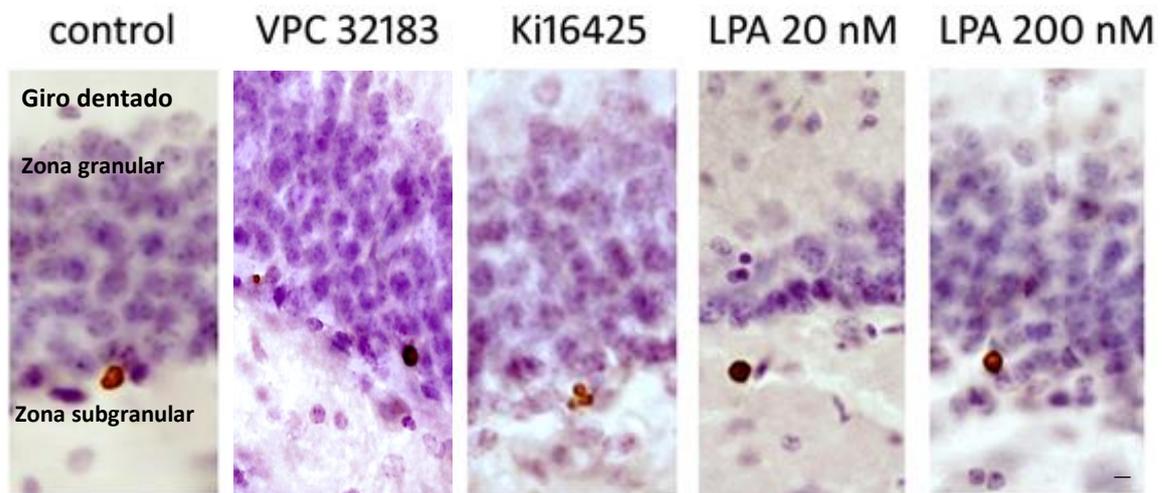
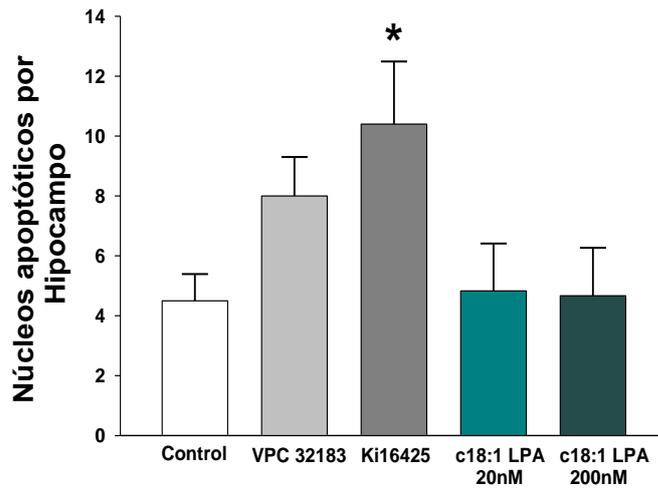


Figura 28. Apoptosis en la zona del giro dentado. Las gráficas muestran el número de núcleos apoptóticos en el hipocampo, para cada tratamiento, y expresadas como medias \pm SEM. Únicamente los animales tratados con antagonistas mostraron variación en el número de núcleos apoptóticos, con tendencia al aumento, en el caso de los tratados con VPC 32183, e incremento significativo, en el caso de los tratados con Ki16425. Imágenes representativas, para cada situación experimental, de núcleos apoptóticos (en marrón) localizados en la ZSG, considerados para la cuantificación en el hipocampo. LSD: diferencias con el grupo control (* $p < 0,05$). Escala imágenes: 20 μ m.

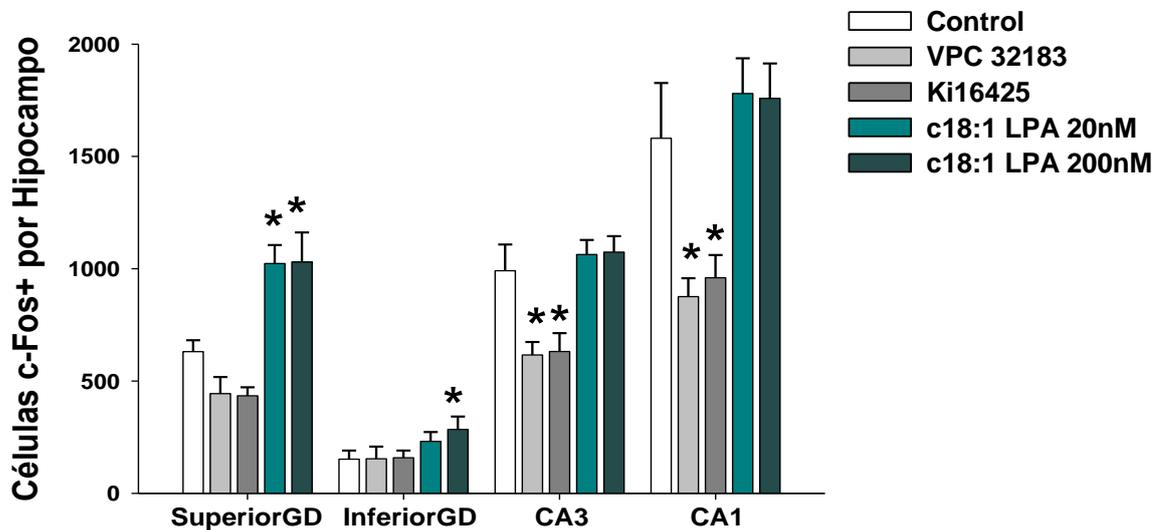
3.4 Actividad neuronal hipocampal

La actividad neuronal fue estudiada analizando la expresión del gen temprano *c-fos*, habida cuenta de su rápida expresión en neuronas cuando son estimuladas (Sagar et ál., 1988; Berghorn et ál., 1994), incluidas las de la zona hipocampal, comprendiendo el giro dentado (Reul et ál., 2009; Stone et ál., 2011; Trollope et ál., 2012). Además, estudios previos de nuestro grupo de investigación han mostrado tasas anómalas de actividad neuronal hipocampal en ausencia de la vía de señalización por LPA₁ (Castilla-Ortega et ál., 2012). Por ello mostraba especial interés, en nuestro caso, observar las variaciones de actividad neuronal hipocampal tras tratamiento farmacológico con los agonistas y antagonistas estudiados, para buscar correlación con los resultados histológicos y de conducta, así como valorar la actividad neuronal hipocampal en condiciones de antagonismo de la vía.

El análisis en el hipocampo se realizó en las regiones de giro dentado (GD) (zona superior e inferior), CA1 y CA3. Los análisis mediante ANOVA de una vía mostraron un efecto del tratamiento sobre el número de células c-Fos⁺ en las zona superior del GD ($F_{(1,25)} = 14,695$, $p < 0$) (medias \pm SEM (nº células c-Fos⁺): control: $631 \pm 50,9$; VPC 32183: $444 \pm 74,1$; Ki16425: $434,4 \pm 37,8$; LPA 20nM: $1023 \pm 82,4$; LPA 200 nM: $1030 \pm 131,7$), CA3 ($F_{(1,25)} = 11,629$, $p < 0$) (medias \pm SEM (nº células c-Fos⁺): control: $991 \pm 116,6$; VPC 32183: $616 \pm 57,5$; Ki16425: $631,2 \pm 81,9$; LPA 20nM: $1063 \pm 65,1$; LPA 200 nM: $1074 \pm 70,9$) y CA1 ($F_{(1,25)} = 10,068$, $p < 0$) (medias \pm SEM (nº células c-Fos⁺): control: $1581 \pm 246,2$; VPC 32183: $876 \pm 81,5$; Ki16425: $960 \pm 100,7$; LPA 20nM: $1780 \pm 156,9$; LPA 200 nM: $1758 \pm 155,7$). Sumando el número total de células c-Fos⁺ en el hipocampo, el análisis mostró también un efecto del tratamiento ($F_{(1,25)} = 14,134$, $p < 0$) (medias \pm SEM (nº células c-Fos⁺ total): control: $3203 \pm 137,9$; VPC 32183: $1936 \pm 71,1$; Ki16425: $2025,6 \pm 73,5$; LPA 20nM: $3866 \pm 101,5$; LPA 200 nM: $3862 \pm 119,4$). Las comparaciones *post hoc* mostraron un aumento significativo del número de células c-Fos⁺ en la región superior del GD en los animales tratados con LPA a 20 y 200 nM ($p < 0,006$, $p < 0,001$, respectivamente) así como en el número total de células c-Fos⁺ en el hipocampo, siendo significativo para el grupo LPA a 200 nM ($p < 0,038$), todos los datos siempre en comparación con el grupo control. Además, los grupos de animales tratados con los antagonistas VPC 32183 y Ki16425 presentaron una reducción del número de células c-Fos⁺ en la región CA1 ($p < 0,001$, $p < 0,008$, respectivamente), en la región CA3 ($p < 0,001$, $p < 0,004$, respectivamente), Figura

29) y por tanto, una reducción global en el hipocampo ($p < 0,001$, $p < 0,007$, respectivamente) con respecto con el grupo control.

Estos datos demuestran un nivel de actividad hipocampal mediado por LPA en aquellas regiones donde el mismo agonismo generará respuesta proliferativa y estimulación de maduración neuronal con arborización dendrítica, es decir, un hipocampo estimulado. A su vez, muestran inhibición de actividad neuronal, por debajo de los niveles basales control, en el hipocampo de animales tratados con los antagonistas de la vía de señalización, y de acuerdo, en cierto modo, con lo que se esperaría de un hipocampo donde las respuesta neurogénica y de diferenciación neuronal no van a ser correctas.



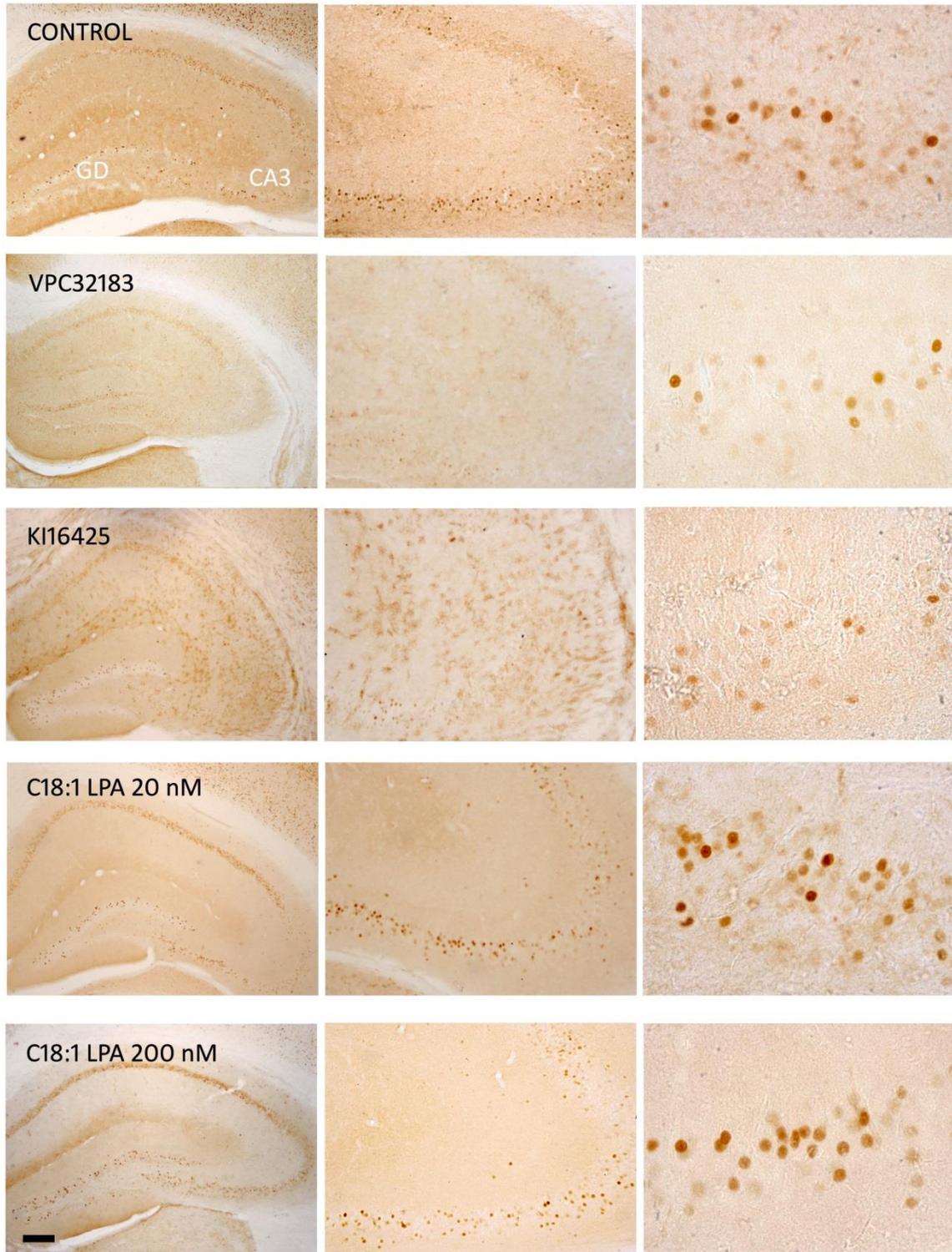


Figura 29. Actividad neuronal en la región del hipocampo: zona superior de GD, zona inferior del GD, CA3 y CA1. Las gráficas muestran el número de células c-Fos⁺ en el hipocampo, para cada tratamiento, y expresadas como medias \pm SEM. LSD: diferencias con el grupo control (* $p < 0,05$). Las imágenes son representativas de cada una de las situaciones experimentales, mostrando la

inmunodetección de células c-Fos⁺ en el hipocampo (panel izquierdo), área CA3 hipocampal (panel central) y aumento con detalle de la expresión en CA3. Escalas: panel izquierdo, 200 μm; panel central, 100 μm; y panel derecho, 20 μm.

3.5 Regulación del receptor LPA₁ y de la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII)

Dos fueron los aspectos analizados sobre los extractos proteicos de los animales tratados con los diferentes fármacos. De una parte, la expresión de los receptores LPA₁₋₃, por ser las dianas de los fármacos utilizados (aún cuando se trabajara a concentraciones cercanas a la constante de mayor afinidad por el receptor LPA₁) y a fin de saber si el tratamiento, además de modular la señalización, puede incidir, de alguna manera en la expresión de los receptores. De otra, la expresión de la enzima CaMKII. Los estudios de Pilpel y Segal (2006) han demostrado el papel del LPA, a través del receptor LPA₁, en la formación de la sinapsis en las espinas dendríticas, donde se distribuye ampliamente. Es en esas sinapsis donde, por otra parte, Musazzi et ál. (2011) analizando sinaptosomas de hipocampos de ratones carentes del receptor LPA₁, observaron alteraciones de los niveles de fosforilación de las isoformas alfa y beta de CaMKII, afectando a la regulación sináptica, dependiente de ello. La participación de esta molécula en la potenciación a largo plazo y la excitabilidad neuronal, modulando la transmisión glutamatérgica (Lisma et ál., 2002) la convierten de interés para nuestros estudios, sumado a las alteraciones glutamatérgicas presentes en el hipocampo en ausencia del receptor LPA₁ (Harrison et ál., 2003; Roberts et ál., 2005; Cunnigham et ál., 2006; Blanco et ál., 2012). El estudio de la expresión del receptor LPA₁ y la isoforma alfa de la CaMKII en su forma inactiva (no fosforilada) y activa (fosforilada en el residuo treonina 286) se realizó a través de *western blot*.

Cabe decir que, si bien el estudio incluyó también el análisis de los receptores LPA₂ y LPA₃, de cara a observar cualquier variación en la expresión de los receptores sobre los que podrían actuar los fármacos administrados, en ninguno de los dos casos fue posible apreciar una señal significativa detectable con el protocolo utilizado y usando diferentes anticuerpos de diferentes casas comerciales. Tampoco existe precedente en la literatura. No obstante, en trabajos previos de nuestro grupo se ha descrito en la misma cepa de ratón, mediante PCR a

tiempo real, ausencia de niveles detectables de expresión para el receptor LPA₂ a nivel hipocampal (García-Díaz, 2010). El mismo trabajo demostró que la expresión del receptor LPA₃ en el hipocampo de ratones nulos para el receptor LPA₁ no experimentaba variación alguna respecto al animal normal. Por todo ello, pensamos que, no parece probable que esta expresión pudiera verse afectada de manera significativa en nuestro estudio.

El análisis mediante ANOVA de una vía mostró que apenas existía variación en la expresión del receptor LPA₁ con respecto a la constitutiva de la GAPDH, y en relación a los diferentes tratamientos por comparación con el grupo control, a excepción, llamativamente del grupo de animales tratados con el antagonista Ki16425, que mostró una reducción de expresión significativa ($F_{(1,5)} = 29,273$, $p < 0,001$, LSD: control vs. Ki16425: $p < 0,0001$, Figura 30) (medias \pm SEM: 0,63 \pm 0,03; VPC 32183: 0,67 \pm 0,03; Ki16425: 0,43 \pm 0,03; LPA 20 nM: 0,69 \pm 0,04; LPA 200 nM: 0,68 \pm 0,01). Así, los datos muestran que el agonista LPA no parece generar desensibilización del receptor por la exposición continuada del agonista, mientras que, los antagonistas VPC 32183 y Ki16425, por su parte, muestran diferente resultado, especialmente en el caso de Ki16425 que es capaz de generar efecto sobre la expresión del receptor, sugiriendo agonismo parcial en su efecto, de acuerdo a otros estudios previos (Moughal et ál., 2006).

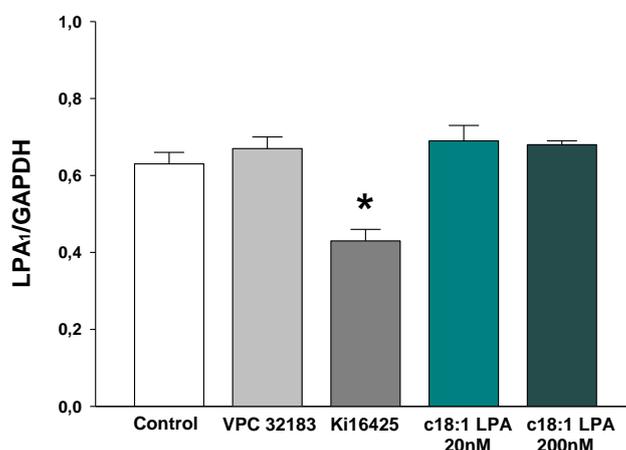
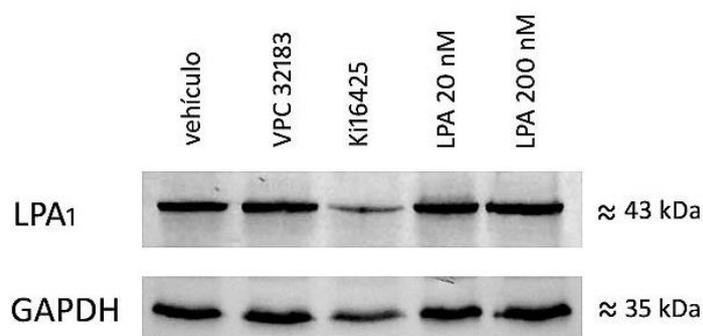


Figura 30. Semicuantificación del receptor LPA₁ en extractos de hipocampos derechos. Se muestran las bandas detectadas, representativas de la expresión del receptor LPA₁ y de la constitutiva de GAPDH, para los diferentes tratamientos. La gráfica muestra la proporción de expresión LPA₁/GAPDH a nivel de hipocampo y para cada tratamiento, expresadas como medias \pm SEM. No hubo diferencias significativas, a excepción de la reducción observada para el grupo de animales tratados con el antagonista ki16425 ($p < 0,0001$).

Por otra parte, el ANOVA de una vía para el análisis de expresión de α CaMKII mostró que hubo una disminución significativa de expresión de la forma inactiva de la proteína en el caso de los animales administrados con antagonista ($F_{(1,5)} = 3,691$, $p < 0,009$, LSD: VPC 32183 vs. control $p = 0,029$; Ki16425 vs. control $p = 0,0035$, Figura 31) (medias \pm SEM: 0,83 \pm 0,03; VPC 32183: 0,67 \pm 0,03; Ki16425: 0,67 \pm 0,04; LPA 20 nM: 0,74 \pm 0,01; LPA 200 nM: 0,77 \pm 0,05). En cambio, para el grupo de animales tratados con agonista (c18:1 LPA a 20 y a 200 nM) la expresión se mantuvo similar al grupo control (Figura 31). La subunidad alfa de la proteína CaMKII puede ser fosforilada a través del aminoácido treonina 286 (p-Thr²⁸⁶ α CaMKII) manteniéndose activa aún sin estar presente el calcio o la calmodulina prolongando su efecto (Yang y Schulmann, 1999). El ANOVA de una vía mostró que hubo diferencias significativas entre el tratamiento de LPA a 200 nM con respecto al control ($F_{(1,5)} = 3,097$, $p < 0,06$, LSD: control vs. LPA 200nM: $p < 0,034$, Figura 31) mostrándose un aumento de expresión, y sin que hubiera variación alguna en el resto de grupos experimentales, a excepción de una tendencia en el grupo tratado con agonista a 20 nM, que registró la tendencia, significativa a mayor concentración. Los resultados sugieren, por tanto, alteraciones del equilibrio entre las formas activa e inactiva de la proteína CaMKII, con patrón de inhibición de la forma inactiva cuando el tratamiento conlleva antagonismo del receptor LPA₁, y patrón estimulador de la forma activa tras tratamiento con agonista.

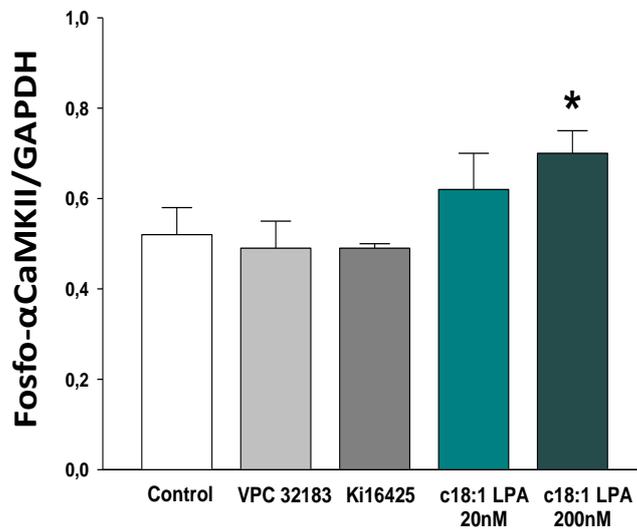
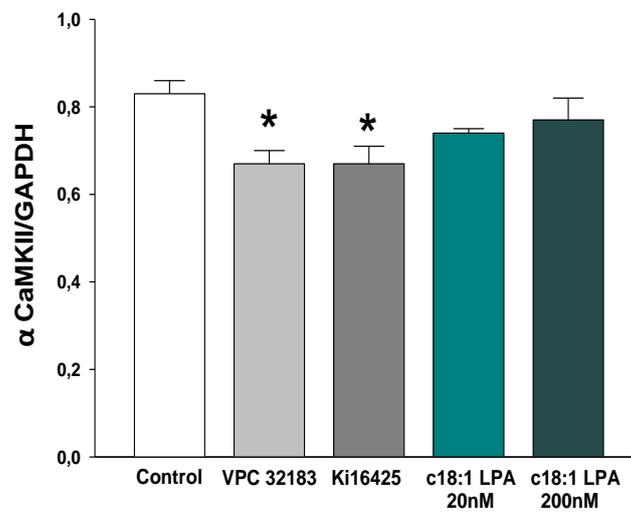
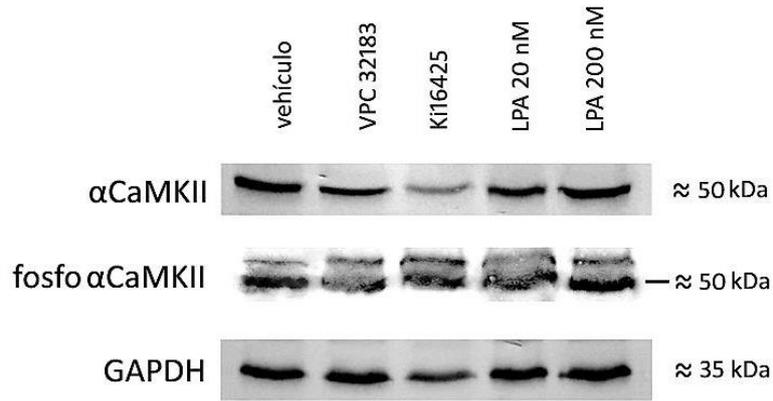


Figura 31. Semicuantificación de la proteína α CaMKII en su forma inactiva y activa (fosforilada) en extractos de hipocampos derechos. Se muestran las bandas detectadas, representativas de la expresión, tras cada tratamiento, de α CaMKII y fosfo- α CaMKII así como de la constitutiva de GAPDH. Las gráficas muestran la proporción de expresión α CaMKII /GAPDH y fosfo-

α CaMKII /GAPDH a nivel de hipocampo y para cada tratamiento, expresadas como medias \pm SEM. Se observó una disminución de la expresión de la proteína α CaMKII inactiva en los grupos tratados con VPC 32183 y Ki16425, así como una tendencia e incremento significativo de la forma fosforilada de la proteína, en los grupos tratados con el agonista, a 20 y a 200 nM, respectivamente. LSD: diferencias con el grupo control (* $p < 0,05$).

3.6 Control rutinario de inflamación

A objeto de descartar que los efectos observados pudieran verse afectados por procesos inflamatorios locales asociados a la propia colocación de la cánula para la administración farmacológica, se estudió el área ipsilateral a la zona de inyección, realizando análisis histológico para la astrogliosis (GFAP⁺), microglía (Iba1⁺) y para valorar la presencia, o no, de infiltrados de poblaciones T linfocitarias (CD3⁺). Si bien éste no fue un resultado de la investigación, como tal, sino un control de validez experimental, por evitar que no quedase correctamente aclarado en la sección de métodos, se expone aquí esta consideración.

En todos los casos y, después de 21 días de tratamiento, el análisis mediante inmunohistoquímicas en la ZSV, junto a la región del ventrículo donde se colocó la cánula, mostró ausencia de astrogliosis, de microglía reactiva, y de linfocitos T en el tejido. No hubo diferencia histológica en ninguno los diferentes tratamientos con los fármacos que permitiera sugerir efecto alguno de la colocación de la cánula sobre el comportamiento del animal ni sobre el resto de los parámetros evaluados.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la validez de la modulación farmacológica mediante administración continuada, de la señalización mediada por el receptor LPA₁ actuando sobre la conducta del animal así como sobre procesos neurobiológicos asociados. A nivel celular, la administración farmacológica actúa sobre: 1) la regulación de la neurogénesis en el adulto en la zona subgranular y en la zona subventricular, 2) la regulación de la maduración de las nuevas neuronas en el hipocampo, 3) la actividad neuronal hipocampal y 4) la regulación de la proteína CaMKII asociada a plasticidad hipocampal. A nivel comportamental los tratamientos actúan sobre: 1) la regulación emocional (ansiedad y conducta de afrontamiento pasivo y activo del animal), 2) la actividad exploratoria y 3) la memoria de trabajo espacial, dependiente de hipocampo.

4.1 Papel del receptor LPA₁ sobre la neurogénesis en el adulto, la muerte celular y la activación neuronal

La alteración de los procesos cognitivos y emocionales que dan lugar a numerosos trastornos psicopatológicos como por ejemplo la depresión, la ansiedad o la esquizofrenia, que, significativamente, empeoran la función del sistema nervioso y degradan la calidad de vida de los sujetos que lo padecen. Una región cerebral importante para los procesos de la consolidación de la memoria, la función cognitiva y la regulación del estado de ánimo es el hipocampo. Una alteración en la neurogénesis hipocampal adulta conlleva a una desregulación funcional ocasionando los trastornos anteriormente citados (Eisch y Petrik, 2012, Jun et ál., 2012).

Por los estudios realizados en nuestro grupo de investigación, conocemos que la neurogénesis hipocampal adulta requiere de la participación del receptor LPA₁, ya que en su ausencia hay una reducción de la proliferación celular y una alteración en la maduración de las nuevas neuronas formadas en la ZSG del hipocampo (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega

et ál., 2011). Los estudios neuroquímicos y conductuales se han sumado a éstos de manera que, en los últimos años, los trabajos realizados por diferentes equipos, así como por nuestro grupo de investigación, han venido a demostrar la relevancia del receptor LPA₁ para el estudio de diferentes patologías psiquiátricas (ver en introducción, revisado en Estivill-Torrús et ál., 2013).

Los resultados de esta Tesis Doctoral confirman la participación del receptor en estos procesos. En relación a la neurogénesis y maduración de las neuronas formadas, el bloqueo permanente del receptor LPA₁, por los antagonistas VPC 32183 y Ki16425, administrados de manera crónica y a concentraciones cercanas de su constante de inhibición, mostraron una reducción de la proliferación celular en la ZSV (células BrdU⁺), de acuerdo a lo observado en animales carentes del receptor LPA₁ (Matas-Rico, 2009). Sin embargo, no se encontró una reducción de proliferación en la ZSG. Esta diferencia pudo ser debida a que los procesos de proliferación en la ZSG y la ZSV están regulados por diferentes mecanismos (revisado en Castilla-Ortega et ál., 2011; Sawada y Sawamoto, 2013) y por los procesos de plasticidad cerebral para contrarrestar los efectos negativos del bloqueo continuado en la ZSG. Así, este bloqueo del receptor LPA₁, debería reducir la activación de las vías asociadas al receptor, tales como G_{αi/o}, G_{αq/11} y G_{α12/13}, disminuyendo los niveles de Rho (Sato et ál., 2005), el flujo del calcio intracelular (Ohta et ál., 2003; Dubin et ál., 2010; Shin et ál., 2012; David et ál., 2012), los niveles de MAPK (Moughal et ál., 2006) y aumentando la acumulación del AMPc (Ohta et ál., 2003). Por tanto, en los animales administrados con los antagonistas del receptor LPA₁, deberían mostrar, una alteración funcional del hipocampo. No obstante, no debemos descartar que, parte de la explicación de que no se encuentren diferencias significativas a nivel de la ZSG con el tratamiento con VPC 32183 y Ki16425 puede deberse a la baja tasa de proliferación en la cepa estudiada en condiciones basales, actuando este factor, en cierto modo, como efecto suelo y forzando a que, únicamente, puedan apreciarse las diferencias cuando el sistema funciona bajo estimulación (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011), como ocurre cuando se administra el agonista LPA.

Por otra parte, los resultados con el tratamiento con VPC 32183 y Ki16425 demuestran una alteración en la maduración de las nuevas neuronas constituidas en la ZSG, destacando un mayor número de células DCX⁺ en estado inmaduro. Estos datos se hallan de acuerdo a los mostrados en los animales carentes del receptor LPA₁, donde la ausencia del receptor genera

una mala diferenciación que conlleva la imposibilidad de numerosas células para adoptar su orientación definitiva que les permita madurar y desarrollar su árbol dendrítico (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011). De manera llamativa, nuestros resultados con el tratamiento antagonista van asociados, además, a un aumento de apoptosis a nivel hipocampal, y es precisamente en la etapa inmadura cuando tiene lugar un incremento de la muerte celular, a objeto de remodelación plástica (Kempermann et ál., 2003; Buss et ál., 2006; Dupret et ál., 2007; Kim et ál., 2009; revisado en Kim y Sun 2011) por lo que, en buena medida, parte de la apoptosis detectada podría ser consecuencia última de la mala diferenciación de las neuronas jóvenes. Así, no es de extrañar que esta incorrecta maduración y el aumento de la muerte celular tendrá, posteriormente, consecuencias sobre la funcionalidad hipocampal, ya que alterará los circuitos maduros, que estarán deficitarios a nivel de integración neuronal por la carencia de neuronas jóvenes, explicando así la reducción de la actividad neuronal en áreas maduras como CA1 y CA3, y el desequilibrio de los niveles de CaMKII respecto a la forma activa, además de los déficits conductuales mostrados dependientes de hipocampo. Por último, es preciso destacar que, dada la corta duración del proceso de apoptosis (Majno y Joris, 1995; Elmore et ál., 2007), la cantidad resultante detectada en nuestro estudio, tras la administración crónica, está, casi con toda seguridad, subestimada respecto al total que se obtendría durante todo el tratamiento efectuado.

La administración crónica de LPA a diferentes concentraciones (20 y 200 nM), generó un aumento en la neurogénesis hipocampal adulta y un mayor número de neuronas jóvenes que alcanzaron una correcta maduración, mostrando su característica arborización dendrítica, siendo más acusado este efecto con el uso de una concentración a 200 nM. El LPA administrado, LPA c18:1, presenta mayor afinidad para el receptor LPA₁ que para el resto de los receptores de LPA (Heise et ál., 2001; Choi et ál., 2010), por tanto, estos resultados sugieren que son debido a la activación del receptor LPA₁. Se ha trabajado con concentraciones muy ínfimas, con excepción de la condición de concentración a 200 nM supra-fisiológicas. La concentración o la dosis administrada de LPA son ciertamente relevantes ya que pueden mostrar un efecto beneficioso o perjudicial para las células. Por ejemplo, a dosis bajas (0,1 ~30 µmol/l) el LPA presenta un efecto protector ante la muerte celular, mientras que a una dosis mayor (por encima de 50 µmol/l) produce lo contrario (Holtsberg et ál., 1998; Zheng et ál., 2004), además de presentar retracción de las neuritas y colapso del

crecimiento del cono axonal a través de las vías de señalización de G_{12/13} (Nurnberg et ál., 2008). En otro estudio, el uso de concentraciones cercanas a las empleadas en esta Tesis Doctoral (entre 10-300 nM), demostró que la administración de LPA sobre cultivos de células progenitoras neuronales, modulaba el flujo de calcio intracelular (Dubin et ál., 2010). Además, hay que destacar que el receptor LPA₁ se expresa también en células gliales (células de Schwann, oligodendrocitos y astrocitos) (revisado en Rivera y Chun, 2008; Choi et ál., 2010; Choi y Chun, 2013). En los astrocitos, la activación del receptor LPA₁ a través de LPA incrementa la diferenciación neuronal, así como la liberación de factores neurotróficos (Spohr et ál., 2008). En cuanto al eje LPA-ATX, a nivel cerebral, se desconoce la concentración de LPA que inhibe a la enzima, aunque se ha descrito que la concentración de ATX es 1,8 veces mayor que en el plasma (Nakamura et ál., 2009). Esto indicaría que la enzima puede ser menos sensible a las concentraciones fisiológicas de LPA en el líquido cefalorraquídeo (Nakamura et ál., 2009).

No se hallaron alteraciones estructurales en el giro dentado del hipocampo ni en la zona ventricular que pudieran dar explicación alternativa a estos resultados. Por tanto, los resultados corroboran el papel y la importancia del receptor LPA₁ tanto en la neurogénesis adulta como para mantener una correcta diferenciación de las nuevas neuronas jóvenes generadas. En este sentido cabe destacar que la estimulación, inducida por la administración de LPA, sobre la neurogénesis hipocampal, desemboca en un aumento de poblaciones celulares maduras. Este aumento va asociado a un mayor número de neuronas activas en giro dentado y sin que venga acompañado de variación en los niveles de apoptosis por lo que cabe esperar que no fuera, en ningún modo, causa de colapso sino de mejor funcionalidad como lo demuestran las pruebas conductuales y, a nivel celular, el aumento de actividad neuronal en el giro dentado, los niveles normales de actividad en las áreas CA1 y CA3 y el aumento de expresión de CaMKII fosforilada.

En cuanto a la expresión de la proteína CaMKII, la subunidad alfa de la proteína se encuentra disminuida en los animales administrados con los antagonistas VPC 32183 y Ki16425 indicando una menor disponibilidad del complejo o bien alteraciones del equilibrio entre la forma inactiva y la fosforilada. Musazzi et ál. (2011) describieron en animales carentes del receptor LPA₁ un incremento únicamente de las formas fosforiladas, sin que hubiera diferencia alguna en la forma inactiva de la isoforma alfa de la enzima. Nuestros resultados

discrepan parcialmente de estas observaciones aunque debe tenerse en cuenta, por una parte, la diferencia experimental entre un animal nulo, medido a condiciones basales, donde, además de defectos desde su desarrollo, no está sometido a ninguna demanda de ejecución, de la presente en nuestra situación experimental, donde el animal completa una administración crónica y una ejecución de diferentes pruebas de comportamiento, existiendo una demanda de actividad hipocampal. Esta menor disponibilidad de CaMKII redonda de una manera u otra en la capacidad de mantener una concentración efectiva de CaMKII fosforilada. De hecho, significativamente, mientras los animales tratados con VPC 32183 y Ki16425, no muestran variaciones en los niveles de CaMKII fosforilada, los animales tratados con agonista LPA a 200 nM sí muestran una mayor cantidad de la forma fosforilada activa de la enzima. Las consecuencias de estas diferencias son más evidentes cuando se ha descrito que dicha actividad favorece las respuestas sinápticas, merced a interacciones con los receptores ionotrópicos de glutamato, con una mayor localización sináptica de los receptores NMDA y AMPA (Musazzi et ál., 2011) y la fosforilación de los receptores AMPA (Kramar et ál., 2003) implicados en la potenciación a largo plazo. Estas alteraciones, en última instancia, determinan parte de la respuesta a nivel conductual, como veremos más adelante y como se ha descrito ampliamente, remarcando el papel de la activación de CaMKII en la ansiedad, el aprendizaje y memoria (Miller et ál., 2002; Du et ál., 2004) aunque, para determinar mejor, en nuestro caso, el peso específico de la modulación de CaMKII mediada por la señalización por el receptor LPA₁, es preciso aún conocer los efectos del tratamiento farmacológico sobre los sistemas glutamatérgicos (alterados en ausencia del receptor LPA₁; Harrison et ál., 2003; Roberts et ál., 2005; Musazzi et ál., 2010; Blanco et ál., 2012) por ser precisamente la interacción del receptor NMDA con CaMKII en los complejos sinápticos la que determina mayoritariamente su actividad (Leonard et ál., 1999; Fink et ál., 2002). Parte de esta explicación puede ofrecerla igualmente los datos observados de actividad neuronal.

Funcionalmente, los estudios de marcadores tempranos de expresión génica, tales como *c-fos*, *arc* o *zif268*, para medir la actividad neuronal (Saffen et ál., 1988; Luckman et ál., 1994) presentan mucho interés, por estar implicados en los mecanismos de la plasticidad sináptica (potenciación a largo plazo) (Tischmeyer y Grimm, 1999; Platenik et ál., 2000). Su aplicación al estudio de neurogénesis hipocampal está bien documentada, principalmente para el análisis de correlación de neurogénesis con aprendizaje y memoria (Reul et ál., 2009;

Stone et ál., 2011; Castell-Ortega et ál., 2012; Trollope et ál., 2012). Los datos obtenidos sugieren que el receptor LPA₁ está implicado en la regulación de la actividad neuronal (Castilla-Ortega et ál., 2012), ya que al ser bloqueado por los antagonistas VPC 32183 y Ki16425, se produce una reducción de la expresión de la proteína c-Fos en el hipocampo, sobre todo en las regiones CA1 y CA3. Estos cambios, demuestran, por una parte, cambios funcionales asociados a déficits neurogénicos que generan un hipocampo anómalo y, por otra, también pueden representar cambios independientes y específicos de la funcionalidad de las neuronas de CA1 y CA3, habida cuenta del papel del receptor LPA₁ a nivel de CA1 (Pilpel y Segal, 2006; Matas Rico, 2009) . La afectación de la actividad de las neuronas de estas áreas sugiere, en relación con lo que comentábamos anteriormente la posibilidad de una reducción efectiva de la transmisión glutamatérgica hipocampal disminuyendo la liberación de glutamato (Roberts et ál., 2005), la alteración de la densidad y actividad de los receptores de glutamato (Musazzi et ál., 2011, Blanco et ál., 2012), la disminución de los complejo de SNARE y la disminución del complejo CaMKII (Musazzi et ál., 2011; y resultados presentados en esta Tesis). En el caso del antagonista Ki16425, al actuar éste sobre los niveles de AMPc, incrementándolos (Ohta et ál., 2003), puede haber ocurrido una mayor fosforilación de la proteína CREB, siendo un importante promotor de la transcripción del gen *c-fos*. Sin embargo, se mostró una reducción de la expresión de la proteína c-Fos, sugiriendo la existencia de otras vías de regulación de CREB, como MAPK o el complejo CaMKIV, que pudieron estar involucradas en la activación del gen (Miyamoto, 2006).

4.2 Papel del receptor LPA₁ sobre la conducta

Además de conllevar los efectos mostrados a nivel celular, el tratamiento farmacológico mediante administración crónica afectó al comportamiento exhibido por los animales en las diferentes pruebas, debido, cuando menos, a tales efectos. En la prueba del campo abierto los animales administrados con el antagonista Ki16425, se caracterizaron por un incremento en la frecuencia de las conductas de valoración de riesgo y de acicalamiento, además de presentar un aumento del número de defecaciones. El grupo administrado con el antagonista VPC 32183, aunque no manifestó grandes diferencias en la actividad exploratoria, sí tuvo una tendencia a aumentar estas variables. Hay estudios que han relacionado el incremento de estas variables con una conducta de tipo ansiosa (Ramos y Mormede, 1998;

Crawley, 1999; Carola et ál., 2002; Ohl et ál., 2002; Kaleuff y Tuohimaa, 2004; Carobrez y Bertoglio, 2005; Lever et ál., 2006). Sin embargo, en otros estudios a las variables de acicalamiento y del número de defecaciones les otorgan un significado independiente (Lister, 1990; Carola et ál., 2002; Ohl et ál., 2002). Los datos presentados concuerdan con nuestros resultados previos con el comportamiento de los animales carentes del receptor LPA₁ (Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010), en los cuales se muestran un déficit en la actividad exploratoria así como un aumento de pautas de tipo ansioso. Por el contrario, una fuente de LPA exógena adicional a nivel cerebral, se caracterizó por una mejora tanto en la actividad locomotora como en la actividad exploratoria ante un contexto novedoso. Se puede deducir, por tanto, que el receptor LPA₁ interviene, y es un factor importante, en este tipo de conductas.

La reducción en las conductas exploratorias en el grupo Ki16425 y en menor medida en el grupo VPC 32183, no se explicaría por un déficit motor ya que sus niveles de actividad locomotoras son similares a los presentados por el grupo control tanto en el campo abierto como en el laberinto en Y. Las conductas de exploración se han relacionado con la función hipocampal dorsal, como la valoración de riesgo (Leon Rodriguez y Duenas, 2013), el acicalamiento (Bortolato et ál., 2011) y la exploración alzada en un contexto novedoso (Deacon et ál., 2002; Lever et ál., 2006). Por este motivo la alteración en el hipocampo que tiene lugar debido al bloqueo del receptor LPA₁, podría explicar las diferencias en la actividad exploratorias.

Por otra parte, se encontraron diferencias entre los distintos tratamientos con respecto al tiempo de permanencia en el centro del campo abierto, con una tendencia a incrementarlo en los animales tratados con LPA, y una reducción del mismo, significativa, en los animales tratados con los fármacos antagonistas VPC 32183 y Ki16425, apoyando claramente el desarrollo de un perfil ansiogénico tras el bloqueo del receptor (Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010). La estimulación de la actividad locomotora y exploratoria en el caso de los animales tratados con el agonista únicamente vino asociada a una ligera tendencia al aumento de permanencia en el campo abierto, si bien es cierto que son varios los estudios que demuestran la falta de correlación entre la ansiedad y la exploración. Es decir, la exploración no depende de los niveles de ansiedad y, al contrario, que el tiempo en el centro no es el resultado de la motivación para explorar ni de la función motora, lo cual no reflejaría el estado

emocional de los animales (Crawley, 1999; Simon et ál., 1994). Por otro lado, recientemente un estudio de nuestro grupo y colaboradores (Castilla-Ortega et ál., 2014) ha mostrado que la administración aguda de LPA genera un perfil ansiogénico en ratas, además de aumentar la inmovilidad en el test de natación forzada. Aunque, a priori, pudiera parecer contradictorio con nuestros resultados, varias son las causas a las que puede atribuirse tal diferencia ya que, además de tratarse de especies diferentes, la pauta de tratamiento es muy diferente (administración aguda frente a crónica) y la dosis administrada del agonista en dicho estudio es mucho más elevada que la utilizada en nuestro trabajo (más restringida al receptor LPA₁) pudiendo dar lugar a efectos diferentes, habida cuenta de los efectos proapoptóticos mediados por LPA y descritos en neuronas hipocámpales de rata expuestas a dosis elevadas del agonista (Holtsberg et ál., 1998) o las acciones duales atribuidas al LPA (Ye et ál., 2002). Además, aumentar la concentración de la dosis supone ampliar la diana farmacológica a otros receptores de LPA presentes en el tejido, como el receptor LPA₅, cuya acción genera efectos opuestos al receptor LPA₁ (Callaerts-Vegh et ál., 2012). En este sentido, la concentración usada y la afinidad por más de un tipo de receptor hace muy probable que la acción del agonista pueda conllevar efectos opuestos con carácter dosis-dependiente. Así, en fibroblastos de tejido cardíaco, que expresan los receptores LPA₁, LPA₂ y LPA₃, el LPA ejerce efecto dual proliferativo y proapoptótico, debido a las diferentes funciones de los subtipos de receptores, según el rango de concentración usado (Cheng et ál., 2006).

Otra función relacionada con el hipocampo es la codificación de la información espacial y no espacial (Morris y Baddeley, 1988; Moyer et ál., 1990; Bunsey y Eichenbaum, 1996), importante para el aprendizaje y la memoria, en la cual también está implicada la corteza prefrontal (Morris et ál., 1982; Kolb, 1984; Eichenbaum, 2000). El receptor LPA₁ se expresa en las neuronas hipocámpales (Allard et ál., 1998; Pilpel y Segal, 2006; Rhee et ál., 2006; Matas-Rico, 2009), donde promueve la formación y diferenciación de las nuevas neuronas (Matas-Rico et ál., 2008) así como la formación de las sinapsis en las espinas dendríticas (Pilpel y Segal, 2004; Pilpel y Segal, 2006) y la regulación del complejo CaMKII (Musazzi et ál., 2011). Nuestro grupo de investigación ha demostrado la implicación del receptor LPA₁ en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo, como el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris y en el de hoyos (Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010), la habituación a largo plazo de la respuesta exploratoria (Castilla-Ortega et ál., 2010), la

memoria episódica (Castilla-Ortega et ál., 2012), el establecimiento de asociaciones droga-contexto (Blanco et ál., 2012) y la extinción de la respuesta de miedo condicionado contextual (Pedraza et ál., 2013). Los resultados mostrados en este trabajo en relación a la prueba del laberinto en Y, muestran que la administración continuada de fármacos antagonistas genera un déficit de la capacidad del animal para elaborar las alternancias de los brazos de manera correcta y apoyan esta misma línea de desarrollo funcional. La validez de la administración farmacológica resulta sumamente interesante en el caso del tratamiento con LPA, que permite mejorar dicha capacidad, actuando como estímulo sobre la memoria, especialmente cuando se aumenta su dosis. De manera significativa, esta respuesta de mejora viene acompañada de una mayor neurogénesis hipocampal, con mayor presencia de neuronas jóvenes maduras, con árbol dendrítico bien desarrollado, así como una mayor cantidad de proteína CaMKII fosforilada, de acuerdo, con ello, con los numerosos estudios que demuestran la correlación entre el número de nuevas neuronas en el giro dentado, su maduración y el rendimiento en tareas de memoria dependientes del hipocampo (revisado en Castilla-Ortega et ál., 2011), así como la implicación de CaMKII en los procesos cognitivos (Miller et ál., 2002). En ese mismo sentido, la peor ejecución por parte de los animales tratados con los fármacos antagonistas, viene asociada, en nuestro estudio, a una maduración hipocampal deficitaria, aumento de apoptosis hipocampal, y a una reducción de la disponibilidad de la forma inactiva de CaMKII. Las implicaciones a nivel terapéutico que ofrecen estos resultados, especialmente la modulación por agonista, son, sin duda alguna, de relevancia, dada la relación de déficits de memoria de trabajo espacial en patologías como la esquizofrenia (Goldman-Rakic, 1994), demencia (Morris y Baddeley, 1998) o trastornos del desarrollo tales como la hiperactividad o el déficit de atención (Barkley, 1997).

En las últimas décadas, el hipocampo se está relacionado con el trastorno depresivo, ya que además de estar implicado en la memoria, también está involucrado en el estado de ánimo (Ming y Song, 2011; Petrik et ál., 2012). El trastorno depresivo es una de las principales causas de discapacidad en el mundo (Tanti y Belzung, 2010), por ello, hay una gran necesidad de mejorar el conocimiento tanto sobre los mecanismos patofisiológicos como sobre los mecanismos neurobiológicos de la terapia con antidepresivos (Eisch y Patrik, 2012). Uno de los requisitos para la acción terapéutica de la mayoría de los antidepresivos es la estimulación de la neurogénesis hipocampal. Sin embargo, el efecto de una reducción de la neurogénesis en la

etiología de los trastornos afectivos no resulta claro (Surget et ál., 2011), postulándose que aunque es un requisito necesario para la respuesta terapéutica, no constituye un factor esencial para la aparición de la sintomatología depresiva. En este sentido, una de las pruebas de comportamiento más comúnmente relacionada con el trastorno depresivo es el test de natación forzada (Porsolt et ál., 1978; revisado en Petit-Demouliere et ál., 2005). Con ella, se puede analizar una de las características clave en la aparición de los trastornos depresivos, como es el de desesperanza. Los resultados que se muestran en esta Tesis Doctoral, sugieren que el receptor LPA₁ podría estar implicado en las conductas de escape del animal en oposición a la conducta desesperada (inmovilidad). Hay un amplio abanico de tratamientos antidepresivos que mejoran las conductas activas (natación y escalada) del animal cuando son expuestos por primera vez al test (Porsolt, 1979; West, 1990; Heninger et ál., 1996; Cryan et ál., 2005; Pittenger y Duman, 2008; Xu et ál., 2008; Osborn et ál., 2013). Continuando con esta línea, la administración crónica de LPA exógeno presenta, por tanto, un efecto beneficioso para el animal. Este efecto positivo, pudo estar relacionado con los cambios neurogénicos inducidos por las nuevas neuronas generadas, sobre todo en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, modulando emocionalmente la conducta del animal (Petrik et ál., 2012). En el caso contrario, el bloqueo continuo del receptor LPA₁, mediante la administración de VPC 32183 y Ki16425, ocasionó un incremento de la conducta desesperada, creemos que debido, fundamentalmente, a una alteración funcional del hipocampo influyendo ésta en la actividad neuronal de las áreas conectadas a él y relacionadas con la regulación emocional, como son la amígdala, la corteza prefrontal y el núcleo accumbens (Maren y Hobin, 2007).

Por otra parte, la inmovilidad registrada en el test de natación forzada, no pudo verse afectada por un déficit motor ya que en las pruebas analizadas los animales administrados con VPC 32183 y Ki16425 mostraron una locomoción similar al grupo control. Es decir, la inmovilidad fue ocasionada al efecto del bloqueo del receptor debido, fundamentalmente, a los déficits a nivel de hipocampo que genera el tratamiento. Como antes hemos mencionado, recientemente se ha descrito por parte de colaboradores y parte de nuestro grupo, cómo la administración aguda de LPA aumentaba la inmovilidad en el test de natación forzada (Castilla-Ortega et ál., 2014). E igualmente hemos expresado algunas de las razones por las que consideramos que ambos estudios difieren y no caen, por tanto, en la contradicción.

Además de las razones expuestas anteriormente hay factores que son específicos de este test, como para influir más aún en la divergencia. Así, en nuestro estudio, los animales, tras 21 días de tratamiento son expuestos a una batería de pruebas, ordenadas de acuerdo al estrés que pudieran generar, de menor a mayor. Petit-Demouliere (2005) analiza con detalle los diferentes estudios del test, llegando a la conclusión de que la inmovilidad mostrada en un test de natación forzada no parece estar relacionada con el comportamiento del animal en las pruebas de ansiedad (como el laberinto en cruz elevado, el de hoyos, o la actividad locomotora), que se trata de respuestas independientes y que otros factores, por ejemplo, el propio estrés que muestre un animal así como el fuerte estrés agudo que supone el propio test de natación forzada, influyen sobremanera en dicha inmovilidad. En ese sentido cabría preguntarse si ambos modelos, el mostrado por Castilla-Ortega et ál. (2014), y el nuestro, en este trabajo, muestran el mismo nivel de estrés, más aún cuando la ausencia del receptor LPA₁ aumenta dramáticamente los efectos deletéreos en hipocampo y conducta (Castilla-Ortega et ál., 2011). Por otra parte, Murai et ál. (2007) describen una relación inversamente proporcional entre el tiempo de inmovilidad y la fosforilación de CaMKII a nivel de la corteza prefrontal, lo que, por los resultados que presentamos aquí y los estudios que muestran la importancia de la vía mediada por el receptor LPA₁ en dicha área (Pedraza et ál., 2013), nos lleva a dirigir el enfoque, hacia ésta área así como a las responsables de las conductas activas de afrontamiento.

Con estos resultados se vincula de nuevo al receptor LPA₁ en la regulación emocional. Conocemos que, el receptor LPA₁ juega un papel esencial en la generación y control de las conductas relacionadas con el estrés, modulando sus efectos negativos (Castilla-Ortega et ál., 2011). También, conocemos que está implicado en la regulación emocional dependientes de la amígdala en el condicionamiento del miedo (Pedraza et ál., 2013) y tras este experimento, se vincula con la regulación emocional dependientes de hipocampo. No cabe duda, no obstante, de que son precisos análisis más exhaustivos de las numerosas áreas que están implicadas en una respuesta de este tipo, particularmente cuando la validez del tratamiento permite abrir una perspectiva terapéutica encaminada al tratamiento de patologías del estado de ánimo, como la depresión.

CONCLUSIONES

1. La administración crónica del agonista del receptor LPA₁, 1-O-9-(Z)-octadecenil-*sn*-glicerol-3-fosfato (c18:1 LPA), mejoran las condiciones hipocampales a largo plazo, aumentando la proliferación celular, generando mayor número de nuevas neuronas diferenciadas y una mayor activación neuronal hipocampal.
2. La administración crónica de los antagonistas del receptor LPA₁, VPC 32183 o Ki16425 en ratón adulto altera la neurogénesis y diferenciación de las nuevas neuronas en el hipocampo adulto, impidiendo su correcta maduración y aumentando la apoptosis.
3. La estimulación crónica del receptor LPA₁ con el agonista c18:1 LPA, a 200nM, regula positivamente la activación de la enzima CaMKII y mejora la memoria de trabajo espacial, medida en la prueba de laberinto Y. Por contra, su bloqueo mediante el uso de los antagonistas VPC 32183 o Ki16425 afecta a la disponibilidad de la enzima y empeora dicha tarea.
4. El bloqueo crónico de la señalización por el receptor LPA₁ con VPC 32183 o Ki16425 genera un perfil ansiogénico en la prueba de campo abierto, disminuyendo la permanencia en el área central y aumentando las conductas de valoración de riesgo, acicalamiento.
5. La administración crónica del agonista c18:1 LPA genera un comportamiento de afrontamiento activo en la prueba del test de natación forzada. En cambio, los ratones administrados con los antagonistas VPC 32183 o Ki16425 generan un comportamiento de afrontamiento pasivo.
6. La modulación farmacológica del receptor LPA₁ mediante el uso de agonistas y antagonistas demuestran y confirma que éste interviene en los procesos de neurogénesis adulta, subventricular e hipocampal, en la maduración neuronal y

funcionalidad sináptica del hipocampo, así como en la regulación emocional y la memoria de trabajo espacial dependientes de hipocampo.

7. La modulación farmacológica del receptor LPA₁ y, con ello, la estimulación de las vías de señalización asociadas a él, pueden representar una herramienta terapéutica válida para el tratamiento de patologías asociadas a déficits de neurogénesis o funcionalidad hipocampal, como la depresión o trastornos específicos de memoria.

Capítulo IV:

**TRASPLANTE DE PRECURSORES GABAÉRGICOS
EN EL HIPOCAMPO EN RATONES CARENTES
DEL RECEPTOR LPA₁**

INTRODUCCIÓN

La actividad cerebral está regulada por la interacción de dos tipos neuronales principales: las neuronas activadoras, las cuales usan, mayoritariamente, el neurotransmisor glutamato (sistema de neurotransmisión glutamatérgica) y las neuronas inhibitoras, que usan, comúnmente, el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA, siendo el sistema GABAérgico). Las neuronas inhibitoras son críticas para el mantenimiento del equilibrio activación-inhibición necesario para la transferencia efectiva de la información (Pouille y Scanziani, 2001; Markram et ál., 2004; Haider y McCormick, 2009). Por tanto, este equilibrio juega un importante papel en la regulación de diferentes áreas cerebrales tales como la amígdala (Pare y Gaudreau, 1996), el hipocampo (Amaral, 1978) y la corteza cerebral (Wichterle et ál., 1997).

Son numerosos los estudios que han sugerido que la disfunción en el sistema GABAérgico conlleva una hiperexcitabilidad neuronal causando diversos trastornos, como ocurre en la epilepsia (Ben-Ari, 2006) o en los trastornos psiquiátricos, como en el trastorno de depresión (Luscher et ál., 2011) y la modulación de los niveles de ansiedad (Nemeroff, 2003; Luscher et ál., 2011), o como en la esquizofrenia y en el autismo (Weinberger, 1997; Gonzalez-Burgos y Lewis, 2008; Morris et ál., 2008). Ante la dificultad de encontrar terapias efectivas se han considerado en estos últimos años, nuevas líneas de actuación terapéutica, siendo la terapia celular una de las más innovadoras. Las líneas de investigación sobre la terapia celular van en la dirección de mitigar o reemplazar la pérdida de interneuronas GABAérgicas que tiene lugar en los trastornos comentados. Para ello, una de las estrategias consiste en el trasplante de los progenitores de interneuronas GABAérgicas derivadas de la eminencia ganglionar media (EGM) (Wichterle et ál., 1997).

Las regiones de los orígenes de las interneuronas GABAérgicas y de las neuronas glutamatérgicas han tenido gran repercusión durante décadas. Actualmente, podemos dar nombre a las zonas que las originan y sabemos cuál es la dirección de su migración en cada caso. Las interneuronas GABAérgicas tienen su origen, mayoritariamente, en la zona de la

eminencia ganglionar localizada en la zona ventricular ventral del telencéfalo, con diferencia de subtipo neuronal dependiente del área, siendo las áreas media y caudal de donde derivan la mayor parte de ellas y, la EGM, concretamente, la que origina las interneuronas de corteza e hipocampo que expresarán las proteínas parvalbúmina y somatostatina, marcadores moleculares de subtipo neuronal (Anderson et ál., 1997; Butt et ál., 2005; Fogarty et ál., 2007). A partir de esta región, las células originadas migran de manera tangencial hacia la corteza y el hipocampo en los días, en el caso del ratón, nuestro modelo de estudios, 12,5 y 13,5 (E12,5 y E13,5) del desarrollo embrionario, siendo reguladas por factores de transcripción específicos coordinados espacial y temporalmente (Polleux et ál., 2002; Jovanovic y Thomson, 2011; Marin, 2012, Figura 32). Durante la última década, la terapia celular con precursores neuronales derivados de la EGM está cobrando mayor interés dadas las propiedades que convierten a estas células en buenas candidatas por presentar las siguientes características: 1) su capacidad de migrar largas distancias hacia diferentes zonas cerebrales (el hipocampo, entre ellas), 2) su capacidad de diferenciarse en interneuronas GABAérgicas maduras, adquiriendo su morfología y marcadores moleculares característicos, además de no producir tumorigénesis y 3) su capacidad integrarse en el circuito local neuronal y hacer sinapsis funcionales con las neuronas endógenas, como ha sido recientemente demostrado por los análisis de electrofisiología en el cerebro huésped (revisado en Álvarez-Dolado y Broccoli, 2011).

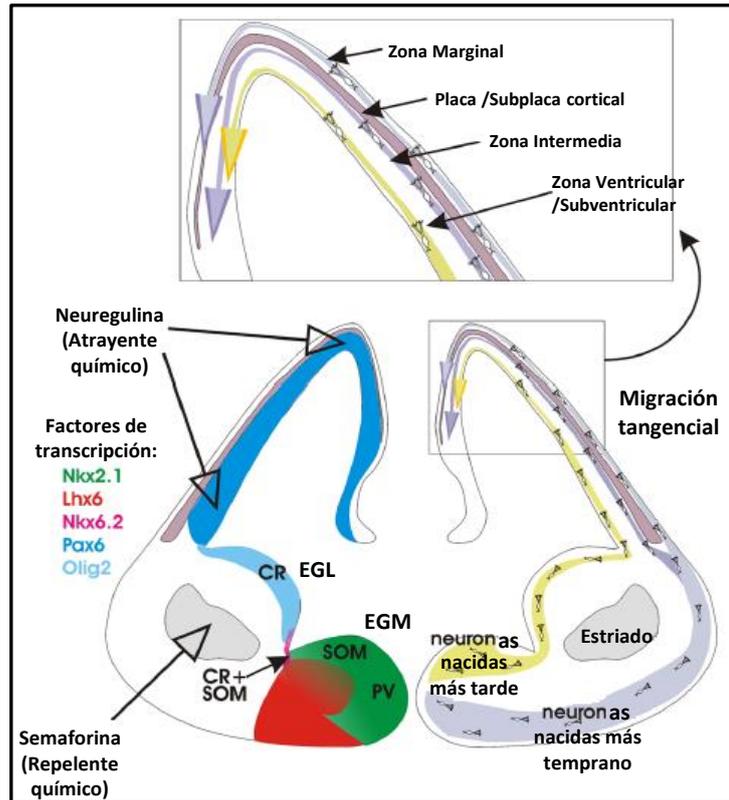


Figura 32. Resumen de los orígenes de las interneuronas corticales y las rutas migratorias tangenciales que siguen durante el desarrollo de la neocorteza. Sección coronal de cerebro de embrión de ratón (aproximadamente en estadio embrionario E14). Tras su origen, las interneuronas nacidas más temprano siguen una ruta ventral antes de migrar a lo largo de la zona marginal. Una vez en la placa cortical, migran también por la zona intermedia. Las neuronas que nacen más tarde siguen una ruta dorsal y luego migran a lo largo de la zona subventricular y ventricular. A la izquierda de la imagen se muestran los factores de transcripción que parecen jugar un papel en la diferenciación y la migración (ver clave de color). También, se muestran dos señales extracelulares importantes en el proceso de la migración como son semaforina y neuregulina. Se indica los lugares de origen de interneuronas de acuerdo al subtipo, según expresen somatostatina (SOM), parvalbúmina (PV), calretitina (CR) o calretinina más somatostatina. EGL: eminencia ganglionar lateral; EGM: eminencia ganglionar medial. Figura adaptada de Jovanovic y Thomson, 2011.

Consecuentemente, se han abierto nuevas vías de investigación para poder, con estas terapias, modular la hiperactividad del circuito neuronal local, incrementando la actividad inhibitoria del animal, y así usarlas bien en enfermedades como la epilepsia (Álvarez-Dolado et ál., 2006; Raedt et ál., 2007; Baraban et ál., 2009; Kriegstein y Pitkanen, 2009; Thompson,

2009), la enfermedad del Parkinson (Martinez-Cerdeño et ál., 2010) y el accidente cerebrovascular (Daadi et ál., 2009), o bien, para poder inducir plasticidad cerebral (Southwell et ál., 2010). Esto es posible debido, esencialmente, a que los precursores trasplantados en la amígdala, en el hipocampo o en la corteza cerebral (Álvarez-Dolado et ál., 2006; Cunningham et ál., 2009; Zipancic et ál., 2010; Tanaka et ál., 2011), se integran en el circuito neuronal local, siendo totalmente funcionales electrofisiológicamente.

La capacidad de estos precursores les confiere una utilidad extraordinaria en diferentes modelos biológicos, no sólo de neuropatologías específicas, sino para su uso en cualquier modelo experimental donde se precise investigar la neuroadaptación de estos precursores a objeto de influir en entornos neurales deficitarios por diferentes causas. Como se comentó en el capítulo introductorio y como se ha venido mostrando en el presente estudio, la ausencia o el bloqueo crónico del receptor LPA₁ desemboca en alteraciones emocionales y cognitivas asociadas y debida, en buena medida, a una neurogénesis hipocampal adulta defectuosa. En el caso del modelo de ratón *Málaga*, nulo para el receptor LPA₁, los defectos a nivel hipocampal inciden sobremanera en la génesis neuronal y la posterior maduración y supervivencia celular, pero además, nuestro grupo demostró que el receptor LPA₁ no sólo es necesario para la neurogénesis adulta a nivel del hipocampo sino también para que las interneuronas GABAérgicas tengan una correcta maduración y adquisición del fenotipo neuroquímico definitivo. Así, la ausencia del receptor genera un hipocampo deficitario en subpoblaciones específicas de interneuronas GABAérgicas, que expresaban calretinina, calbindina, parvalbúmina o somatostatina (Matas-Rico, 2009). Este déficit GABAérgico en el hipocampo ya había sido descrito por otros autores en otros modelos de ratón carente del receptor, que mostraron disminución de la liberación inducida de GABA (Roberts et ál., 2005) y alteración de los circuitos GABAérgicos interneuronales del hipocampo, con disminución de poblaciones GABAérgicas a nivel de la corteza entorrinal (Cunningham et ál., 2006).

Frente a la idea de un entorno en el que la administración de LPA puede representar un estímulo en la respuesta neurogénica y cognitiva, cabe preguntarse si los fármacos actuarían únicamente sobre el receptor LPA₁, o bien también puede existir una respuesta dependiente de otros receptores (LPA₂₋₄) en otros tipos celulares, a pesar de que trabajamos con concentraciones ajustadas a la afinidad específica para el receptor LPA₁. Para poder determinar más adecuadamente el papel real del receptor LPA₁ en el proceso, su papel

específico, nos hemos planteado una serie de experimentos en los que se actúa directamente sobre el entorno afectado por la ausencia del receptor LPA₁ a nivel hipocampal. Así, y en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Manuel Álvarez Dolado en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), nos planteamos realizar trasplantes de precursores neuronales de fenotipo normal que estimulasen la capacidad neurogénica sobre el entorno del hipocampo del animal carente del receptor para así, una vez integrado el trasplante, poder valorar por una parte hasta qué punto el ambiente carente de este receptor era capaz de inhibir la capacidad neurogénica de un precursor normal que sí presenta receptor como, a su vez, valorar qué capacidad de rescate ejercen las células precursoras que expresan el receptor LPA₁ en un microambiente carente del mismo.

De una manera u otra se trata de determinar la capacidad exclusiva y específica de la vía mediada por el receptor LPA₁ como vía señalizadora para la neurogénesis y para los procesos cognitivos asociados dependientes del hipocampo.

Por tanto, en este bloque experimental se estudió el efecto del trasplante de precursores de interneuronas GABAérgicas derivados de la EGM en el hipocampo dorsal de ratones normales y de la variante *Málaga* nulos para el receptor LPA₁, tanto a nivel de neurogénesis y como a nivel conductual. Para ello, se examinaron antes del trasplante y después del mismo, a diferentes tiempos, el efecto de las células trasplantadas en los animales huéspedes sobre la conducta usando las siguientes pruebas de comportamiento: campo abierto, laberinto en cruz elevado, test de natación forzada y test de actividad en rodillo (Rotarod). Con estas pruebas se analizaron el comportamiento relacionado con la ansiedad, la actividad exploratoria, el afrontamiento activo y pasivo, y la coordinación motora.

El trasplante de los precursores de interneuronas GABAérgicas y las pruebas de comportamiento, se llevaron a cabo en el centro CABIMER de Sevilla, director del Grupo de Investigación en Terapia Celular en Neuropatologías. Los estudios histológicos y posterior análisis de resultados se llevaron a cabo en la Unidad de Microscopía, en el Hospital Universitario Regional de Málaga, perteneciente a la ECAI de Microscopía del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales

Hospedadores: Para este estudio se usaron como hospedadores de poblaciones trasplantadas ratones LPA₁-nulos, de la variante *Málaga* obtenidos por nuestro grupo de investigación (Estivill-Torrús et ál., 2008). Los primeros ratones LPA₁-nulos fueron generados sobre un fondo genético mixto (129X1/SvJ x C57BL/6J). El gen *Lpar1* del ratón contiene, al menos, cinco exones, conteniendo el exón 3 el 68 % de la región codificante, que incluye los dominios transmembrana I-VI del receptor, incluyendo la región de unión al ligando (Contos et ál., 1998). El gen *Lpar1* se eliminó sobre las células troncales embrionarias de la cepa 129X1/SvJ por delección del exón 3 (Contos et ál., 2000). Los ratones quimera resultantes se cruzaron con la cepa C57BL/6J hasta dar lugar a ratones homocigotos para la mutación. Estos ratones LPA₁-nulos originales fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Jerold Chun (*Scripps Research Institute*, California) a nuestro grupo de investigación. Tras cruzar los padres fundadores heterocigotos, se expandieron las siguientes generaciones, formando la colonia mediante retrocruzamiento. El ratón LPA₁-nulo variedad *Málaga* (maLPA₁-nulo) fue obtenido de manera espontánea durante el proceso de expansión de la colonia, sobre el mismo fondo mixto. Actualmente, la variedad *Málaga*, una vez estable, ha sido expandida durante 25 generaciones, en los más de 10 años desde que llegara al Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga. Los ratones maLPA₁-nulos portan la misma delección del exón 3, son perfectamente viables y presentan las alteraciones morfológicas de sus predecesores (Estivill-Torrús et ál., 2008). La ausencia del receptor LPA₁ se ha confirmado por genotipación, PCR a tiempo real e inmunohistoquímica.

En este experimento se emplearon 24 ratones macho, 13 ratones de genotipo normal (abreviados en texto y figuras como WT, del inglés *wild type*; fondo 129X1/SvJ x C57BL/6J) y 11 mutantes maLPA₁-nulos homocigotos para la delección (nulos, abreviados en texto y figuras como NULL, del inglés), con 2 meses de edad al inicio del experimento. Los animales se estabularon, hasta su traslado, en condiciones estándar con acceso libre a comida y agua, y un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (encendido de las luces a las 7:00). Se establecieron en dos

grupos experimentales. El primer grupo denominado grupo trasplantado (WT-EGM (n = 7); NULL-EGM (n = 5)) recibió los precursores de interneuronas GABAérgicas derivada de la EGM. El segundo grupo denominado grupo control (WT-CTRL (n = 6); NULL-CTRL (n = 6)) recibió un volumen similar de células muertas como control del proceso de inflamación o lesión consecuencia de la inyección, o bien, control de la toxicidad de las células trasplantadas. Los animales fueron identificados individualmente siguiendo un patrón de agujeros en sus orejas.

Donantes: Las células de la EGM fueron aisladas de embriones de ratones transgénicos de la cepa B5/EGFP siendo la cepa origen FVB.Cg-Tg (CAG-EGFP) B5Nagy/J (Hadjantonakis et ál., 1998), los cuales expresaban de forma constitutiva la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP, del inglés Enhanced Green Fluorescent Protein; en adelante, GFP, por unificar texto y referencias). Esta cepa se halla disponible en las instalaciones CABIMER de Sevilla. El ratón expresa GFP ampliamente en sus tejidos bajo el control de un promotor híbrido citomegalovirus/beta-actina/beta-globina. El transgénico resultante se generó sobre un fondo mixto 129X1/SvJ x ICR (CD1).

Para los trasplantes fue preciso el traslado (previa autorización de cada uno de los centros implicados) de los ratones malPA₁-nulos a las instalaciones del centro CABIMER. Una vez allí, se siguió su estabulación estándar así como los procedimientos experimentales hasta su sacrificio. La evaluación comportamental se realizó entre las 9:00 y las 15:00 en una habitación con 300 lux de intensidad lumínica. Los tejidos se procesaron para su posterior tratamiento en Málaga.

Todos los procedimientos experimentales contaron con la autorización de cada centro y se realizaron de acuerdo a las leyes europeas sobre experimentación animal (*European Communities Council Directives 2010/63/UE, 90/219/CEE, Regulation (EC) No 1946/2003*) y a la normativa nacional vigente para animales de experimentación y transgénicos Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (B.O.E. de 8 de febrero de 2013), Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (B.O.E. de 8 Noviembre de 2007), Ley 9/2003, de 25 de abril (B.O.E. de 26 de abril de 2003), Real Decreto

178/2004, de 30 de enero (B.O.E. de 31 de enero de 2004), Decreto 320/2010) (B.O.J.A. de 16 de julio de 2010) en relación al uso de organismos modificados genéticamente.

2.2 Aislamiento celular y trasplante

Las células de la EGM destinadas a ser trasplantadas se aislaron de los ratones transgénicos de la cepa B5/EGFP y expresaban de forma constitutiva la proteína verde fluorescente (GFP). Las disecciones de células se obtuvieron de embriones E12,5 días (estado de desarrollo embrionario E12,5), considerando como día embrionario E0,5 el día que se encontró el tapón vaginal en la madre. Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical y los embriones se obtuvieron por cesárea. Una vez extraídos de sus correspondientes sacos vitelinos, se depositaron sobre una placa de cultivo con medio de disección DMEM/F12 (Sigma-Aldrich) manteniéndolos en todo momento sobre placa fría para disminuir el metabolismo del tejido y por tanto, aumentar la viabilidad de las células. Tras decapitación y transferencia a una nueva placa con DMEM/F12, bajo lupa, se retiraron la piel y el cráneo para dejar expuestos los hemisferios cerebrales y los bulbos olfativos. Se descartaron aquellos embriones que no expresaron adecuadamente la proteína GFP. Para la disección y obtención de la EGM se colocó el telencéfalo sobre la placa apoyando su superficie ventral sobre ella, y con la ayuda de las pinzas se realizó un corte por la línea media separando los dos hemisferios exponiendo el interior de los ventrículos. En el suelo rostral de los ventrículos se localizaron las elevaciones de la eminencia ganglionar, diferenciándose la medial por estar más cercana a la línea media y la lateral por estar más cercana a la línea lateral. Una vez que se tiene todo el tejido procedente de la EGM extraídas se depositó en medio L-15 con DNasa I (10-100 µg/ml), a objeto de eliminar el ADN de las células muertas o dañadas, y posteriormente, se disgregó el tejido mecánicamente (aspiración y vaciado repetido). La suspensión resultante se centrifugó durante 2 minutos a 800 xg para permitir a las células sedimentar. A continuación, las células se resuspendieron en 5 µl de medio L-15 y se mantuvieron en hielo hasta su uso. Se cuantificó el número de células y su viabilidad mediante el método estándar de azul de tripán.

Tras este paso, se anestesiaron (1,5–2 % isoflurano) los ratones huésped normales y los malPA₁-nulos y se situaron en el aparato estereotáxico. Las células suspendidas

(concentración total $\sim 10^6$ células/ μ l) se cargaron en las micropipetas de vidrios biseladas (~ 60 μ m diámetro) precargadas con aceite mineral y conectadas a un microinyector mecánico (MO-10, Narishige Tokio, Japón), acoplado al aparato estereotáxico. La elaboración de la micropipeta se realiza a partir de capilares de vidrio Wiretrol® II (ref. 5000-2100; Drummond Scientific Co., Broomall, Pensilvania, Estados Unidos) y mediante estirador vertical (Pc-10, Narishige, Tokio, Japón) y biselador (Glass Micropipette Beveller 1300M, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, Estados Unidos). Se realizó una incisión para retirar la piel de la cabeza y, tras trepanar ligeramente el cráneo, se introdujo la micropipeta para realizar la inyección. Se inyectaron un total de 8×10^5 células repartidas en un volumen total de 75-50 nl por ratón. Se inyectaron de manera bilateral en la zona anterior (4×10^5 células) y posterior (4×10^5 células) del hipocampo dorsal repartidas en cuatro o cinco puntos del eje dorsal, usando las siguientes coordenadas desde bregma (Lateral: ± 1.3 ; Anteroposterior: -2.06 ; Profundidad $-2.1/-1.8/-1.5/-1.2/-0.9$ y Lateral: ± 2.8 ; Anteroposterior: -2.8 ; Profundidad: $-2.3/-2.0/-1.8/-1.5$) de acuerdo con el atlas del cerebro de ratón Paxinos y Franklin, (2001) (Figura 33). A los animales del grupo control se les inyectó un volumen similar de células muertas por choque térmico consistente, en ciclos de congelación y descongelación. Después del procesamiento quirúrgico, todos los ratones se devolvieron a sus jaulas hasta su posterior análisis conductual.

De esta manera se establecieron, por tanto los cuatro grupos:

- **WT-EGM**, ratones normales o de genotipo salvaje, con inyección de precursores derivados de EGM.
- **NULL-EGM**, ratones nulos para el receptor LPA₁, con inyección de precursores derivados de EGM.
- Los controles, **WT-CTRL** y **NULL-CTRL**, animales normales y nulos para el receptor LPA₁, con inyección de células muertas (situación simulacro, en inglés, *sham*).

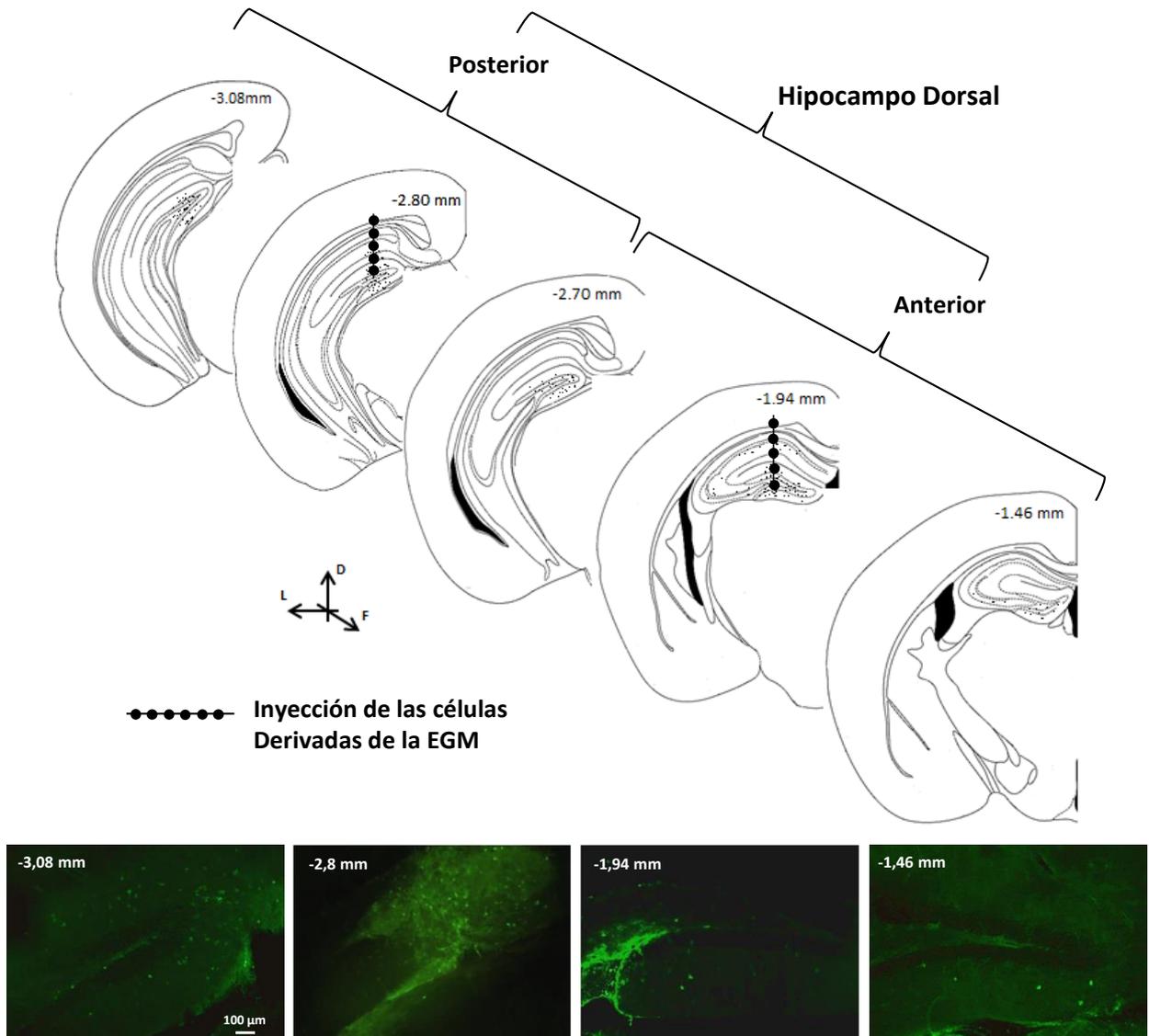


Figura 33. Posición de los precursores neuronales derivados de la EGM tras su administración en el cerebro huésped. Representación de la posición de la zona de inyección de las células derivadas de la EGM a partir del punto de bregma que alberga al hipocampo dorsal anterior (de - 1,46 mm a - 2,7 mm) y posterior (- 2,7 mm a - 3 ,08 mm). Las imágenes son representativas de la localización de las células por fluorescencia, una vez inyectadas, variando cada imagen de acuerdo a la coordenada anteroposterior, - 1,46 mm, - 1,94 mm, - 2,8 mm; - 3,08 mm. Escala panel inferior: 100 µm.

2.3 Diseño experimental

En el diseño experimental se estableció el día de inyección de suspensión celular como día 1 (células de donante a estadio embrionario E12,5). Antes de esa fecha se realizó análisis basal de conducta. Tras el trasplante se establecieron diferentes tiempos para volver analizar las pruebas de comportamiento y, seguidamente, y previa administración, los dos últimos días, de bromodesoxiuridina (BrdU), se realizó a tiempo final la perfusión vascular y extracción de órganos de interés (Figura 34).

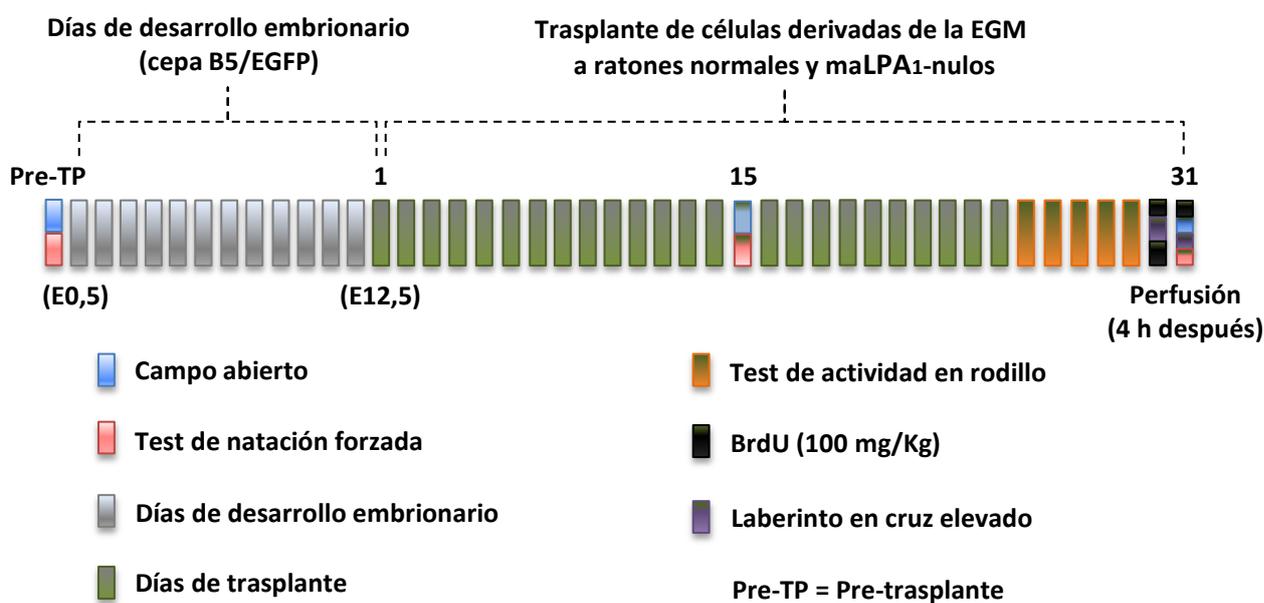


Figura 34. Diseño experimental. Cada rectángulo corresponde a los días de experimentación. Los ratones normales y maLPA₁-nulos pasaron por los test de campo abierto y test de natación forzada casi dos semanas antes del trasplante (pre-TP). Se tomó como E0,5 días de desarrollo embrionario cuando la hembra donadora de las células derivadas de la EGM tuvo el tapón vaginal. Cuando el desarrollo alcanzó el estadio E12,5 se extrajeron los embriones para realizar el trasplante (día 1) a los ratones huéspedes. El día 15 tras trasplante, se realizaron las pruebas de campo abierto y test de natación forzada. Los días 25, 26, 27, 28 y 29 se realizó el test de actividad en rodillo. El día 30, se administraron 4 dosis de BrdU (100mg/Kg) separadas cada 2 horas y se inició la prueba de laberinto en cruz elevado. El día 31, se administró una nueva dosis de BrdU y se realizaron las pruebas de campo abierto, el segundo día del laberinto en cruz elevado y el test de natación forzada. Transcurridas 4 horas desde la administración de BrdU se perfundieron vascularmente los ratones para la fijación de los órganos de interés y su posterior extracción.

2.4 Administración de BrdU

La bromodesoxiuridina (BrdU), como se citó en el anterior capítulo es un análogo del nucleótido timidina que, al incorporarse en el ADN nuclear durante la fase S del ciclo celular permite el seguimiento de los procesos de división celular, ampliamente usada en los estudios de neurogénesis (Taupin, 2007).

Se administró intraperitonealmente BrdU (Sigma-Aldrich) durante 2 días consecutivos, inyectándose de acuerdo a peso del animal, a dosis de 100 mg/Kg de peso, disuelta en suero fisiológico y durante los dos últimos días del diseño experimental. El penúltimo día (día 30) se administraron cuatro dosis separadas 2 horas entre sí, mientras que el último día (día 31), se administró una dosis a la misma hora que la primera dosis del día anterior. Los animales se perfundieron 4 horas después (Figura 34).

2.5 Pruebas de comportamiento

Para testar si el trasplante de precursores de interneuronas GABAérgicas derivadas de la EGM pudo tener un efecto beneficioso sobre el comportamiento de los ratones normales y los carentes del receptor LPA₁, se analizó a través de las pruebas de comportamiento: campo abierto, test de natación forzada, laberinto en cruz elevado y test de actividad en rodillo. Se analizaron las pruebas siguiendo el diseño experimental citado (Figura 34). Algunas de estas pruebas han sido mencionadas en el capítulo anterior por lo que se detallan en menor medida.

El número de animales para cada grupo experimental fue de: WT-CTRL (n = 6); WT-EGM (n = 7); NULL-CTRL (n = 6) y NULL-EGM (n = 5).

2.5.1 Campo abierto

Como hemos mencionado anteriormente la prueba de campo abierto es una prueba de referencia en prácticamente todos los estudios de comportamiento, y se basa en el comportamiento innato de los roedores tanto a explorar ambientes novedosos como a permanecer al resguardo de entornos abiertos. Frente a una exposición en un contexto nuevo

para el animal, éste tenderá a permanecer en la zona periférica, resguardada. El incremento del tiempo que permanece el animal en la periferia del campo de prueba es indicador de ansiogénesis. Por contra, el aumento de tiempo de permanencia en la zona central, así como el aumento de actividad locomotora en dicha zona, o bien la disminución de la latencia de entrada a la zona central son indicadores, generalmente, de ansiolisis (Prut y Belzung, 2003).

El campo abierto consistió en un rectángulo fabricado de polimetilmetacrilato de dimensiones (55 x 29 x 38) cm (Figura 35). Cada animal se colocó en el centro del aparato y su conducta fue grabada con una cámara digital durante 5 minutos. Posteriormente, la locomoción (distancia recorrida y velocidad media) y el porcentaje de tiempo que permanecieron en el centro fueron analizadas con un sistema informático de análisis de imagen (Ethovision XT 5.0, Noldus Information Technology, Waningen, Países Bajos) dividiendo la arena en dos zonas rectangulares: una zona interna separada a 9,7 cm de la pared con 11 cm de longitud en su lado mayor, y otra zona periférica a 9,7 cm del otro rectángulo con 38 cm de longitud en su lado mayor. Las conductas de acicalamiento (*grooming*) y exploración alzada (*rearing*) (n°/min) fueron cuantificadas observacionalmente. Al finalizar cada ensayo con cada ratón, la prueba se limpiaba con una solución con etanol al 70 % y el ratón se devolvía a su jaula.

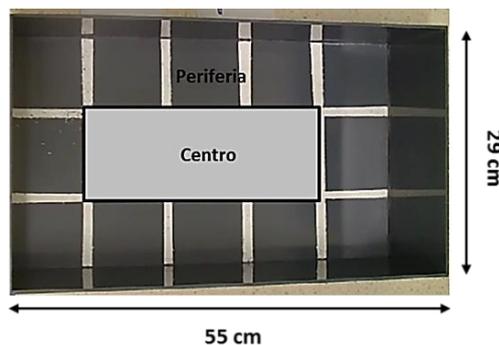


Figura 35. Imagen del campo abierto utilizado para el estudio de la conducta de tipo ansiosa.

Las medidas del campo abierto fueron (55 x 29 x 38) cm. Para establecer las áreas de estudio y analizar el tiempo que los ratones permanecieron en ellas, se usó el programa *Ethovision XT 5.0*.

2.5.2 Test de natación forzada

El protocolo del test de natación forzada fue llevado a cabo de la misma manera que se describió en el capítulo anterior (ver, para más detalle). Brevemente, se utilizó el protocolo descrito por Cryan et ál. (2002 a, b) en el que se introduce al animal en un cilindro transparente (de 30 cm de altura y 10 cm de diámetro) lleno de agua hasta 15 cm de altura. Se grabó su conducta durante 6 minutos, analizando, primero, la primera latencia de inmovilidad (s) y, durante los 4 últimos minutos, el porcentaje de inmovilidad (conducta pasiva en la que el animal únicamente flota; Petit-Demouliere et ál., 2005) el porcentaje de natación, y el de escalada (conductas de escape vertical con actividad notable). La inmovilidad puede reflejar bien un fallo para ejecutar las conductas de escape, o bien una conducta pasiva en contraposición a formas activas de afrontamiento de situaciones estresantes (Cryan et ál., 2002 a y b).

2.5.3 Laberinto en cruz elevado

Esta prueba ha sido usada ampliamente para estudios de los efectos de diferentes fármacos sobre la ansiedad, así como para caracterizar la conducta de numerosos modelos animales transgénicos. De manera convencional, la ansiedad sería determinada por la aversión a la exploración de los brazos abiertos, más iluminados, mientras que la actividad locomotora es analizada de acuerdo a la frecuencia de entrada en los brazos cerrados, más oscuros y resguardados. No obstante, el análisis con más detalle de esta prueba permite detectar conductas adicionales (acicalamiento, exploración, actividad, excitabilidad, estiramiento, cabeceo exploratorio) características en ratas y ratones y que han de valorarse para no generar falsos positivos o negativos, mejorando la sensibilidad de la prueba (Holmes et ál., 2000).

El laberinto en cruz elevado es un laberinto, en nuestro caso, elevado a 38,5 cm del suelo y formado por dos brazos abiertos, de medidas (30 x 5) cm cada uno, dos brazos cerrados de (30 x 5) cm, con paredes de 15 cm de alto, y una plataforma central de (5 x 5) cm, (Figura 36). De manera individual, cada animal fue colocado en la intersección de los cuatro brazos permitiéndole explorar libremente durante 5 minutos (contexto novedoso). A las 24

horas siguientes, cada animal volvió a ser expuesto a la prueba (contexto familiar, Figura 34). El comportamiento durante el test fue grabado por una cámara digital y posteriormente, se analizaron, a través del sistema de registro y análisis de la conducta animal *Ethovision XT5.0* (Noldus Information Technology, Waningen, Países Bajos), las diferentes variables: tiempo de permanencia en los brazos, número de entradas a los brazos abiertos y locomoción (distancia recorrida y velocidad media). La conducta relacionada con la ansiedad fue medida comparando la actividad realizada en los brazos abiertos frente a la observada en los brazos cerrados, usando el siguiente índice: tiempo de permanencia en los brazos abiertos/(tiempo de permanencia en los brazos abiertos + tiempo de permanencia en los brazos cerrados) (Malleret et ál., 1999). Valores bajos para este índice indican un mayor nivel de conductas relacionadas con ansiedad, por el contrario, por contra, valores elevados del mismo representarán disminución de conductas de tipo ansioso.



Figura 36. Imagen del laberinto en cruz elevado. El animal se colocaba en el centro de la intersección de los brazos abiertos y cerrados, y se registraba su conducta durante 5 minutos.

2.5.4 Test de actividad en rodillo (en inglés, *Rotarod*)

La prueba de *rotarod* es una prueba mecánica para la evaluación de la función y coordinación motora en modelos animales experimentales, descrita inicialmente para evaluar lesiones y efectos de fármacos sobre la coordinación motora de roedores debidos a la actividad de los ganglios basales y cerebelo (Monville et ál., 2006). Ha sido usado en numerosos estudios animales para evaluar aprendizaje motor, o cambios de función motora

tras la administración farmacológica de diferentes compuestos (Watzman et ál., 1967; Sedelis et ál., 2001; Heyser et ál., 2011).

El aparato para la realización de la prueba está formado por un rodillo giratorio de unos 3 cm de diámetro, monitorizado, elevado a 16 cm del suelo del equipo y acanalado, de tal manera que se obtienen varios compartimentos, cada uno de 11 cm de ancho (Figura 37). Cada animal fue colocado en el rodillo parado midiéndose el tiempo de permanencia en él. La velocidad de aceleración del rodillo se fue aumentando en 1 r.p.m cada (7-8) s, empezando con 4 rpm hasta 41 r.p.m, durante 5 minutos. Cada ratón repitió el ensayo 3 veces, con un intervalo entre cada prueba de 5 minutos, durante un periodo de 5 días, siendo el primer día el de habituación a la prueba y los cuatro días siguientes los de la evaluación (Figura 34).

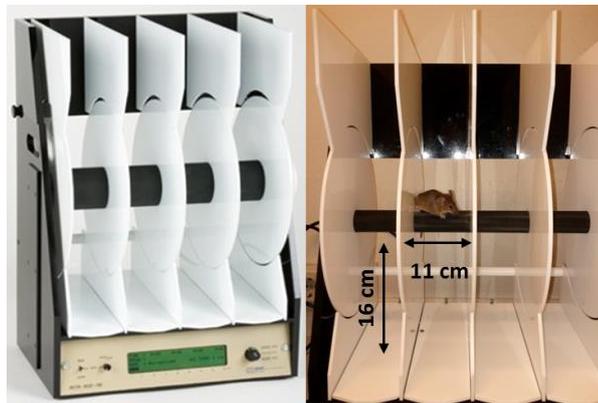


Figura 37. Imagen del Rotarod. Cada animal se colocó en el rodillo y la velocidad de aceleración estuvo programada por el equipo aumentando en 1 rpm cada (7-8) s, y en rango que fue desde 4 r.p.m hasta 41 r.p.m durante 5 minutos. Cuando el animal se caía del rodillo se paraba el tiempo.

2.6 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en el campo abierto, test de natación forzada, y laberinto en cruz elevado (promediados como una única puntuación diaria por animal), se analizaron mediante ANOVA de una vía para la comparación de los genotipos (los ratones normales y los $maLPA_1$ -nulos), y la que se realizó entre el grupo trasplantado y el grupo control (WT-EGM vs. WT-CTRL y NULL-EGM vs. NULL-CTRL) los días 15 y 31 post-trasplante (en el caso de los datos obtenidos en campo abierto y en el test de natación forzada) y en los días 30 y 31 post-trasplante, (en el

caso de los obtenidos en el laberinto en cruz). Se tomaron únicamente en cuenta los datos de los animales trasplantados que presentaron células GFP⁺. En el caso de los datos obtenidos en el *rotarod*, se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas ('genotipo x trasplante x día (habitación vs. ensayos)') seguidos del análisis *post hoc* de la diferencia significativa de Fisher (LSD). Se consideró significativa la probabilidad igual o menor a 0,05. Los análisis se realizaron con el software STATISTICA 7.1 (*Stat Soft Inc*, Oklahoma, EEUU). El error estándar de la media (SEM) de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

2.7 Técnicas inmunohistoquímica: Caracterización de los precursores de interneuronas GABAérgicas

Tanto la detección de los precursores trasplantados y el análisis de su integración como el estudio de los cambios a nivel proliferativo en las áreas de interés, se realizó mediante inmunohistoquímica.

El número de animales para cada grupo experimental fue de: WT-CTRL (n = 6); WT-EGM (n = 7); NULL-CTRL (n = 6) y NULL-EGM (n = 5).

2.7.1 Fijación, corte y seriado del tejido

Los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con una solución de Ketamina al 20 % (Imalgene 1000) y Rompún al 10 % (Bayer) en de suero fisiológico al 70 %) y se perfundieron transcardiacamente con paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 (Anexo I) con la ayuda de una bomba de perfusión (Masterflex® L/S® Digital economic drive, Cole-Parmer, Chicago, Estados Unidos). Tras la perfusión, el animal se decapitó y se extrajo el cerebro. Los cerebros se sometieron a 24 h de post-fijación en paraformaldehído al 4 % en agitación.

Posteriormente, tras la post-fijación los cerebros se situaron sobre papel secante, para eliminar los restos de fijador, y se incluyeron en agar. Para la inclusión, el agar (Sigma-Aldrich) se disolvió al 4 % en agua destilada, calentando en microondas hasta la ebullición y dejando enfriar ligeramente unos minutos. Con el agar líquido, cada cerebro se incluyó en un molde de

acero con agar, que se solidificó en un bloque. Los bloques se tallaron con una cuchilla y se cortaron en vibratomo (modelo MA752, Campden Instruments, Loughborough, Reino Unido). Se obtuvieron secciones coronales de hipocampo de 50 μm de grosor, que se distribuyeron en ocho series equivalentes (1/8) utilizando placas de 24 pocillos con tampón PBS 0,1 M , pH 7,4.

2.7.2 Inmunofluorescencia

El tejido se procesó por inmunohistoquímica de fluorescencia para caracterizar la diferenciación de los precursores de interneuronas GABAérgicas implantadas en los cerebros huéspedes en subtipos neuroquímicos específicos, así como estudiar su supervivencia, habida cuenta de la expresión constitutiva de GFP que poseen. Además, se evaluó la neurogénesis hipocampal, cuantificando el número de las células que incorporaron la BrdU para conocer los posibles cambios a nivel proliferativo. Se analizó la expresión de las proteínas ligadoras de calcio calbindina D28k (CB), parvalbúmina (PV), calretinina (CR) y de los neuropéptidos somatostatina (SOM) y neuropéptido Y (NPY), como marcadores neuroquímicos para la identificación de distintas subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas, con diferente morfología, conectividad, distribución y propiedades electrofisiológicas (revisado Gelman y Marín, 2010; Fishell y Rudy, 2011; Kepecs y Fishell, 2014). Se realizó detección por inmunohistoquímica, por tanto, para los siguientes marcadores:

GABA, aminoácido presente en el sistema nervioso central, siendo en las estructuras del telencéfalo y en la corteza cerebral donde se encuentra en mayor cantidad (Jones, 1986). Es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia, presente en, al menos, un 40% de las neuronas, donde actúa generando una respuesta hiperpolarizante inhibitoria, y está implicado en el equilibrio de excitación-inhibición del SNC (Pouille y Scanziani, 2001; Markram et ál., 2004; Haider y McCormick, 2009).

Parvalbúmina, proteína ligadora de calcio que marca subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas. Los cuerpos celulares de las neuronas PV⁺ suelen ser de mayor tamaño que el resto de interneuronas y muestran, en el hipocampo, localización preferente, en las capas celulares de todas las áreas, en el estrato piramidal y estrato polimórfico (estrato oriens) y el hilus y el estrato granular del giro dentado (Celio, 1986; 1990; Kosaka, 1987; Gulyás et ál.,

1991; Jinno y Kosaka, 2006). Algunos estudios han apuntado que la mayoría de las interneuronas son inmunorreactivas para este marcador, de forma que constituyen, entre el 94 % -100 % de las interneuronas GABAérgicas, si bien, en el hipocampo constituyen el 20 %, aproximadamente, de las interneuronas GABAérgicas (DeFelipe, 1993; 1997; Freund y Buzsáki, 1996; McDonald y Betette, 2001; Jinno y Kosaka, 2006).

Calbindina D28K, proteína ligadora de calcio de la misma familia que la calmodulina y la troponina C. Las neuronas positivas para CB muestran un patrón de tinción en el que se pueden observar neuronas ovaladas y esféricas que varían en tamaño desde 10 a 20 micras (DeFelipe, 1997; McDonald, 1997; McDonald y Betette, 2001). La densidad de neuronas marcadas con CB es moderada, puesto que en general, se estima que representan el 55 % aproximadamente de las interneuronas GABAérgicas. En el hipocampo se localiza en las principales áreas pero en las capas dendríticas, constituyendo cerca del 12 % de las interneuronas GABAérgicas (Celio, 1990; Freund y Buzsáki, 1996; Jinno y Kosaka, 2006).

Calretinina, proteína ligadora de calcio que se expresa en determinadas subpoblaciones de células nerviosas, incluidas las interneuronas hipocampales (Gulyás et ál., 1992). En el hipocampo las células CR⁺ presentan una distribución laminar, y se localiza en todas las áreas, en las capas celulares (Jinno y Kosaka, 2006). Su expresión en los progenitores neuronales del hipocampo delimita un estado post-mitótico transitorio (Brandt et ál., 2003; Overstreet-Wadiche y Westbrook, 2006). Las neuronas positivas para CR muestran un patrón de tinción en el que se pueden observar neuronas pequeñas no piramidales (McDonald, 1994). Se estima que marcan el 46 % aproximadamente del total de interneuronas GABAérgicas.

Neuropéptido Y, neuropéptido de 36 aminoácidos que ha sido implicado en un amplio rango de respuestas fisiológicas y de comportamiento, importantes para el mantenimiento homeostático (Shine et ál., 1994; Broberger y Hokfelt, 2001; Yannielli y Harrington, 2001; Kalra y Kalra, 2003). Los estudios clínicos sugieren que la disminución de la transmisión de NPY en el cerebro está relacionada con la etiología y mantenimiento de trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés (Thiele et ál., 2004). Pero también, se implica en otras enfermedades como en la epilepsia (Vezzani et ál., 2000; Markram et ál., 2004; Gotzsche et ál., 2012). La densidad de neuronas GABAérgicas marcadas con NPY es baja y las interneuronas que expresan somatostatina son inmunorreactivas para NPY (Vincent y Johansson, 1983;

Vincent et ál., 1983; Tepper et ál., 2010; Xu et ál., 2010; Ibañez-Sandoval et ál., 2011). En el hipocampo se localizan tanto en las capas celulares como en las capas dendríticas de casi todas las áreas (Jinno y Kosaka, 2006).

Somatostatina, neuropéptido que ha sido asociado con las células Martinotti, las cuales tienen los axones ascendentes, innervando apical y basalmente a las dendritas de las células piramidales (Kawaguchi y Kubota, 1997). También, se ha asociado a otros tipos celulares con características electrofisiológicas similares a las células Martinotti (Ma et ál., 2006). Actúa como un neurotransmisor y modulador de la actividad neural, principalmente por su efecto inhibitorio de la excitabilidad neuronal y su capacidad de modificar la liberación de neurotransmisores (Patel, 1999). Suele localizar en el hipocampo con una distribución laminar, y repartida en las diferentes áreas, en las capas basales dendríticas, si bien ha sido usado como marcador específico de poblaciones de interneuronas hipocámpales del área CA1 (Mátyás et ál., 2004; Jinno y Kosaka, 2006). La densidad de neuronas marcadas con SOM es baja, ya que se estima que marcan aproximadamente el 33 % de las interneuronas GABAérgicas representando un 15 % de las hipocámpales (Freund y Buzsáki, 1996).

Inmunofluorescencia para GABA, PV, CB, CR, NPY y SOM

El protocolo seguido precisó de inmunohistoquímica convencional para fluorescencia sobre las secciones coronales de cerebro conteniendo el hipocampo, obtenidas con vibratomo. Aún siendo similar a una doble inmunohistoquímica de fluorescencia, difiere de ésta al presentar las células trasplantadas la proteína fluorescente GFP expresada, por lo que la doble fluorescencia solo precisó del uso de anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos específicos para la detección de los marcadores citados de subtipos neuroquímicos. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente y en agitación.

Primer día:

- Lavados de las secciones, siendo 3 pasos de 10 min cada uno, con PBS 0,1 M, pH 7,4.
- Incubación de las secciones toda la noche en el anticuerpo primario correspondiente disuelto en PST, siendo éste una solución de PBS 0,1 M, pH 7,4 conteniendo Triton X-100®

(Panreac) al 0,5 % y suero de otro animal distinto al que estaba desarrollado el anticuerpo primario, al 2,5 %. Los anticuerpos primarios y sus diluciones se detallan en la tabla 14:

ANTICUERPO PRIMARIO	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN	DILUYENTE
Anti-GABA	Sigma Ref.: A 2052	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:500	PST cerdo
Anti-PV	Swant Ref.: PV-28	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:500	PST cerdo
Anti-CB	Swant Ref.: CB-38a	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:500	PST cerdo
Anti-CR	Swant Ref.: 76994/4	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:500	PST cerdo
Anti-NPY	Sigma Ref.: N 9528	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:1000	PST cerdo
Anti-SOM (D-20)	Santa Cruz Ref.: sc-7819	IgG, policlonal obtenido en cabra	1:1000	PST cerdo

Tabla 14. Anticuerpos primarios. Abreviaturas de acuerdo a texto.

Segundo día:

- Lavados de las secciones. 3 lavados de 10 min cada uno, con PBS 0,1 M, pH 7,4.

- Incubación durante 2 horas, y en oscuridad, en el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente (detallado en la Tabla 15) disuelto en PBS 0,1 M pH 7,4 a 1:500. Dada la longitud de onda de la proteína GFP (EGFP, excita a 488 nm y emite en 509 nm), se emplearon anticuerpos secundarios conjugados al fluorocromo AlexaFluor®568 (Molecular Probes®, Life Technologies, parte de Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), que excita a 579 nm y emite en 603 nm.

ANTICUERPO SECUNDARIO	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN	DILUYENTE
Anti IgG de conejo Alexa Fluor® 568	Life Technologies Ref.: A11036	IgG, policlonal, obtenido en cabra	1:500	PBS 1x
Anti IgG de cabra Alexa Fluor®568	Life Technologies Ref.: A11034	IgG, policlonal, obtenido en conejo	1:500	PBS 1x

Tabla 15. Anticuerpos secundarios usados.

Inmunofluorescencia para BrdU

La detección de la BrdU administrada siguió un protocolo de preparación del tejido similar al descrito en el capítulo anterior aunque omitiendo el bloqueo de la peroxidasa endógena. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente y en agitación. La inmunodetección se realizó con anticuerpos secundarios conjugados a un fluorororo específico, siguiendo las mismas pautas citadas anteriormente para la detección de los marcadores neuroquímicos, aunque con algunas modificaciones.

Por un lado, el protocolo completo se realizó usando Tris-PBS 0,01 M, pH 7,8 (ver anexo) en todos los pasos, en lugar de PBS. Así, el Tris-PBS reemplazó al PBS en los lavados y en la solución de dilución de los anticuerpos.

Por otro, la incorporación de la BrdU al ADN requiere de una digestión del tejido en proteinasa K (Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C. Tras ello, se realizaron tres lavados de 10 min con Tris-PBS y se desnaturalizó el ADN por incubación en una solución de ácido clorhídrico 2N (Panreac) durante 30 min, a 37°C.

Tras neutralizar el ácido mediante dos lavados de 5 min en tampón borato 0,1 M, pH 8,5 (ver anexo), se realizó lavado en Tris-PBS y se siguió con el protocolo convencional, usando anti-BrdU monoclonal desarrollado en ratón (Sigma, dilución 1:500, en PST, suero de conejo) y, como anticuerpo secundario, anti IgG de ratón policlonal, desarrollado en conejo conjugados al fluorocromo AlexaFluor®568 (Molecular Probes®, Life Technologies, ref.: A11061; dilución 1:500 en PST, suero de conejo).

2.7.3 Cuantificación

Supervivencia de las células GFP⁺ y caracterización de los precursores de interneuronas GABAérgicas

Para la evaluación del porcentaje de supervivencia de las células GFP⁺ y para la caracterización de las células trasplantadas, se realizó la cuantificación una de cada ocho series coronales. Las secciones empleadas en cada conteo estuvieron ordenadas en el eje rostrocaudal e espaciadas entre sí 300 µm. Cada serie comenzaba, anteroposteriormente y de

acuerdo a bregma, en - 1,06 mm desde bregma, y finalizaba, aproximadamente, en - 3,28 mm (Paxinos y Franklin, 2001, Figura 33), abarcando principalmente la región dorsal del hipocampo donde se llevó a cabo el trasplante. Las células positivas en cada sección se cuantificaron con un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con objetivos UPLSAPO 4x, 10x, 20x, 40x, 100x de 0,16, 0,4, 0,75, 0,90, y 1,40 de apertura numérica, respectivamente, y una cámara digital Olympus DP70 (Olympus España S.A.; Barcelona), utilizando el objetivo de 40 aumentos. Para el caso del porcentaje de supervivencia celular, se contó el total de células GFP⁺ en el eje anterior y posterior de una de las 8 series. El porcentaje de células GFP⁺ que expresaban GABA, PV, CB, CR, NPY y SOM fue calculado en cada ratón en cuatro secciones coronales de cada serie, las cuales albergaban los sitios de la inyección. Al menos 250 células GFP⁺ fueron analizadas por marcador y animal en cada serie. Para el caso de la cuantificación de la BrdU, se contó una serie completa para cada ratón (1/8). Cada grupo experimental estuvo formado por WT-CTRL (n = 6 ratones); WT-EGM (n = 7 ratones); NULL-CTRL (n = 6 ratones) y NULL-EGM (n = 5 ratones).

2.7.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía para comparar el efecto de las células trasplantadas en el hipocampo dorsal de ambos genotipos, seguidos del análisis *post hoc* de la diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD). Se consideró significativa la probabilidad igual o menor a 0,05. Los análisis se realizaron con el software STATISTICA 7.1 (*Stat Soft Inc*, Oklahoma, EEUU). El error estándar de la media (SEM) de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

RESULTADOS
3.1 Análisis conductual**3.1.1 Mejora del trasplante de las células precursoras de interneuronas GABAérgicas sobre la respuesta tipo ansiosa****Campo abierto**

La evaluación de la efectividad del trasplante para restaurar o compensar los defectos observados en un ratón que carece del receptor LPA₁ se realizó mediante una batería de pruebas conductuales, como se ha mencionado anteriormente. Con el fin de comprobar si el trasplante pudo mejorar el comportamiento relacionado con la ansiedad, éste fue evaluado en los ratones operados a través del campo abierto, realizándose una evaluación de conducta basal antes del trasplante, y dos evaluaciones posteriores al trasplante, los días 15 y 31 post-trasplante (Figura 34).

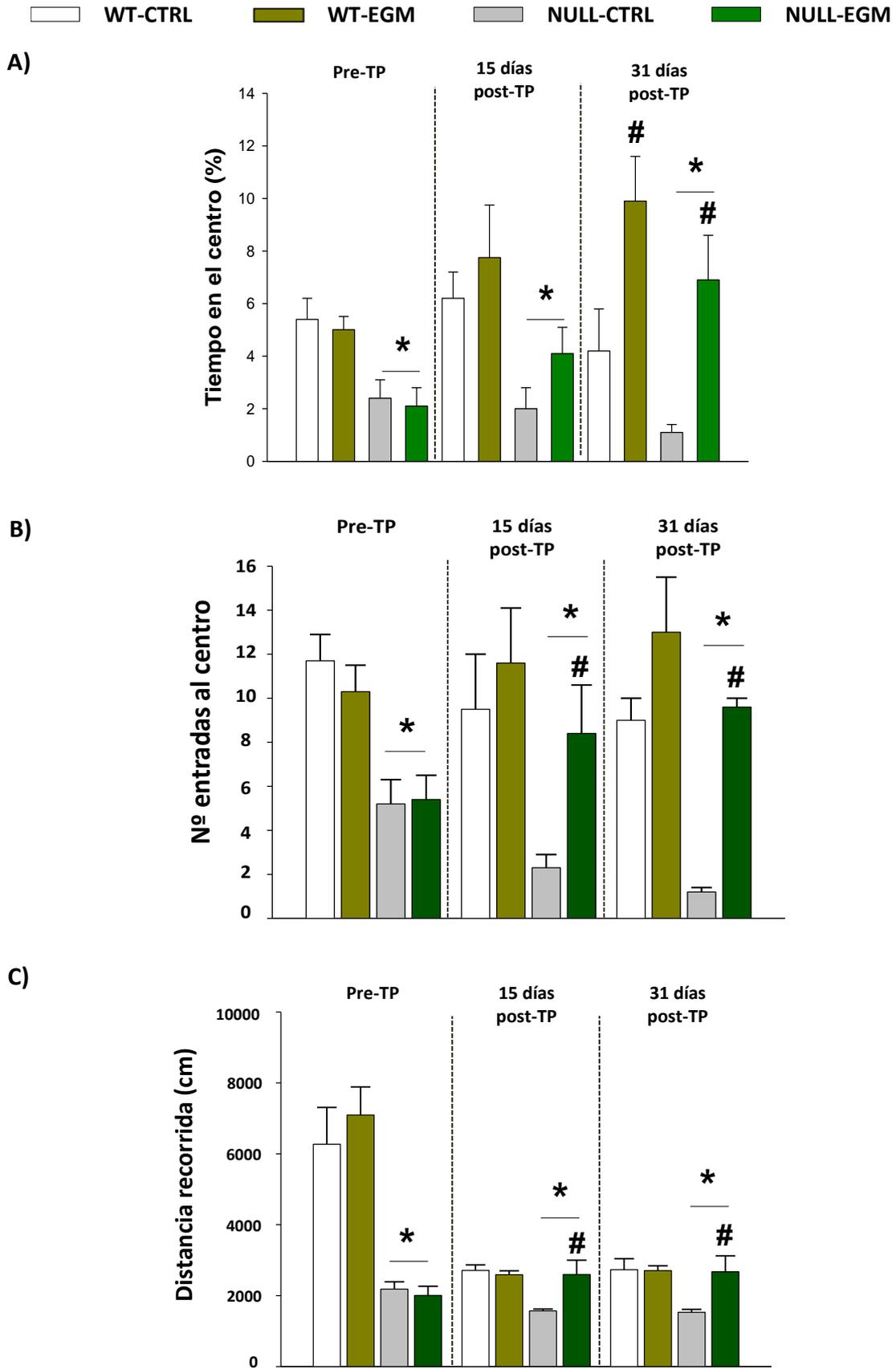
Antes del trasplante (pre-trasplante), los análisis mediante ANOVA de una vía mostraron un efecto significativo del genotipo para el porcentaje de tiempo que pasaban en el centro ($F_{(1,22)} = 14,326$; $p = 0,001$, Figura 38A) (medias \pm SEM (%): genotipo normal: $5,2 \pm 0,7$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $2,3 \pm 0,7$), el número de entradas al centro ($F_{(1, 22)} = 94,627$; $p < 0,001$, Figura 38B) (medias \pm SEM (nº entradas): genotipo normal: $11 \pm 1,2$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $5,2 \pm 1,4$), la distancia recorrida ($F_{(1,22)} = 45,346$; $p < 0,001$, Figura 38C) (medias \pm SEM (cm): genotipo normal: $6453,6 \pm 875,1$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $2094,8 \pm 233,3$), la velocidad media ($F_{(1,22)} = 33,918$; $p < 0,001$, Figura 38D) (medias \pm SEM (cm/s): genotipo normal: $26,2 \pm 6,2$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $7,2 \pm 1,1$), acicalamiento ($F_{(1,22)} = 4,624$; $p = 0,04$, Figura 38E) (medias \pm SEM (nº/min): genotipo normal: $0,6 \pm 0,1$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $1,5 \pm 0,1$) y exploración alzada ($F_{(1,22)} = 32,690$; $p < 0,001$, Figura 38F) (medias \pm SEM (nº/min): genotipo normal: $7,3 \pm 0,8$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $3,3 \pm 0,8$). Estas diferencias consistieron en que los ratones LPA₁-nulos presentaron una disminución en estas variables, así como un aumento en el

acicalamiento, tal como ya se había descrito anteriormente (Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010) y en coincidencia, además y en la mayoría de las variables, con situaciones de bloqueo de señalización con antagonistas del receptor, como se ha mostrado en el anterior capítulo.

La evaluación de la conducta a día 15 después del trasplante, mostró que se mantuvo la diferencia entre los genotipos para el porcentaje de tiempo que pasaban en el centro ($F_{(1,22)} = 4,491$; $p = 0,045$) (medias \pm SEM (%): genotipo normal: $7 \pm 1,5$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $2,3 \pm 0,7$), el número de entradas al centro ($F_{(1,22)} = 5,989$; $p = 0,0228$) (medias \pm SEM (nº entradas): genotipo normal: $10,6 \pm 2,5$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $5,4 \pm 1,4$), la distancia recorrida ($F_{(1,22)} = 6,291$; $p = 0,02$) (medias \pm SEM (cm): genotipo normal: $2649,9 \pm 133,8$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $2082,6 \pm 228,3$) y exploración alzada ($F_{(1,22)} = 11,044$; $p = 0,003$) (medias \pm SEM (nº/min): genotipo normal: $5,9 \pm 0,8$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $3,2 \pm 0,6$), parámetros éstos que se mantuvieron reducidos en los ratones nulos para el receptor LPA₁ respecto al ratón normal. Para analizar el grado de efecto del trasplante, se compararon los grupos de los ratones en cada genotipo, trasplantados con precursores respecto a los controles (trasplantados con células muertas), es decir, WT-EGM vs. WT-CTRL y los grupos NULL-EGM vs. NULL-CTRL. En este caso, el ANOVA de una vía mostró que no hubo ninguna diferencia significativa entre las variables analizadas entre los grupos WT-EGM y WT-CTRL. Por contra, el grupo NULL-EGM incrementó el número de entradas al centro ($F_{(1,9)} = 8,323$; $p = 0,018$) (medias \pm SEM (nº entradas): NULL-CTRL: $2,3 \pm 0,6$; NULL-EGM: $8,4 \pm 2,2$), la distancia recorrida ($F_{(1,11)} = 7,239$, $p = 0,025$) (medias \pm SEM (cm): NULL-CTRL: $1570,7 \pm 50,1$; NULL-EGM: $2594,9 \pm 406,4$) y la velocidad media ($F_{(1,9)} = 5,619$; $p = 0,042$) (medias \pm SEM (cm/s): NULL-CTRL: $6 \pm 0,6$; NULL-EGM: $9,2 \pm 1,3$), comparado con su grupo control NULL-CTRL. Estos datos podrían reflejar que, a día 15 post-trasplante, las nuevas células estarían comenzando a modificar, debido a su integración funcional que conllevaría la liberación de GABA, el entorno celular local del hipocampo dorsal, conduciendo a una mejora histofisiológica del hipocampo, que redundaría, finalmente, en una mejora en la conducta exploratoria y de tipo ansiosa.

A día 31 después del trasplante, el ANOVA de una vía mostró que se mantenía la diferencia por el genotipo de permanencia en el centro ($F_{(1,22)} = 4,731$; $p = 0,041$) (medias \pm SEM (%): genotipo normal: $7,1 \pm 1,7$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $4 \pm 1,5$), en el

número de entradas al centro ($F_{(1,22)} = 6,428$; $p = 0,019$) (medias \pm SEM (nº entradas): genotipo normal: 11 ± 2 ; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $5,6 \pm 0,9$), la distancia recorrida ($F_{(1,22)} = 4,531$; $p = 0,044$) (medias \pm SEM (cm): genotipo normal: $2718,7 \pm 221,9$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $2102,9 \pm 264,7$), la velocidad media ($F_{(1,22)} = 5,559$; $p = 0,028$) (medias \pm SEM (cm/s): genotipo normal: $9,2 \pm 0,7$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $7 \pm 0,9$) y exploración alzada ($F_{(1,22)} = 19,420$; $p < 0,001$) (medias \pm SEM (nº/min): genotipo normal: $4,1 \pm 0,7$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $1,7 \pm 0,2$), presentando, por tanto, reducción de todos estos parámetros los ratones carentes del receptor LPA₁ respecto de los normales. Sin embargo, de manera evidente, cuando los grupos eran comparados con sus respectivos controles, ambos, esta vez, mostraron diferencias significativas, con un aumento, en el grupo trasplantado (WT-EGM y NULL-EGM) respecto al control (WT-CTRL y NULL-CTRL), del tiempo de permanencia en el centro del campo abierto ($F_{(1,11)} = 4,857$; $p = 0,049$; medias \pm SEM (%): WT-CTRL: $4,2 \pm 1,6$; WT-EGM: $9,9 \pm 1,7$; $F_{(1,9)} = 45,144$; $p < 0,001$; medias \pm SEM (%): NULL-CTRL: $1,1 \pm 0,3$; NULL-EGM: $6,9 \pm 1,7$, respectivamente). Además, el grupo NULL-EGM presentó un aumento del número de entradas al centro, comparado con el grupo NULL-CTRL ($F_{(1,9)} = 29,883$; $p < 0,001$) (medias \pm SEM (nº entradas): NULL-CTRL: $1,5 \pm 0,3$; NULL-EGM: $9,6 \pm 1,4$). En cuanto a la locomoción, el grupo NULL-EGM mostró un aumento en la distancia recorrida ($F_{(1,9)} = 12,222$; $p = 0,007$) (medias \pm SEM (cm): NULL-CTRL: $1532,5 \pm 79,7$; NULL-EGM: $2673,2 \pm 449,7$) y en la velocidad media ($F_{(1,9)} = 7,514$; $p = 0,023$) (medias \pm SEM (cm/s): NULL-CTRL: $5,1 \pm 0,3$; NULL-EGM: $8,9 \pm 1,5$). Además, este mismo grupo redujo la conducta de acicalamiento ($F_{(1,9)} = 7,719$; $p = 0,021$) (medias \pm SEM (cm/min): NULL-CTRL: $0,9 \pm 0,2$; NULL-EGM: $0,2 \pm 0,2$) en comparación con el grupo NULL-CTRL. Estos resultados sugieren que a día 31, las células derivadas de la EGM se han integrado en mucha mayor medida, generando, como resultado final, un efecto positivo ansiolítico sobre la conducta de tipo ansiosa tanto para los animales normales como para los animales carentes del receptor LPA₁, siendo más relevante para este grupo donde se triplicó el tiempo de permanencia y número de entradas en el centro, de manera que el animal nulo para LPA₁ trasplantado con los precursores GABAérgicos alcanzó una conducta con parámetros, en casos concretos como el número de entradas y el tiempo de permanencia al centro, muy indicativos del nivel de ansiedad, muy similares incluso a los del animal normal en estado basal (Figura 38).



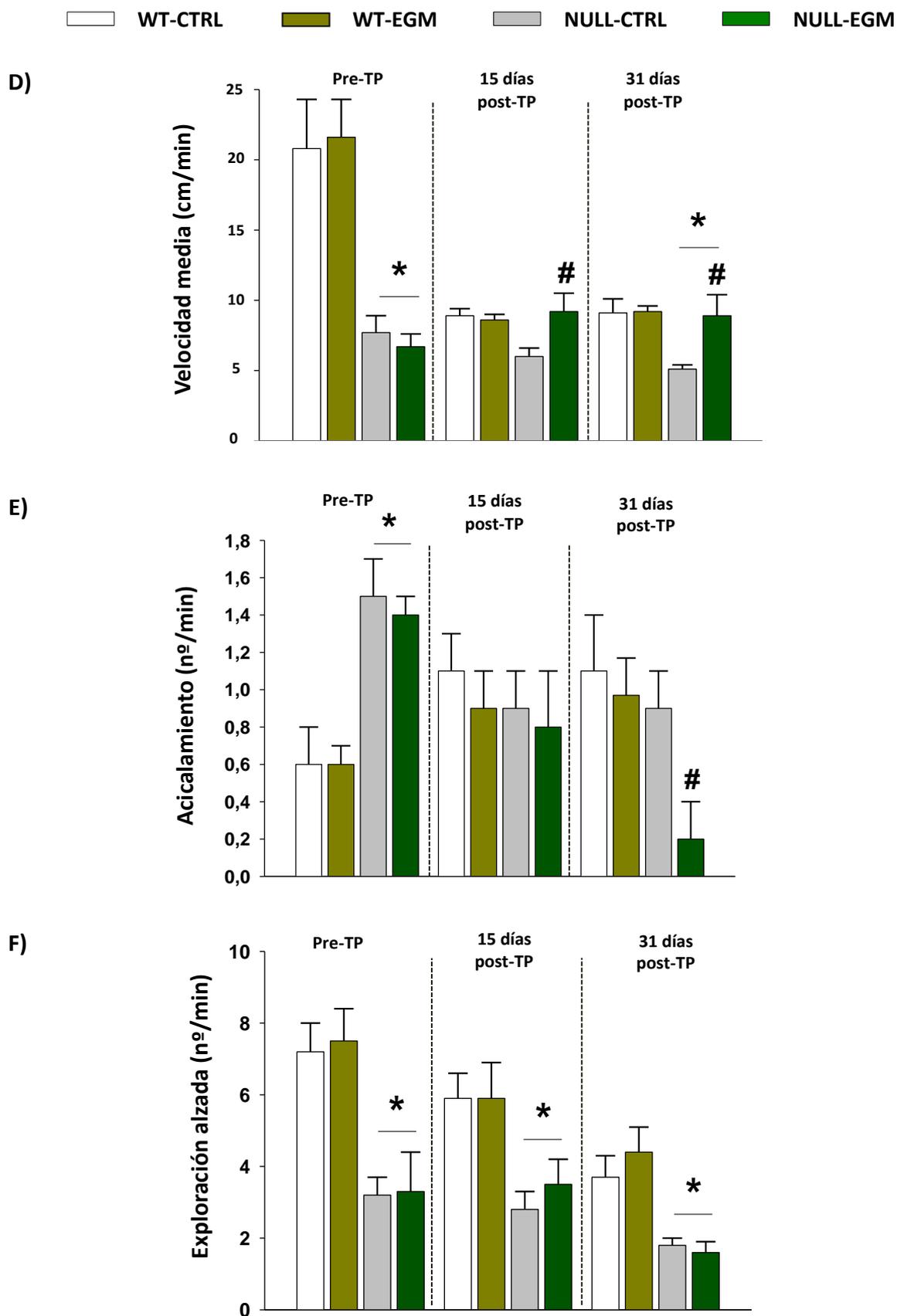


Figura 38. Evaluación de las conductas relacionadas con la ansiedad y exploración en el campo abierto. Las gráficas muestran la valoración de cada conducta en campo abierto, para cada situación experimental, y expresadas como medias \pm SEM. Los datos pre-trasplante (Pre-TP) muestran que los

maLPA₁-nulos mostraron una reducción en el tiempo que permanecieron en el centro, un menor número de entradas, menor locomoción (distancia recorrida y velocidad media) y menor frecuencia de exploración alzada, a la vez que una mayor frecuencia de conductas de acicalamiento. Aún cuando estas conductas se mantuvieron siempre con respecto a los genotipos normales, el trasplante supuso un cambio de tendencia, con una respuesta de tipo ansiolítico que logró llevar al animal nulo trasplantado a mostrar los parámetros medidos a un nivel similar al observado en el animal normal en estado basal, previo a trasplante. El mayor efecto del trasplante tuvo lugar a día 31, en el cual los grupos WT-EGM y NULL-EGM mostraron un incremento en el tiempo en el centro (A) y un mayor número de entradas en el centro sobre todo para el grupo NULL-EGM (B). Por otra parte, el grupo NULL-EGM mostró un aumento en la locomoción (C y D) y disminuyeron la frecuencia de acicalamiento (D). Se muestran los análisis *post hoc* LSD: diferencias entre genotipos (* $p < 0,05$); diferencias entre los grupos WT-CTRL vs. WT-EGM y NULL-CTRL vs. NULL-EGM (# $p < 0,05$).

Laberinto en cruz elevado

El análisis del comportamiento relacionado con la ansiedad también fue medido a través de esta prueba los días 30 y 31 post-trasplante (Figura 34) a objeto de valorar la conducta de tipo ansiosa en un contexto novedoso, así como la respuesta por re-exposición ya que se sabe que la primera exposición (novedad) altera la conducta exploratoria cuando los animales son re-expuestos al mismo test 24 horas después (Dawson et ál., 1994; Holmes et ál., 2000). Este tipo de análisis, con exposición a la prueba y reexposición a la misma, representan una mejora sobre la capacidad de la prueba para evaluar comportamiento. Si por un lado, en una primera exposición a la tarea, los animales aprendan y recuerdan información relevante sobre zonas potencialmente peligrosas (brazos abiertos), por otra, en condiciones de familiaridad, la respuesta del animal dependerá de la experiencia previa y la valoración de ésta a nivel emocional. En condiciones normales, los animales tienden a reducir la exploración, y en particular la efectuada en los brazos abiertos, durante la segunda exposición. Éste hecho se ha interpretado como un fenómeno de habituación locomotriz (Dawson et ál., 1994) pero también, como un fenómeno de sensibilización, resultado de una valoración de peligro excesivo durante la primera exposición (evitación pasiva), habiéndose demostrado esencial el papel del hipocampo para el recuerdo de la primera exposición (Carobrez y Bertoglio, 2005).

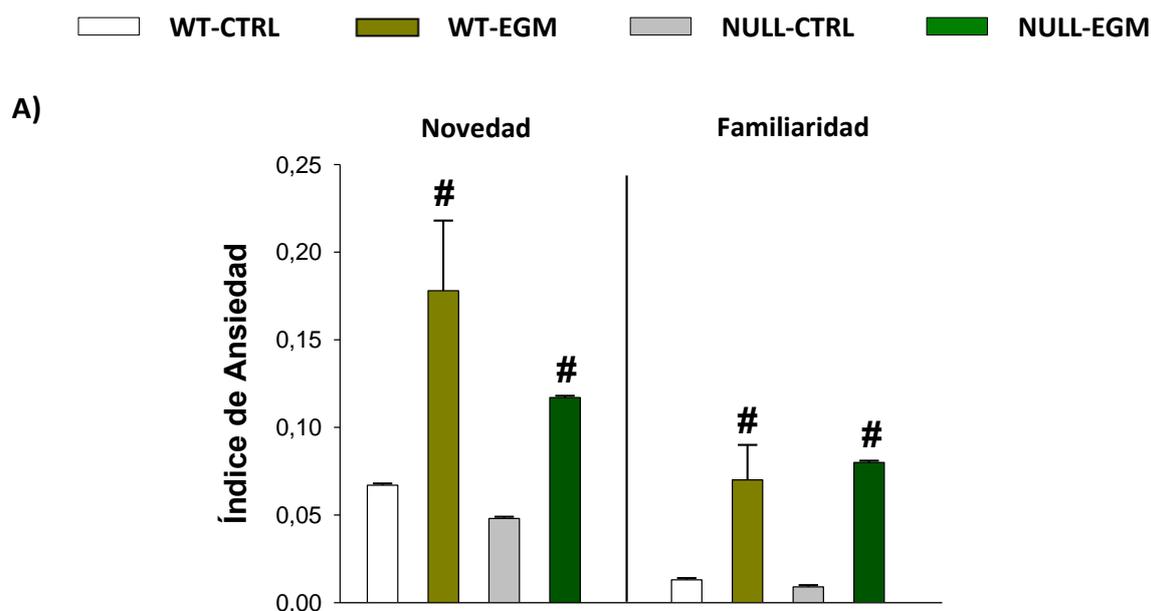
En los resultados de ANOVA de una vía para la situación de contexto de novedad revelaron un efecto del trasplante (WT-CTRL vs. WT-EGM ($F_{(1,8)} = 7,379$; $p = 0,026$) (medias \pm SEM: WT-CTRL: $0,067 \pm 0,001$; WT-EGM: $0,152 \pm 0,04$) y NULL-CTRL vs. NULL-EGM ($F_{(1,8)} = 5,821$; $p = 0,042$, Figura 39A) (medias \pm SEM: NULL-CTRL: $0,048 \pm 0,001$; NULL-EGM: $0,117 \pm 0,001$) sobre el índice de ansiedad. Esta diferencia fue debida a que tanto el grupo WT-EGM como el grupo NULL-EGM, incrementaron el tiempo de permanencia en los brazos abierto indicando un menor comportamiento de tipo ansioso en el primer día. El análisis mediante ANOVA de una vía para la situación de contexto de familiaridad continuaron mostrando efecto del trasplante en el índice de ansiedad (WT-CTRL vs. WT-EGM: $F_{(1,9)} = 6,714$; $p = 0,029$ (medias \pm SEM: WT-CTRL: $0,013 \pm 0,001$; WT-EGM: $0,07 \pm 0,02$); NULL-CTRL vs. NULL-EGM: $F_{(1,8)} = 5,597$; $p = 0,045$) (medias \pm SEM: NULL-CTRL: $0,009 \pm 0,001$; NULL-EGM: $0,08 \pm 0,001$), aunque hubo una disminución generalizada del mismo debido al proceso de habituación y sensibilización, como también ocurrió en los grupos WT-CTRL y NULL-CTRL en situación de familiaridad.

Con respecto al número de entradas en los brazos abiertos, los análisis mediante ANOVA de una vía para el contexto de novedad mostraron un efecto de los genotipos ($F_{(1,19)} = 4,535$; $p = 0,046$, Figura 39B) (medias \pm SEM (nº entradas): genotipo normal: $3 \pm 0,5$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $2 \pm 0,2$) indicando que el genotipo normal presentó una mayor exploración. Comparando los grupos trasplantados con sus controles para el primer ensayo (contexto de novedad), los ANOVAs de una vía reveló que hubo un efecto del trasplante (WT-CTRL vs. WT-EGM: $F_{(1,8)} = 4,803$; $p = 0,05$ (medias \pm SEM: WT-CTRL: $2,2 \pm 0,05$; WT-EGM: $3,8 \pm 0,5$); NULL-CTRL vs. NULL-EG: $F_{(1,8)} = 7,68$; $p = 0,024$ (medias \pm SEM: NULL-CTRL: $1,5 \pm 0,2$; NULL-EGM: $2,5 \pm 0,3$)), debido al incremento del número de entradas en los brazos abiertos. En el contexto de familiaridad no se encontró ningún efecto aunque los grupos WT-EGM y NULL-EGM, mostraron una mayor exploración con respecto a sus grupos controles.

La actividad locomotora (distancia recorrida y velocidad media) también fueron analizadas en esta prueba. Con respecto a la distancia recorrida, en el contexto de novedad no hubo ningún efecto sobre los genotipos ni sobre el trasplante, aunque los grupos WT-EGM y NULL-EGM mostraron un mayor aumento (Figura 39C). En el segundo día, hubo una bajada generalizada en los cuatros grupos experimentales indicando una habituación y sensibilización al test. En este caso, el análisis mediante ANOVA de una vía mostraron un efecto del

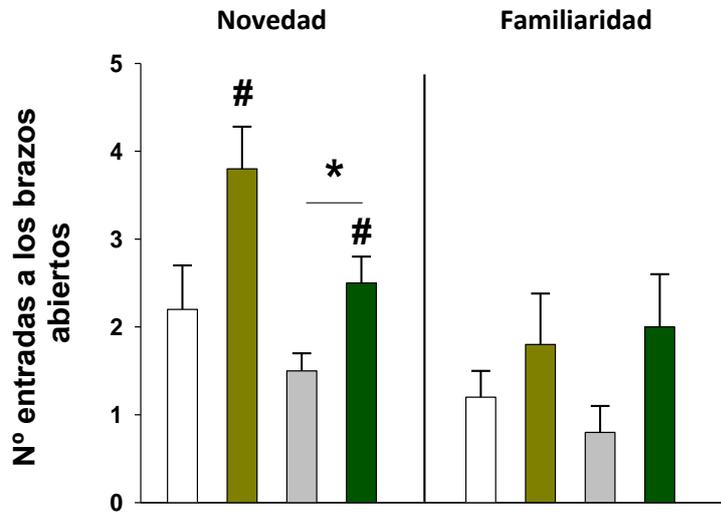
trasplante entre los grupos NULL-CTRL y NULL-EGM ($F_{(1,8)} = 10,034$; $p = 0,013$) (medias \pm SEM (cm): NULL-CTRL: $1275,7 \pm 167,6$; NULL-EGM: $1761,3 \pm 183,7$). Con respecto a la velocidad media, el primer día del ensayo se encontró el mismo patrón que en la distancia recorrida, es decir, no hubo ningún efecto, no obstante, los grupos trasplantados mostraron una actividad locomotora mayor (Figura 39C). En el contexto de familiaridad, los cuatro grupos experimentales bajaron su velocidad media, que a excepción del grupo NULL-EGM que mostró una velocidad media significativamente mayor con respecto a su grupo control NULL-CTRL ($F_{(1,8)} = 9.209$; $p = 0,016$) (medias \pm SEM (cm/s): NULL-CTRL: $3,9 \pm 0,6$; NULL-EGM: $5,9 \pm 0,6$).

Los datos obtenidos en esta prueba van en la línea de los resultados obtenidos en el campo abierto, ya que los grupos trasplantados mostraron un mismo patrón en ambas pruebas, con una respuesta de tipo ansiolítica que consistió, principalmente, en un mayor porcentaje de tiempo de permanencia en el centro del campo abierto, y un mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos, en el laberinto en cruz elevado. De manera significativa, más allá del comportamiento observado en el animal normal, que también mejora su estado conductual, fue relevante la capacidad de rescate de perfil en los animales carentes del receptor LPA_1 , en los que el trasplante de precursores GABAérgicos supone un cambio de perfil ansiogénico a ansiolítico.

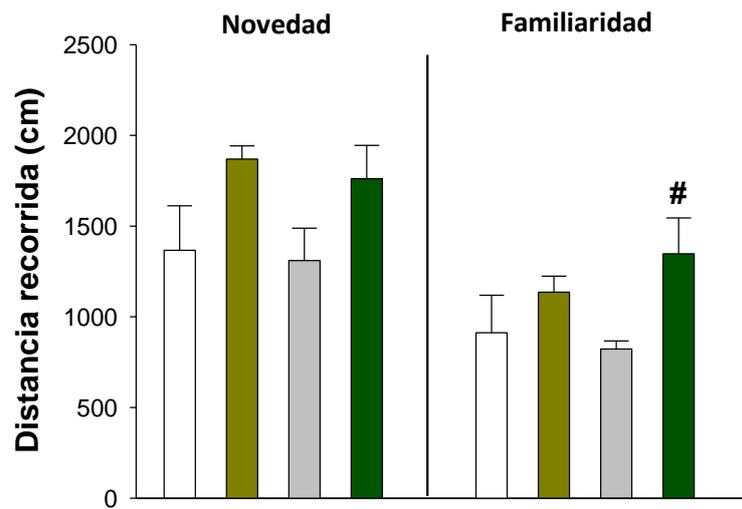


WT-CTRL WT-EGM NULL-CTRL NULL-EGM

B)



C)



D)

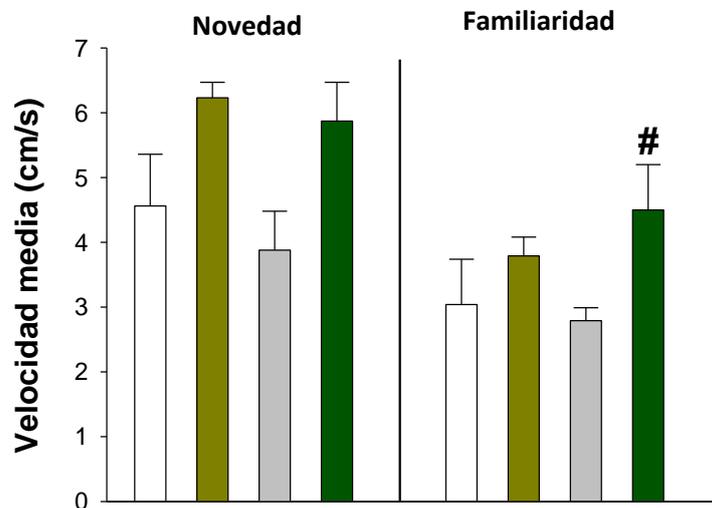


Figura 39. Conducta relacionada con la ansiedad analizada en el laberinto en cruz elevado.

Las gráficas muestran la valoración de cada conducta en la prueba del laberinto en cruz elevado, para cada situación experimental, y expresadas como medias \pm SEM. (A) Los grupos trasplantados WT-EGM y NULL-EGM mostraron un incremento en el índice de ansiedad en el primer día (novedad) y el segundo día del ensayo (familiaridad), respecto a los controles WT-CTRL y NULL-CTRL. (B) En cuanto al número de entradas, y siempre respecto a los controles, los grupos WT-EGM y NULL-EGM entraron un mayor número de veces a los brazos abiertos en el primer día del ensayo, disminuido éste en el segundo día de exposición debido a la habituación y sensibilización al test. (C) La locomoción fue mayor en los animales trasplantados siendo más claro en el grupo NULL-EGM en el segundo día de ensayo. Se muestran los análisis *post hoc* LSD: diferencias entre los genotipos (* $p < 0,05$); diferencias entre los grupos WT-CTRL vs. WT-EGM y NULL-CTRL vs. NULL-EGM (# $p < 0,05$).

3.1.2 Afrontamiento activo y pasivo en el test de natación forzada

Se testó el comportamiento de los animales en el test de natación forzada, un modelo comúnmente utilizado en la investigación sobre la depresión (Porsolt, 1997; Cryan et ál., 2002). Es una prueba donde el animal mostraría, ante una situación límite, un comportamiento activo, o bien pasivo, asociado éste último, generalmente, a una conducta de tipo depresiva. La prueba registra el comportamiento del animal durante 6 minutos, en los que es forzado a responder tras ser colocado en un recipiente con agua. El animal es forzado, así, a una situación aversiva de la que no pueden escapar optando, en un tiempo variable dependiente del estado del animal, por dejar de moverse hasta quedar inmóvil y pudiendo presentar, o no, conductas de escape (revisado en Petit-Demouliere et ál., 2005). La prueba se analizó antes del trasplante y los días 15 y 31 post-trasplante (Figura 34), analizándose el comportamiento durante los últimos 4 minutos.

Antes del trasplante, el ANOVA de una vía mostró que no hubo un efecto del genotipo sobre el tiempo de inmovilidad, pero en cambio, sí hubo un efecto del genotipo sobre la primera latencia de inmovilidad ($F_{(1,22)} = 11,831$; $p = 0,002$, Figura 40) (medias \pm SEM (s): genotipo normal: $32,6 \pm 9,1$; genotipo nulo para el receptor LPA_1 : $6,1 \pm 1,9$). Los ratones carentes del receptor LPA_1 mostraron un menor tiempo para quedarse inmóviles respecto al genotipo salvaje, que mantuvo durante un tiempo mayor la conducta activa o de esperanza.

A 15 días después del trasplante, el ANOVA de una vía reveló que hubo diferencias significativas entre los genotipos en el porcentaje de inmovilidad ($F_{(1,22)} = 5,366$; $p = 0,03$) (medias \pm SEM (%): genotipo normal: $77,3 \pm 2,8$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $56,8 \pm 8,2$) debido a que los ratones normales (WT-CTRL y WT-EGM) aumentaron el tiempo de este comportamiento, especialmente frente a los nulos trasplantados NULL-EGM. También, se observó que la primera latencia de inmovilidad para los ratones normales (medias \pm SEM (s): WT-CTRL: 3 ± 1 y WT-EGM: $5,5 \pm 1,5$) disminuyó bastante siendo similar a los resultados obtenidos en los ratones nulos para el receptor LPA₁ (medias \pm SEM (s): NULL-CTRL: $4,1 \pm 0,7$ y NULL-EGM: $5,2 \pm 1,1$).

A día 31 después del trasplante, los grupos WT-CTRL y WT-EGM continuaron incrementando el tiempo de inmovilidad siendo significativamente diferente a los animales trasplantados NULL-EGM carentes del receptor LPA₁ ($F_{(1,22)} = 8.484$; $p = 0,008$) (medias \pm SEM (%): genotipo normal: $82,1 \pm 3,9$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $65,9 \pm 3,2$). Este efecto global mostrado por los grupos WT-CTRL, WT-EGM y NULL-CTRL, en el que el tiempo de inmovilidad aumenta conforme se avanza en las exposiciones repetidas del test, puede ser debido al proceso de habituación a la prueba (Parra et al 1999; Dal-Zotto et ál., 2000). De manera llamativa, únicamente el grupo NULL-EGM no siguió este patrón, mostrando apenas variación a lo largo de toda la prueba y sugiriendo, bien un defecto de habituación específico en esta prueba (poco probable ya que no se observó en campo abierto, ni laberinto en cruz elevado), o bien una respuesta activa, en cuyo caso representaría un cambio de perfil conductual a tener en cuenta, aún cuando no se haya obtenido diferencia estadísticamente significativa.

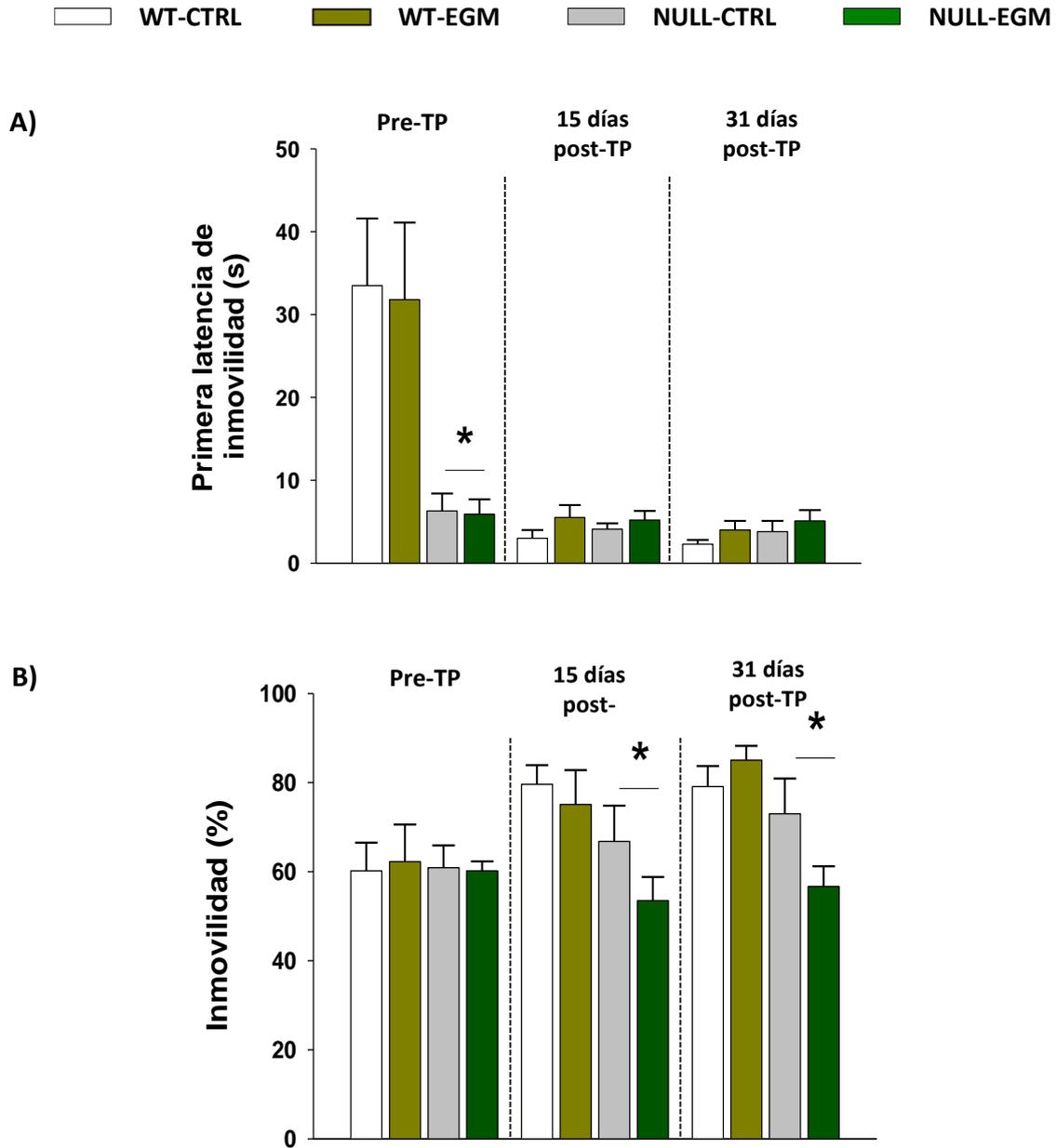


Figura 40. Conducta pasiva, primera latencia de inmovilidad y conductas activas del test de natación forzada. Las gráficas muestran las valoraciones de cada parámetro en el test de natación forzada, para cada situación experimental, expresadas como medias \pm SEM. Se muestran los análisis *post hoc* LSD: diferencias entre genotipos (* $p < 0,05$).

3.1.3 Las células trasplantadas no afectaron a la actividad motora

Para analizar si el trasplante pudo haber provocado alguna alteración en el proceso motor o sobre la coordinación, los animales fueron analizados en el test de actividad en rodillo los días 25, 26, 27, 28 y 29 después del trasplante (Figura 34). El ANOVA de medidas repetidas ('genotipo x tratamiento x día') no mostró efecto entre las distintas interacciones. El análisis *post hoc* LSD mostró que hubo diferencias significativas entre el primer día de exposición al test (contexto novedad) y el cuarto día del ensayo de los cuatro grupos experimentales ($F_{(1,19)} = 18,240$, $p = 0,0005$, Figura 41). Estos resultados sugieren que los animales trasplantados no sufrieron alteraciones motoras ni provocadas por el proceso quirúrgico ni de manera más interesante, debido al propio trasplante de las células derivadas de interneuronas GABAérgicas, ya que los cuatro grupos experimentales fueron aumentando cada día su tiempo de permanencia en el rodillo.

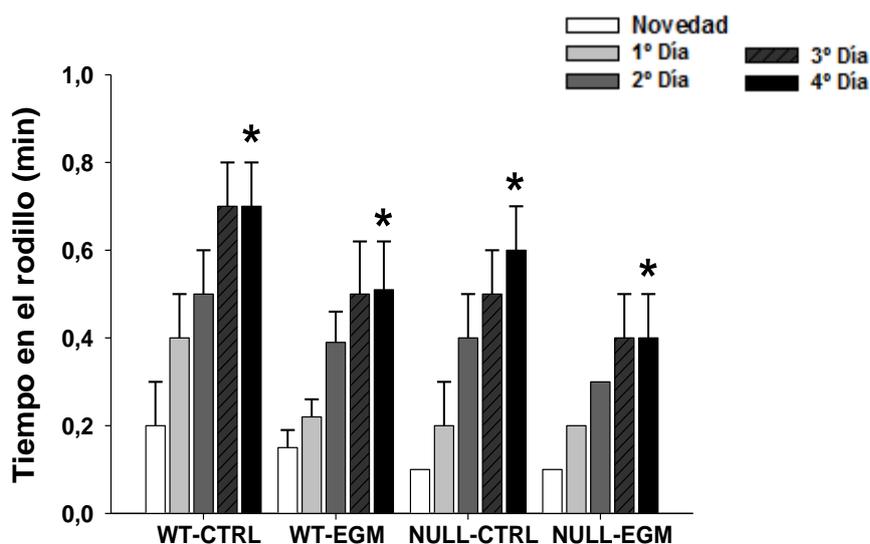


Figura 41. Rotarod. Las gráficas muestran las valoraciones del tiempo de permanencia en el rodillo, para cada situación experimental, y expresadas como medias \pm SEM. Los cuatro grupos experimentales mostraron durante los cuatro días siguientes, un mayor tiempo de permanencia en el rodillo conforme se iban pasando los ensayos. Se muestran los análisis *post hoc* LSD: diferencias entre contexto novedoso (habituaación) vs. cuarto día del ensayo (* $p < 0,05$).

3.2 Caracterización celular de los precursores de interneuronas GABAérgicas trasplantados

3.2.1 Supervivencia de las células trasplantadas

A cada ratón se le trasplantó un total de 8×10^5 células derivadas de la EGM, mediante inyecciones distribuidas en la zona anterior y posterior del hipocampo dorsal. En ningún caso se observó inflamación ni alteración de celularidad en la zona de cada trasplante. La evaluación cuantitativa de estas células se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia, primero para confirmar la presencia de células GFP⁺ y segundo, para verificar su diferenciación, analizando identidad de interneurona inhibidora que fue detectada por la co-localización con los marcadores interneuronales GABA, PV, CB, CR, NPY o SOM.

En relación a la supervivencia celular, los resultados obtenidos indicaron que, tras 31 días de su inyección, únicamente sobreviven menos del 10% de las células. Así, en el grupo NULL-EGM sobrevivieron un total de $7,92 \% \pm 1,5 \%$ de células GFP⁺, mientras que en el grupo WT-EGM la supervivencia fue menor, un $2,93 \% \pm 0,5 \%$. Diferenciando según las zonas del hipocampo estudiadas, la mayor supervivencia celular obtenida en ambos grupos se observó en el giro dentado tanto en la zona anterior como posterior del hipocampo dorsal (WT-EGM en hipocampo dorsal anterior: $1,1 \% \pm 0,2$; hipocampo dorsal posterior: $0,82 \% \pm 0,4 \%$; NULL-EGM: en hipocampo dorsal anterior: $3,3 \% \pm 0,9 \%$; hipocampo dorsal posterior: $2,8 \% \pm 0,8 \%$). En la zona CA1 del hipocampo dorsal anterior se cuantificó alrededor de un $0,2 \% \pm 0,1 \%$ en el caso del grupo WT-EGM, mientras que, en el grupo NULL-EGM hubo un porcentaje algo mayor, estimado en $1,22 \% \pm 1,1 \%$. En la zona CA3 del hipocampo dorsal anterior, se encontró una supervivencia celular por igual en el grupo WT-EGM estimado en $0,2 \% \pm 0,1 \%$ que en el grupo NULL-EGM que se estimó en $0,2 \% \pm 0,1 \%$. En cuanto al hipocampo dorsal posterior, en la zona CA1 se observó una mayor supervivencia celular GFP⁺ en el grupo NULL-EGM estimado en $0,3 \% \pm 0,1 \%$ y en el grupo WT-EGM se estimó en $0,15 \% \pm 0,09 \%$. En la zona CA3 del hipocampo dorsal posterior se observó mayor supervivencia de células GFP⁺ en el grupo WT-EGM estimado en $0,28 \% \pm 0,09 \%$ frente al estimado en el grupo NULL-EGM, $0,1 \% \pm 0,09 \%$ (Figura 42).

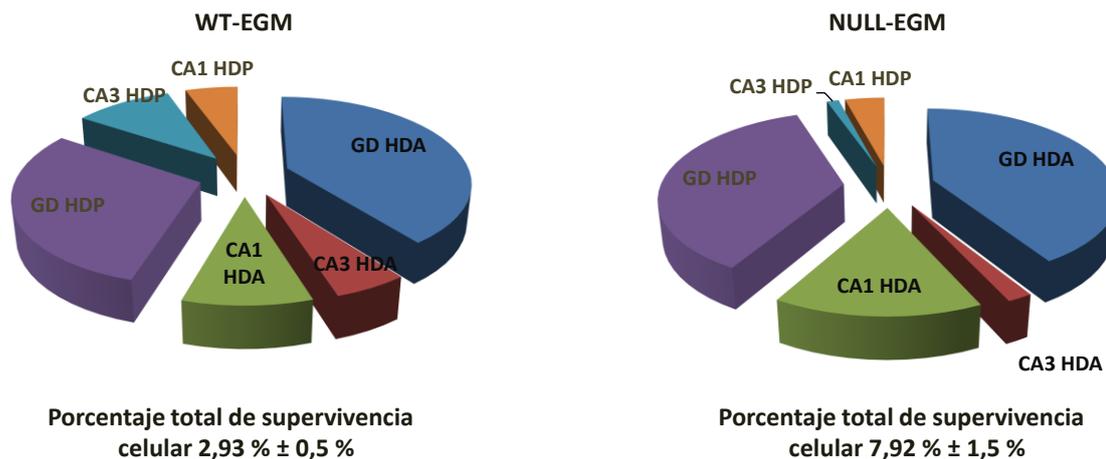


Figura 42. Porcentaje de supervivencia de las células GFP⁺ trasplantadas el hipocampo dorsal. Se muestran los porcentajes de supervivencia en las regiones GD, CA3 y CA1 del hipocampo dorsal anterior y posterior de los grupos WT-EGM y NULL-EGM.

3.2.2 Subtipos de interneuronas GABAérgicas derivadas de la eminencia ganglionar medial

Para conocer la diferenciación efectiva de los precursores en interneuronas GABAérgicas se analizó patrón neuroquímico, analizando en el hipocampo dorsal el porcentaje total de células que colocalizaron GFP⁺ y el marcador correspondiente en el hipocampo dorsal (Figura 43).

En el caso del grupo WT-EGM, el 45,3 % ± 11,4 % de las células GFP⁺ expresaron GABA frente al 74,2 % ± 12,8 % obtenido en el grupo NULL-EGM. En cuanto a la diferenciación del subtipo de interneuronas, el análisis reveló que las células GFP⁺ fueron positivas para los marcadores PV, CB, CR, NPY y SOM presentando un porcentaje distinto en cada genotipo (Tabla 16 y Figura 43). Así, el análisis mediante ANOVA de una vía mostraron que hubo diferencias significativas entre los marcadores GABA ($F_{(1,10)} = 5,389$; $p = 0,042$), CR ($F_{(1,10)} = 13,749$; $p = 0,004$), NPY ($F_{(1,10)} = 7,737$; $p = 0,019$) y SOM ($F_{(1,10)} = 5,703$; $p = 0,038$) (Figura 43 y Figura 44) encontrándose un porcentaje claramente mayor de estos marcadores en los animales carentes del receptor LPA₁ (NULL-EGM), respecto al ratón normal (WT-EGM). Los marcadores neuroquímicos más presentes en cada genotipo fueron PV para el caso del grupo WT-EGM, y NPY, en el grupo NULL-EGM.

Estos resultados sugieren que los precursores neuronales trasplantados se diferenciaron adecuadamente a interneuronas maduras en ambos grupos de animales, si bien, en el caso de los ratones maLPA_1 -nulos tiene lugar una sobreexpresión de algunos de los marcadores neuroquímicos. Estos resultados confirmaron la diferenciación de las células trasplantadas que, dada la repercusión descrita que el trasplante tuvo en conducta, parecen integrarse en la red neuronal local en ambos genotipos y producir cambios encaminados, particularmente en el animal carente del receptor, a una modulación y mejora del estado neuropsicológico.

Marcador Neuronal	WT-EGM	NULL-EGM
GFP ⁺ /GABA ⁺	45,3 ± 11,4	74,2 ± 12,8*
GFP ⁺ /PV ⁺	22,4 ± 7,2	21,8 ± 10,2
GFP ⁺ /CB ⁺	14,2 ± 8,1	21,8 ± 5,1
GFP ⁺ /CR ⁺	0,9 ± 0,9	23,7 ± 6,9*
GFP ⁺ /NPY ⁺	17,4 ± 5	42,2 ± 9,9*
GFP ⁺ /SOM ⁺	13,3 ± 4,2	31,4 ± 7*

Tabla 16. Porcentaje de las células GFP⁺ que expresaron marcadores de interneuronas GABAérgicas en el hipocampo dorsal de los grupos WT-EGM y NULL-EGM. (Diferencia entre WT-EGM vs. NULL-EGM: * $p < 0,05$).

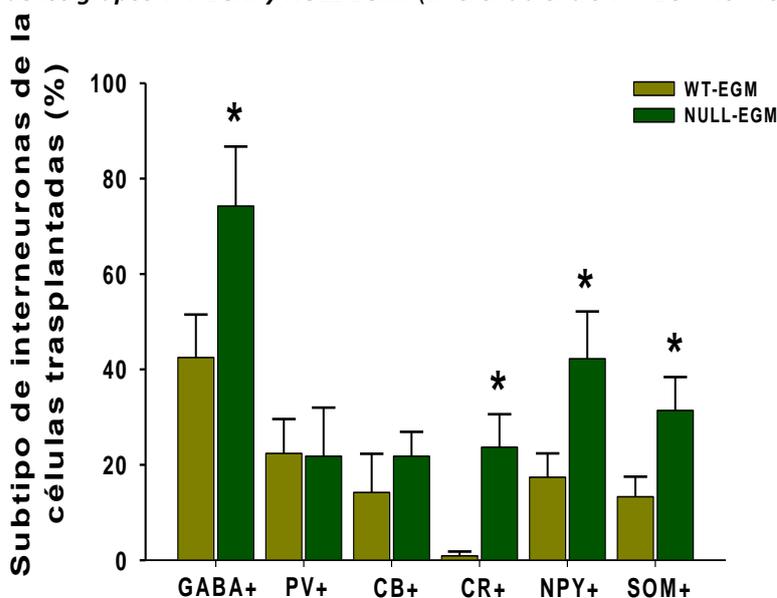
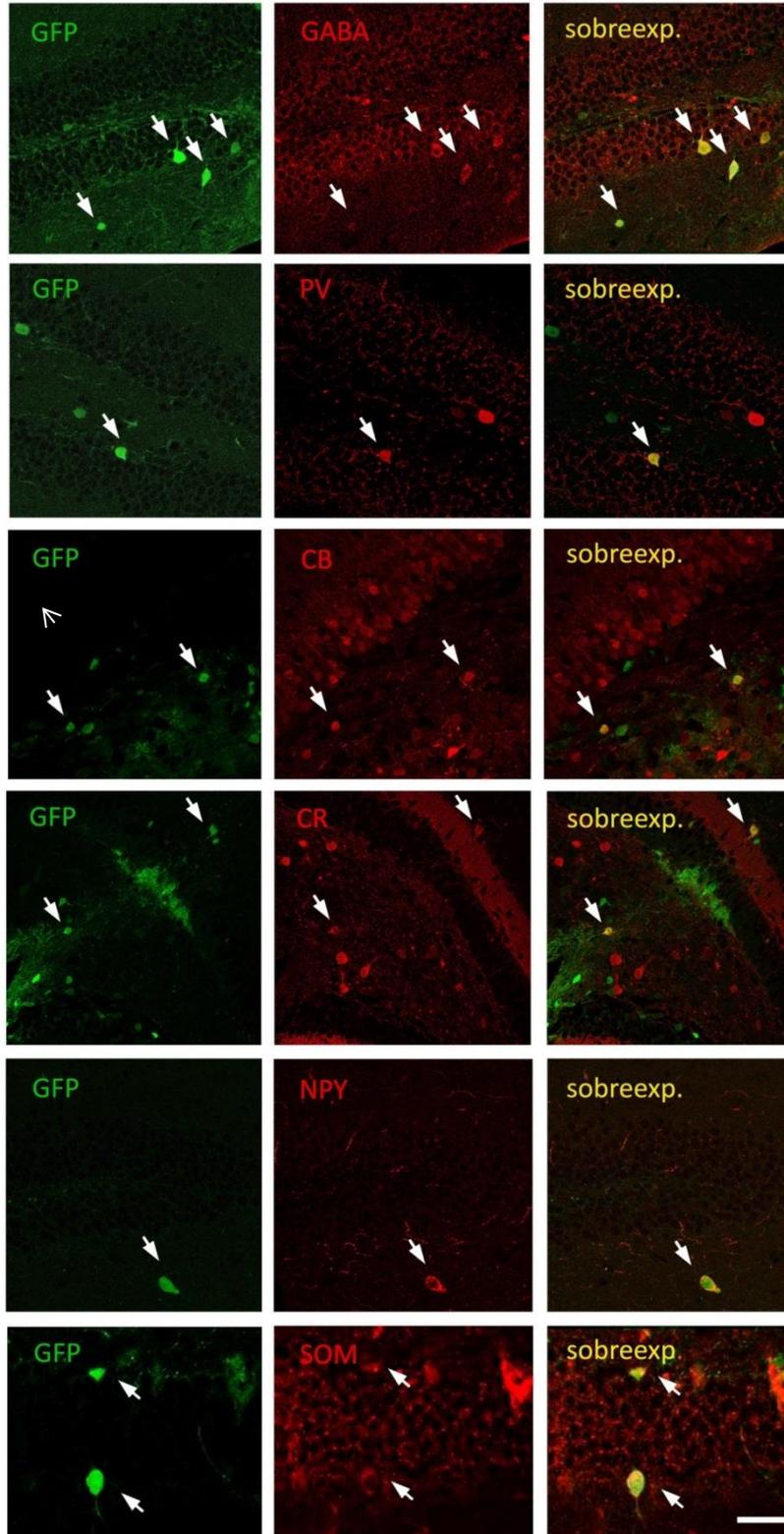


Figura 43. Caracterización de los precursores GABAérgicos. Las gráficas muestran los porcentajes de marcadores neuroquímicos expresados en las células GFP⁺ trasplantadas (medias ±

SEM). Los animales carentes del receptor mostraron una mayor expresión GABA, CR, NPY y SOM en las células GFP⁺, respecto a los ratones normales. LSD: diferencias entre WT-EGM vs. NULL-EGM (* $p < 0,05$).

WT-EGM



NULL-EGM

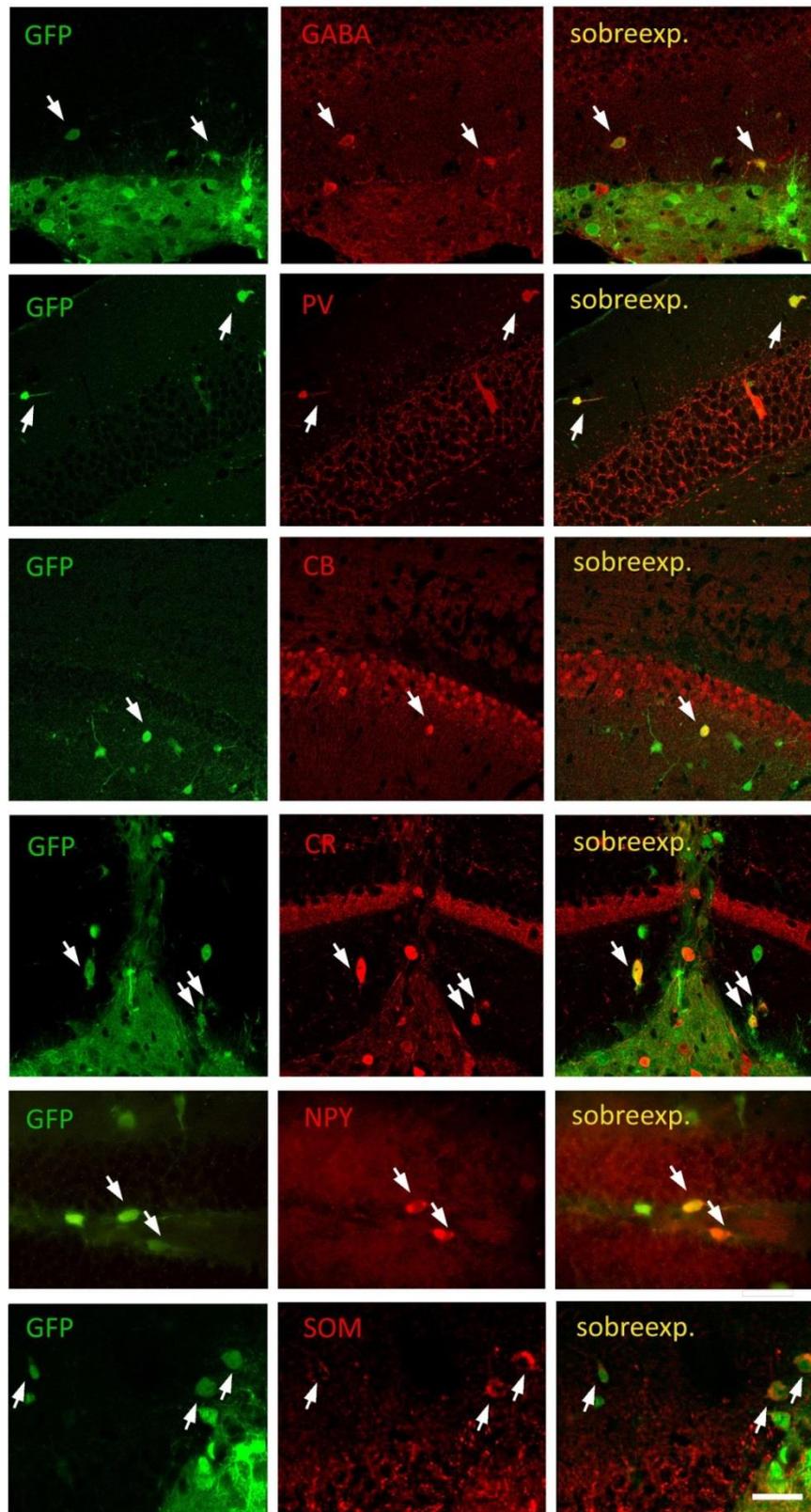


Figura 44. Imágenes representativas de la colocalización de los diferentes marcadores neuronales en el giro dentado de los grupos WT-EGM y NULL-EGM. Escala: GABA, PV, CB, CR, 50 μ m; NPY, SOM 25 μ m.

3.3 Proliferación celular

La proliferación celular fue analizada en la ZSG del hipocampo dorsal anterior y posterior en los cuatro grupos experimentales por medio de la administración de BrdU (en los días 30 y 31 del experimento, Figura 34). El análisis mediante ANOVA de una vía mostró que hubo un efecto del genotipo sobre la proliferación celular ($F_{(1,22)} = 13,908$; $p = 0,001$) (medias \pm SEM (nº células BrdU⁺): genotipo normal: $625,5 \pm 84,2$; genotipo nulo para el receptor LPA₁: $239,2 \pm 41,5$) (Figura 45) como previamente había sido descrito (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011). La administración de BrdU demostró que la neurogénesis global, a nivel de hipocampo, no se altera significativamente tras el trasplante de los precursores GABAérgicos en un entorno normal, manteniendo únicamente una ligera tendencia al alza. Sin embargo, el trasplante sí que tiene un efecto sobre la neurogénesis en un entorno deficitario como el nulo para el receptor. Así, en el grupo NULL-EGM se incrementó el número de células BrdU⁺ en comparación con el grupo NULL-CTRL ($F_{(1,9)} = 6,714$; $p = 0,032$) (medias \pm SEM (nº células BrdU⁺): NULL-EGM: $152 \pm 19,9$; NULL-EGM: $326,4 \pm 63,1$) indicando que los precursores neuronales derivados de la EGM trasplantados en los ratones carentes del receptor LPA₁ mejoraron las condiciones de neurogénesis en la ZSG.

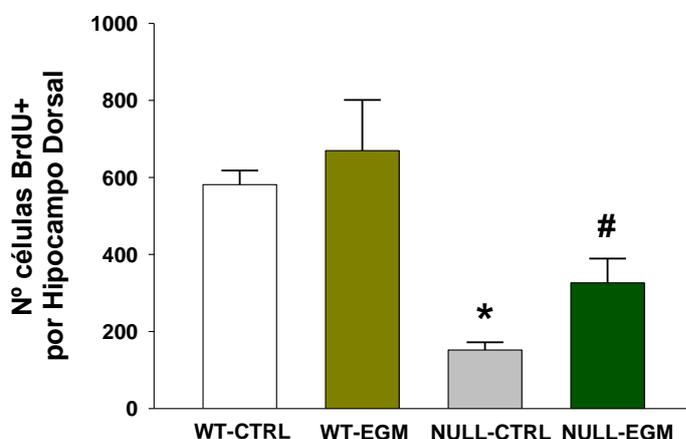


Figura 45. Proliferación celular en la ZSG del hipocampo dorsal en los cuatro grupos experimentales. La gráfica muestra el número de células BrdU⁺ en el hipocampo dorsal, para cada situación experimental, expresadas como medias \pm SEM. LSD: diferencias entre genotipos (* $p < 0,05$); diferencias entre los grupos NULL-CTRL vs. NULL-EGM (# $p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El potencial que supone añadir una modulación inhibitoria, una nueva fuente de liberación de GABA, a través de los precursores neuronales derivados de la EGM trasplantados en un cerebro huésped del ratón es, ciertamente, significativo y supone una puerta terapéutica para el tratamiento de diferentes patologías, modulando la hiperactividad del circuito neuronal local, lo que le confiere un interés extraordinario para enfermedades como la epilepsia (Álvarez-Dolado et ál., 2006; Baraban et ál., 2009; Kriegstein y Pitkanen, 2009; Raedt et ál., 2007; Thompson, 2009), enfermedad del Parkinson (Matríguez-Cerdeño et ál., 2010) o accidente cerebrovascular (Daadi et ál., 2009).

El ratón *Málaga*, nulo para el receptor LPA₁ presenta importantes alteraciones que han llevado a considerarlo modelo de estudios para diferentes patologías psiquiátricas. La aplicación de terapia celular a través de trasplantes de precursores GABAérgicos supone, por un lado, conocer algunos de los mecanismos afectados por la carencia del receptor, dependientes de la población de interneuronas inhibitorias y, por otro, la validación de estos procedimientos para rescatar algunos de los defectos observados y que son trasladables a otros modelos biológicos.

La capacidad de los precursores GABAérgicos para, trasplantados al cerebro huésped, actuar así, en el modelo murino, se ha confirmado en diferentes estudios (Álvarez-Dolado et ál., 2006; Daadi et ál., 2009; Martínez-Cerdeño et ál., 2010; Southwell et ál., 2010; Zipancic et ál., 2010). Con respecto a la conducta de tipo ansiosa, se ha demostrado que son capaces de generar una disminución de los niveles de ansiedad dependientes de la amígdala y del hipocampo tras el trasplante (Cunningham et ál., 2009; Valente et ál., 2013). Los resultados que se presenta en esta Tesis Doctoral siguen en la línea de estos estudios recientes, y es el primer estudio llevado a cabo en ratones carentes del receptor LPA₁.

4.1 Supervivencia celular, diferenciación a interneuronas maduras y proliferación celular

Los precursores neuronales derivados de la EGM trasplantados bilateralmente en la región anterior y posterior del hipocampo dorsal fueron capaces, tanto en animales normales como en los LPA₁-nulos, de diferenciarse a subtipos de interneuronas GABAérgicas. Con toda probabilidad, estas células diferenciadas son, en nuestro caso, capaces de realizar sinapsis con otras neuronas para implicarse en el circuito neuronal local, tal y como se ha observado en otros estudios (Álvarez-Dolado et ál., 2006; Baraban et ál., 2009; Zipancic et ál., 2010) y a juzgar por los cambios conductuales, más allá de los meramente histológicos.

Los resultados obtenidos en relación a la supervivencia de las células GFP⁺ en los cerebros huéspedes, ofrecen cifras algo menores respecto a lo descrito (Wichterle et ál., 1999; Álvarez-Dolado et ál., 2006; Hattiangady y Shetty, 2008; Baraban et ál., 2009; Waldau et ál., 2010; Zipancic et ál., 2010; Tanaka et ál., 2011). Sin embargo, hay varios estudios en los cuales consideran la posibilidad de la falta de correlación entre el dato cuantitativo de la supervivencia de las células trasplantadas y el efecto observado en el comportamiento del animal (De la Cruz et ál., 2011; Valente et ál., 2013). Southwell et ál., (2012) concluye que hay un límite para albergar a las nuevas neuronas trasplantadas en el cerebro del huésped. Conforme se incrementa el número de las células trasplantadas, se disminuye la supervivencia celular la cual está regulada por mecanismos intrínsecos. Además, a la supervivencia celular de las interneuronas endógenas, no se ve afectadas por el trasplante adicional (Southwell et ál., 2012). Por otra parte, entre los posibles factores que podrían explicar la diferencia de supervivencia de las células trasplantadas entre los genotipos, debemos de considerar la disminución, en los ratones carentes del receptor LPA₁, de las subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas que expresan PV, CB, CR, SOM y NPY. Es decir, debido a que los ratones maLPA₁-nulos presenta una menor densidad de neuronas que los ratones normales, podría haber más espacio cerebral para albergar a un mayor número de neuronas nuevas y así restaurar esa pérdida.

Los datos sugieren que las células trasplantadas tuvieron que estimular mecanismos de reparación endógenos o la formación de conjuntos neuronales alternativos para apoyar las funciones de las interneuronas perdidas y favorecer las nuevas conexiones (revisado en Álvarez-Dolado y Broccoli, 2011). Como mencionamos, la regionalización de la eminencia

ganglionar conlleva un patrón de destino neuroquímico de los precursores siendo, la EGM, en su caso, la que origina mayoritariamente los precursores que expresan PV y SOM (Anderson et ál., 1997; Butt et ál., 2005; Fogarty et ál., 2007), como observamos en los ratones normales y carentes del receptor. Sin embargo, de manera llamativa, los ratones maLPA_1 -nulos muestran en las poblaciones trasplantadas, respecto al ratón normal, una sobreexpresión de SOM y NPY, neuropéptidos moduladores fundamentales para el circuito inhibitorio del hipocampo (Colmers et ál., 1987; Boehm y Betz, 1997; Schweitzer et ál., 1998; Gibson et ál., 1999; Hu et ál., 2011, Jaglin et ál., 2012). Ambos péptidos se han relacionado con la actividad epiléptica en modelos de ratones epilépticos (Klapstein y Colmers, 1993; Tallent y Siggins, 1999; Mazarati y Wasterlain, 2002; Tu et ál., 2005). Además, la somatostatina está relacionada con el aprendizaje dependiente de hipocampo (McKay et ál., 2003) y el neuropéptido Y con la conducta de tipo ansiosa (Palmiter et ál., 1998; Karl et ál., 2008). La sobreexpresión de estos neuropéptidos en el grupo NULL-EGM, podría estar ligada a que los ratones carentes del receptor LPA_1 , presentan un menor número de neuronas que expresan SOM y NPY (datos no publicados) comparados con los ratones normales. Por otra parte, más allá de una cuestión física, es lógico suponer que, tras el trasplante, ante las deficiencias observadas, tengan lugar procesos de neuroadaptación específicos del microentorno neural. Aunque nuestros resultados sugieren que se vio favorecida la diferenciación a interneuronas que expresaron SOM y NPY para contrarrestar los déficits de la pérdida de este tipo de interneuronas mejorando, en última instancia, el comportamiento del animal, sería posible otra explicación no excluyente. En condiciones normales, y en patologías concretas de alta excitabilidad neuronal, como la epilepsia, SOM y NPY actúan como moduladores endógenos de la hiperexcitabilidad mediada por glutamato en el SNC (Sperk et ál., 1992; Vezzani et ál., 2000). Teniendo en cuenta esto y los datos que sostienen alteraciones del sistema glutamatérgico en los ratones nulos para el receptor LPA_1 , (Harrison et ál., 2003; Roberts et ál., 2005; Musazzi et ál., 2011; Blanco et ál., 2012) además del patrón de conducta en el campo abierto del ratón nulo sin precursores, extremadamente ansiogénico a los 31 días tras trasplante (tiempo de permanencia en centro muy reducido y conducta de acalamiento excesiva), el aumento de expresión de SOM y NPY podría, por tanto, estar vinculado a la modulación específica de dichos sistemas, habida cuenta de la participación del glutamato en ansiedad (revisado en Amiel y Mathew, 2007; Bermudo-Soriano et ál., 2012).

Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la falta del receptor LPA₁ tiene consecuencias sobre la neurogénesis y la maduración de las nuevas neuronas en el hipocampo adulto (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011). En las últimas décadas, los defectos en la neurogénesis hipocampal adulta ha sido relacionado con el comportamiento de tipo ansioso y depresivo (Snyder et ál., 2011), aunque hay otros estudios que sugieren que el bloqueo de neurogénesis es insuficiente para producir estas conductas (Vollmayr et ál., 2003; Holick et ál., 2008; Li et ál., 2008; Surget et ál., 2009). En concordancia con nuestros datos previos (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011), los ratones LPA₁-nulos mostraron una reducción de la neurogénesis hipocampal adulta comparado con el genotipo normal. Interesantemente, el grupo NULL-EGM presentó un aumento del número de células BrdU⁺ en la ZSG comparado con su grupo control, aumento vinculado, por tanto, a la nueva fuente de GABA tras el trasplante, y dado el papel que la transmisión GABAérgica juega en la regulación de la formación de las nuevas neuronas (Shen et ál., 2012; Song et ál., 2012) así como en la maduración dendrítica y la integración sináptica (Ge et ál., 2007; Jagasia et ál., 2009).

4.2 Las células derivadas de la eminencia ganglionar medial mejora las conductas tipo ansiosas

La reducción en la concentración del neurotransmisor GABA y la alteración o la reducción en la expresión de sus principales receptores (GABA_ARs), cada vez más se están relacionando con los trastornos de ansiedad y depresivos, merced al carácter modulador del sistema (Luscher et ál., 2011; Mohler, 2012). Asimismo, un mal funcionamiento del hipocampo ha sido implicado en ambos trastornos (Gray y McNaughton, 1983; Grafman et ál., 1986; Bannerman et ál., 2003; Bannerman et ál., 2004; Pittenger y Duman, 2008; Fuss et ál., 2010). De manera notable, a día 15 después del trasplante, y tomando como referencia el animal nulo para el receptor LPA₁, por mostrar los déficits neurológicos, no se observó un efecto ansiolítico claro, debido a que el estado de los precursores no estaba totalmente definido ni éstos han diferenciado completamente, teniendo aún una débil funcionalidad en el tejido del huésped, como previamente fue descrito en estudios por electrofisiología que demostraron un tiempo de 3-4 semanas necesario para la maduración de los precursores trasplantados

(Álvarez-Dolado et ál., 2006). En concordancia con otros trabajos, los cambios más significativos tuvieron lugar en el día 31, toda vez que los precursores de interneuronas se han diferenciado ya a interneuronas GABAérgicas maduras y se integraron en el circuito neuronal local (Álvarez-Dolado et ál., 2006; Zipancic et ál., 2010; Valente et al 2013), mejorando, con ello, las respuestas tipo ansiosas analizadas tanto en el campo abierto como en el laberinto en cruz elevado. Debemos considerar, además, que las alteraciones que son capaces de compensar las nuevas interneuronas tras el trasplante, y que se reflejan en una conducta específica, no afectan únicamente al hipocampo propiamente dicho, estimulando las vías asociadas a procesos celulares de neurogénesis y diferenciación, sino a todas las estructuras que contactan con él. Así, por ejemplo, la modulación amigdalár de las funciones hipocámpales, que juega un importante papel en el procesamiento de la información emocional y la codificación de la memoria, tiene lugar a través de cambios específicos sobre las interneuronas del sistema GABAérgico de acuerdo a un área o región hipocámpal concreta (Berretta et ál., 2004) por lo que, la integración de nuevas interneuronas es esencial para mejorar y restablecer dicha regulación.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el test de natación forzada indican, muy probablemente, que debido a la repetición de la prueba en diferentes tiempos, tuvo lugar un proceso de habituación al test aumentando el tiempo de inmovilidad (Thompson, 1986; Thompson et ál., 1988). En contraste, este fenómeno no fue encontrado en el grupo NULL-EGM por lo que, o bien dicha respuesta sugiere un defecto de habituación específico para la prueba (poco probable ya que no se observó ningún problema similar en las pruebas de campo abierto o laberinto en cruz elevado), o bien se trató de una respuesta activa, en cuyo caso representaría un cambio de perfil conductual muy relevante. En este caso, esta respuesta pudo ser debida a la incorporación de las nuevas interneuronas GABAérgicas, mejorando la plasticidad neuronal local por la reorganización del circuito local añadiendo nuevas conexiones sinápticas y, provocando, con ello, un efecto antidepressivo (Vollenweider et ál., 2011).

4.3 Relevancia clínica

La disfunción en interneuronas corticales y en el hipocampo puede conllevar a un riesgo en el desarrollo de algunos trastornos como son el autismo, la epilepsia, el trastorno bipolar, la esquizofrenia y las demencias como la enfermedad de Alzheimer, entre otros (Powell et ál., 2003; Andrews-Zwilling et ál., 2010; Marin, 2012; Stanley et ál., 2012). Las interneuronas corticales e hipocámpales nacen en las zonas progenitoras de la eminencia ganglionar medial, la eminencia ganglionar caudal y en el área preóptica (Anderson et ál., 1997; Wonders y Anderson, 2006; Gelman et ál., 2011). En los últimos años, la terapia celular con los precursores derivados de la EGM está teniendo una mayor relevancia para la medicina regenerativa (Álvarez-Dolado et ál., 2006; Baraban et ál., 2009; Daadi et ál., 2009; Martínez-Cerdeño et ál., 2010; Zipancic et ál., 2010; De la Cruz et ál., 2011; Tanaka et ál., 2011). Las células de la EGM presentan ciertas propiedades como la de poder migrar hacia diferentes zonas (la corteza, el estriado y el hipocampo), diferenciarse a interneuronas GABAérgicas maduras e integrarse funcionalmente en la red neuronal (revisado en Álvarez-Dolado y Broccoli, 2011).

El receptor LPA₁ está implicado en importantes procesos biológicos para el desarrollo embrionario y adulto, como se ha demostrado estos últimos años por nuestro grupo de investigación. La ausencia del receptor LPA₁ conlleva alteraciones sobre la neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo, sobre la maduración y diferenciación de las nuevas neuronas, sobre el desarrollo del sistema GABAérgico con la disminución de ciertos subtipos de interneuronas inhibitoras (Matas-Rico, 2009) y sobre el sistema glutamatérgico (Harrison et ál., 2003; Roberts et ál., 2005; Matas-Rico et ál., 2008; Musazzi et ál., 2011, Blanco et ál., 2012). Además, presenta alteraciones sobre las conductas asociadas al hipocampo (Santín et ál., 2009, Castilla-Ortega et ál., 2010; García-Fernández et ál., 2012). Por ello, puede ser un modelo animal para el uso de esta terapia celular para los trastornos de depresión o de ansiedad, o para los trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia por presentar algunos paralelismos (revisado en Estivill-Torrús et ál., 2013).

Por otra parte, desde la terapia celular, existen otras células capaces de generar interneuronas GABAérgicas como son las células troncales embrionarias y las células troncales neuronales. Hay pocos estudios que hayan utilizado este tipo de células trasplantadas en

animales y de ellos, se han dirigido especialmente al tratamiento de la epilepsia (Shetty y Hattiangady, 2007; Maisano et ál., 2009). Los resultados obtenidos no son tan destacable como se obtiene con las células derivadas de la EGM ya que muestran una menor actividad electrofisiológica (Ruschenschmidt et ál., 2005) y una menor interacción en el circuito local del huésped (Shindo et ál., 2010). Por último, también se han desarrollado más recientemente las células troncales pluripotentes inducidas, obtenidas por reprogramación de células somáticas y que permiten guardar la ética biomédica al obtenerse desde el mismo paciente, evitando el rechazo inmune.

Los datos mostrados en esta Tesis Doctoral, continúan en la línea de los beneficios de trasplantar los precursores derivados de la eminencia ganglionar medial, ya que se ha confirmado que, por un lado pueden restaurar el circuito neuronal local del hipocampo de los ratones carentes del receptor LPA_1 teniendo una repercusión positiva sobre su comportamiento y por otro lado, por mejorar las conductas relacionadas con la ansiedad en los ratones normales.

CONCLUSIONES

1. Los precursores de interneuronas GABAérgicas derivados de la EGM trasplantados en el hipocampo dorsal de ratones normales y carentes del receptor LPA₁ presentan una supervivencia de las células GFP⁺ que ocasiona modificaciones en la red neuronal local, migran y se diferencian en subtipos de interneuronas GABAérgicas maduras capaces de expresar PV, CB, CR, NPY y SOM.
2. En los ratones nulos para el receptor LPA₁, las células trasplantadas se diferencian a interneuronas maduras mayoritariamente que expresan SOM y NPY, y que permiten compensar y reemplazar el déficit de subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas del ratón.
3. La correcta diferenciación e integración como interneuronas de los precursores derivados de la EGM en el hipocampo de los ratones nulos para el receptor LPA₁ demuestra la existencia de un entorno neural permisivo en ausencia del receptor, sugiriendo que los defectos que presenta el animal carente del receptor son específicos, en ningún caso indirectos.
4. En el hipocampo de los ratones nulos para el receptor LPA₁, el trasplante de precursores GABAérgicos derivados de la EGM produce un aumento significativo de la neurogénesis adulta en el giro dentado.
5. El trasplante de precursores GABAérgicos derivados de la EGM genera, en los ratones normales y carentes del receptor una respuesta de tipo ansiolítico, más evidente en el ratón nulo para el receptor LPA₁.
6. Los resultados obtenidos en el ratón *Málaga* carente del receptor LPA₁ demuestran el potencial de trasplantar estos precursores en modelos experimentales con deterioro cognitivo y conductual, alteración en neurodesarrollo y déficit de neurotransmisión,

pudiendo ser utilizado para el estudio de ciertas patologías que comparten estas características, como es el caso de la esquizofrenia.

ANEXOS

ANEXO I: Protocolos de los fijadores y de los tampones usados en inmunohistoquímica

PLP: Paraformaldehído 4%, Lisina 0,075 M, Peryodato sódico 0,01 M, pH 7,4 (Perfusión y posfijación)

Para 200 ml:

- Disolver 8 g de paraformaldehído en 50 ml de agua destilada calentada previamente a 60°C, con agitación. Puede ser necesario añadir 1-2 gotas de NaOH al 2,5% para que se disuelva completamente.
- Filtrar, completar hasta 100 ml con agua destilada y dejar enfriar.
- Añadir 100 ml de PB 0,2 M, pH 7.4 en los que se ha disuelto previamente 2,74 g de lisina (L-lisina monoclóhidrato) y 0,428 g de meta-peryodato sódico (NaIO₄).

PAF: Paraformaldehído 4% en PB 0,1 M, pH 7,4 (Perfusión y posfijación)

Para 200 ml:

- Disolver 8 g de paraformaldehído en 50 ml de agua destilada calentada previamente a 60°C, con agitación. Puede ser necesario añadir 1-2 gotas de NaOH al 2,5% para que se disuelva completamente.
- Filtrar, completar hasta 100 ml con agua destilada y dejar enfriar.
- Añadir 100 ml de PB 0,2 M, pH 7,4

Tampón PBS 0,1 M pH 7,4 (Perfusión e inmunohistoquímica)

Na ₂ HPO ₄ (x2H ₂ O).....	1,9 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
NaCl.....	7,22 g
Agua destilada.....	Hasta 1 litro

Tampón PB 0,2M pH 7,4 (Perfusión e inmunohistoquímica)

Na ₂ HPO ₄ H ₂ O.....	6,9 g
Na ₂ HPO ₄ (x2H ₂ O).....	26,7 g
Agua destilada.....	Hasta 1 litro

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

Na ₂ HPO ₄ (x2H ₂ O).....	1,48 g
KH ₂ PO ₄	0,48 g
NaCl.....	7 g
TRIS (Hydroxymethyl-aminomethan).....	5 g
NaN ₃ (Azida Sódica).....	0,2 g
Agua destilada.....	Hasta 1 litro

Tampón borato pH 8,5 (Inmunohistoquímica de BrdU)

Para 100 ml:

50 ml Na₂B₄O₇ x10H₂O 0,025 M

15.2 ml HCl 0,1 M

Llevar a 100 ml con agua destilada y hasta pH 8,5

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

Solución crioprotectora (Almacenamiento del tejido en -80°C)

Para 1 litro:

500 ml PB 0,1M

300 mg sacarosa

300 ml Etilenglicol

100 mg Polivinilpirrolidona

Se debe de mezclar la sacarosa con PB primero para que se disuelva mejor. Una vez esté totalmente homogenizado añadir los siguientes productos. Dejar en nevera a 4°C durante 24 h y para conservarlo dejarlo en el congelador de -80°C.

Preparación de portaobjetos con Poli-L-Lisina

Se colocaron los portaobjetos limpios y desengrasados en cestillas de plástico y se sumergieron en una solución de Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich Química S.A.; Madrid) al 10 % (v/v) en agua destilada durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se dejaron secar durante 1 h a 60 °C, o bien, durante 24 h a temperatura ambiente.

ANEXOS II: PUBLICACIONES DE LOS RESULTADOS

Los resultados derivados de esta Tesis Doctoral se han presentados en congresos nacionales e internacionales:

Rosell-Valle, C., Martínez-Losa, M., Blanco, E., Castilla-Ortega, E., Chun, J., Rodríguez-Fonseca, F., Álvarez-Dolado, M., Santín, L.J, Estivill-Torrus., G. **El trasplante de precursores gabaérgicos en el hipocampo dorsal de ratones nulos para el receptor LPA₁ disminuye las respuestas asociadas con la ansiedad.** 15º Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. Oviedo, 25-27 de Julio de 2013. Comunicación en formato póster.

Rosell-Valle, C., Martínez-Losa, M., Castilla-Ortega, E., Chun, J., Rodríguez-Fonseca, F., Álvarez-Dolado, M., Santín, L.J, Estivill-Torrus., G. **GABAergic precursor transplantation into the dorsal hippocampus in adult LPA1-null mice decreased anxiety-like behaviour.** 45Th European Brain and Behaviour Society Meeting. Múnich 6-9 de Septiembre de 2013. Comunicación en formato póster.

Rosell-Valle, C., Castilla-Ortega, E., Matas-Rico E., Pedraza, C., Gómez-Conde, I., Chun, J., Rodríguez-Fonseca, F., Santín, L.J, Estivill-Torrus., G. **Lysophosphatidic acid regulation of adult neurogénesis and behavior.** Regulation of adult neurogénesis: from epigenetics to behavior. Evento satélite del FENS Forum 2012 (8th Forum of European Neuroscience). Barcelona 12 de Julio de 2012. Comunicación en formato póster.

Rosell-Valle, C., Pedraza, C., Castilla-Ortega, E., Caramés, J.M., Gómez-Conde, I., Cifuentes, M., Chun, J., Rodríguez-Fonseca, F., Santín, L.J, Estivill-Torrus., G. **Pharmacological modulation of LPA-mediated signaling in depression-like behaviors.** 8Th IBRO World Congress of Neuroscience. Florencia, 15 de Julio de 2011. Comunicación en formato póster.

REFERENCIAS

- Akahoshi N, Ishizaki Y, Murashima YL, Shinba T, Goto K, Himi T, Chun J, Ishii I (2011). Frequent spontaneous seizures followed by spatial working memory/anxiety deficits in mice lacking sphingosine 1-phosphate receptor 2. *Epilepsy & behavior: E&B* 22:659-665.
- Allard J, Barron S, Diaz J, Lubetzki C, Zalc B, Schwartz JC, Sokoloff P (1998). A rat G protein-coupled receptor selectively expressed in myelin-forming cells. *The European journal of neuroscience* 10:1045-1053.
- Allen WE, Jones GE, Pollard JW, Ridley AJ (1997). Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *Journal of cell science* 110 (Pt6):707-720.
- Altman J, Bayer SA (1986). The development of the rat hypothalamus. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 100:1-178.
- Altman J, Das GD (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology* 124:319-335.
- Alvarez-Dolado M, Broccoli V (2011). GABAergic neuronal precursor grafting: implications in brain regeneration and plasticity. *Neural plasticity* 2011:384216.
- Alvarez-Dolado M, Calcagnotto ME, Karkar KM, Southwell DG, Jones-Davis DM, Estrada RC, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, Baraban SC (2006). Cortical inhibition modified by embryonic neural precursors grafted into the postnatal brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26:7380-7389.
- Amaral DG (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *The Journal of comparative neurology* 182:851-914.
- Amiel JM, Mathew SJ (2007). Glutamate and anxiety disorders. *Current Psychiatry Reports* Aug;9(4):278-83.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science (New York, NY)* 278:474-476.
- Andrews-Zwilling Y, Bien-Ly N, Xu Q, Li G, Bernardo A, Yoon SY, Zwilling D, Yan TX, Chen L, Huang Y (2010). Apolipoprotein E4 causes age- and- Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30:13707-13717.
- Ankiler B, Chun J (2004). Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Seminars in cell & developmental biology* 15:457-465.
- Aoki J (2004). Mechanisms of lysophospholipid acid production. *Seminars in cell & developmental biology* 15:477-489.
- Aoki J, Inoue A, Okudaira S (2008). Two pathways for lysophospholipid acid production. *Biochimica et biophysica acta* 1781:513-518.

- Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, Mizuno K, Saku K, Taguchi R, Arai H (2002). Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *The Journal of biological chemistry* 277:48737-48744.
- Baker DL, Umstot ES, Desiderio DM, Tigyi GJ (2000). Quantitative analysis of lysophosphatidic acid in human blood fractions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 905:267-269.
- Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K (1999). Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 274:27776-27785.
- Bandoh K, Aoki J, Taira A, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS letters* 478:159-165.
- Bannerman DM, Deacon RM, Seeburg PH, Rawlins JN (2003). GluR-A-Deficient mice display normal acquisition of a hippocampus-dependent spatial reference memory task but are impaired during spatial reversal. *Behavioral neuroscience* 117:866-870.
- Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28:273-283.
- Bannerman DM, Yee BK, Good MA, Heupel MJ, Iversen SD, Rawlins JN (1999). Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behavioral neuroscience* 113:1170-1188.
- Baraban SC, Southwell DG, Estrada RC, Jones DL, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A (2009). Reduction of seizures by transplantation of cortical GABAergic interneuron precursors into Kv1.1 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:15472-15477.
- Barkley RA (1997). Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychological bulletin* 121:65-94.
- Bektas M, Payne SG, Liu H, Goparaju S, Milstien S, Spiegel S (2005). A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *The Journal of cell biology* 169:801-811.
- Belzung C, Griebel G (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural brain research* 125:141-149.
- Ben-Ari Y (2006). Seizures beget seizures: the quest for GABA as a key player. *Critical reviews in neurobiology* 18:135-144.

- Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE (1994). cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 42:1635-1642.
- Bermudo-Soriano CR, Perez-Rodriguez MM, Vaquero-Lorenzo C, Baca-Garcia E (2012). New perspectives in glutamate and anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 100(4):752-74.
- Berretta S, Lange N, Bhattacharyya S, Sebros R, Garces J, Benes FM (2004). Long-term effects of amygdala GABA receptor blockade on specific subpopulations of hippocampal interneurons. *Hippocampus* 14(7):876-94.
- Bertoglio LJ, Joca SR, Guimaraes FS (2006). Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behavioural brain research* 175:183-188.
- Blanco E, Bilbao A, Luque-Rojas MJ, Palomino A, Bermudez-Silva FJ, Suarez J, Santin LJ, Estivill-Torres G, Gutierrez A, Campos-Sandoval JA, Alonso-Carrion FJ, Marquez J, de Fonseca FR (2012). Attenuation of cocaine-induced conditioned locomotion is associated with altered expression of hippocampal glutamate receptors in mice lacking LPA1 receptors. *Psychopharmacology* 220:27-42.
- Boehm S, Betz H (1997). Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:4066-4075.
- Bortolato M, Chen K, Godar SC, Chen G, Wu W, Rebrin I, Farrell MR, Scott AL, Wellman CL, Shih JC (2011). Social deficits and perseverative behaviors, but not overt aggression, in MAO-A hypomorphic mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36:2674-2688.
- Bothe GW, Bolivar VJ, Vedder MJ, Geistfeld JG (2004). Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes, brain, and behavior* 3:149-157.
- Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clezardin P, Peyruchaud O (2006). The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9643-9648.
- Boucher J, Quilliot D, Praderes JP, Simon MF, Gres S, Guigne C, Prevot D, Ferry G, Boutin JA, Carpenne C, Valet P, Saulnier-Blache JS (2005). Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 48:569-577.
- Boulder Committee (1970). Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *The Boulder Committee. The Anatomical record* 166:257-261.

- Bowden NA, Weidenhofer J, Scott RJ, Schall U, Todd J, Michie PT, Tooney PA (2006). Preliminary investigation of gene expression profiles in peripheral blood lymphocytes in schizophrenia. *Schizophrenia research* 82:175-183.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Molecular and Cell Neuroscience* 24: 603-613.
- Brimacombe M, Ming X, Lamendola M (2007). Prenatal and birth complications in autism. *Maternal and child health journal* 11:73-79.
- Brindley DN (2004). Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *Journal of cellular biochemistry* 92:900-912.
- Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, Aradhye S, Burtin P (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature reviews Drug discovery* 9:883-897.
- Broberger C, Hokfelt T (2001). Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiology & behavior* 74:669-682.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* 467:1-10.
- Bunsey M, Eichenbaum H (1996). Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature* 379:255-257.
- Buss RR, Sun W, Oppenheim RW (2006). Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annual review of neuroscience* 29:1-35.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48:591-604.
- Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B, Eaton WW, Mortensen PB (2007). Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. *Schizophrenia research* 97:51-59.
- Callaerts-Vegh Z, Leo S, Vermaercke B, Meert T, D'Hooge R (2012). LPA(5) receptor plays a role in pain sensitivity, emotional exploration and reversal learning. *Genes, brain, and behavior*.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I (2008). ERK1/2 and CaMKII-mediated events in memory formation: is 5HT regulation involved? *Behavioural brain research* 195:120-128.

- Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29:1193-1205.
- Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural brain research* 134:49-57.
- Castilla-Ortega E, Escuredo L, Bilbao A, Pedraza C, Orio L, Estivill-Torrus G, Santin LJ, de Fonseca FR, Pavon FJ (2014). 1-oleoyl lysophosphatidic Acid: a new mediator of emotional behavior in rats. *PloS one* 9:e85348.
- Castilla-Ortega E, Hoyo-Becerra C, Pedraza C, Chun J, Rodriguez De Fonseca F, Estivill-Torrus G, Santin LJ (2011a). Aggravation of chronic stress effects on hippocampal neurogenesis and spatial memory in LPA(1) receptor knockout mice. *PloS one* 6:e25522.
- Castilla-Ortega E, Pedraza C, Chun J, de Fonseca FR, Estivill-Torrus G, Santin LJ (2012). Hippocampal c-Fos activation in normal and LPA(1)-null mice after two object recognition tasks with different memory demands. *Behavioural brain research* 232:400-405.
- Castilla-Ortega E, Pedraza C, Estivill-Torrus G, Santin LJ (2011b). When is adult hippocampal neurogenesis necessary for learning? evidence from animal research. *Reviews in the neurosciences* 22:267-283.
- Castilla-Ortega E, Sanchez-Lopez J, Hoyo-Becerra C, Matas-Rico E, Zambrana-Infantes E, Chun J, De Fonseca FR, Pedraza C, Estivill-Torrus G, Santin LJ (2010). Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA1 receptor. *Neurobiology of learning and memory* 94:73-82.
- Celio MR. 1986. GABA neurons contain the calcium binding protein parvalbumin. *Science* 232: 995-997.
- Celio MR. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35: 375-475.
- Cervera P, Tirard M, Barron S, Allard J, Trottier S, Lacombe J, Daumas-Duport C, Sokoloff P (2002). Immunohistological localization of the myelinating cell-specific receptor LP(A1). *Glia* 38:126-136.
- Chen J, Han Y, Zhu W, Ma R, Han B, Cong X, Hu S, Chen X (2006). Specific receptor subtype mediation of LPA-induced dual effects in cardiac fibroblasts. *FEBS letters* 580:4737-4745.
- Cheng Y, Makarova N, Tsukahara R, Guo H, Shuyu E, Farrar P, Balazs L, Zhang C, Tigyi G (2009). Lysophosphatidic acid-induced arterial wall remodeling: requirement of PPARgamma but not LPA1 or LPA2 GPCR. *Cellular signalling* 21:1874-1884.
- Chi XX, Nicol GD (2010). The sphingosine 1-phosphate receptor, S1PR(1), plays a prominent but not exclusive role in enhancing the excitability of sensory neurons. *Journal of neurophysiology* 104:2741-2748.

- Choi JW, Chun J (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochimica et biophysica acta* 1831:20-32.
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50:157-186.
- Choi SH, Li Y, Parada LF, Sisodia SS (2009). Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. *Molecular neurodegeneration* 4:52.
- Christie BR, Cameron HA (2006). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* 16:199-207.
- Chun J, Brinkmann V (2011). A mechanistically novel, first oral therapy for multiple sclerosis: the development of fingolimod (FTY720, Gilenya). *Discovery medicine* 12:213-228.
- Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacological reviews* 62:579-587.
- Colmers WF, Lukowiak K, Pittman QJ (1987). Presynaptic action of neuropeptide Y in area CA1 of the rat hippocampal slice. *The Journal of physiology* 383:285-299.
- Contos JJ, Chun J (1998). Complete cDNA sequence, genomic structure, and chromosomal localization of the LPA receptor gene, *lpA1/vzg-1/Gpcr26*. *Genomics* 51:364-378.
- Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J (2000a). Requirement for the *lpA1* lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13384-13389.
- Contos JJ, Ishii I, Chun J (2000b). Lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology* 58:1188-1196.
- Crawley JN (1999). Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain research* 835:18-26.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002a). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in pharmacological sciences* 23:238-245.
- Cryan JF, Page ME, Lucki I (2002b). Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *European journal of pharmacology* 436:197-205.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29:547-569.
- Cunningham MG, Connor CM, Carlezon WA, Jr., Meloni E (2009). Amygdalar GABAergic-rich neural grafts attenuate anxiety-like behavior in rats. *Behavioural brain research* 205:146-153.

- Cunningham MO, Hunt J, Middleton S, LeBeau FE, Gillies MJ, Davies CH, Maycox PR, Whittington MA, Racca C (2006). Region-specific reduction in entorhinal gamma oscillations and parvalbumin-immunoreactive neurons in animal models of psychiatric illness. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:2767-2776.
- Czech B, Pfeilschifter W, Mazaheri-Omrani N, Strobel MA, Kahles T, Neumann-Haefelin T, Rami A, Huwiler A, Pfeilschifter J (2009). The immunomodulatory sphingosine 1-phosphate analog FTY720 reduces lesion size and improves neurological outcome in a mouse model of cerebral ischemia. *Biochemical and biophysical research communications* 389:251-256.
- Daadi MM, Lee SH, Arac A, Grueter BA, Bhatnagar R, Maag AL, Schaar B, Malenka RC, Palmer TD, Steinberg GK (2009). Functional engraftment of the medial ganglionic eminence cells in experimental stroke model. *Cell transplantation* 18:815-826.
- Dal-Zotto S, Marti O, Armario A (2000). Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural brain research* 114:175-181.
- Dash PK, Orsi SA, Moody M, Moore AN (2004). A role for hippocampal Rho-ROCK pathway in long-term spatial memory. *Biochemical and biophysical research communications* 322:893-898.
- David M, Ribeiro J, Descotes F, Serre CM, Barbier M, Murone M, Clezardin P, Peyruchaud O (2012). Targeting lysophosphatidic acid receptor type 1 with Debio 0719 inhibits spontaneous metastasis dissemination of breast cancer cells independently of cell proliferation and angiogenesis. *International journal of oncology* 40:1133-1141.
- David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Gres S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, Saulnier-Blache JS, Clezardin P, Peyruchaud O (2010). Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS one* 5:e9741.
- Dawson GR, Crawford SP, Stanhope KJ, Iversen SD, Tricklebank MD (1994). One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology* 113: 570-572.
- De la Cruz E, Zhao M, Guo L, Ma H, Anderson SA, Schwartz TH (2011). Interneuron progenitors attenuate the power of acute focal ictal discharges. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8:763-773.
- Deacon RM, Bannerman DM, Kirby BP, Croucher A, Rawlins JN (2002). Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behavioural brain research* 133:57-68.
- DeFelipe J (1993). Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 3:273-289.

- DeFelipe J (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *Journal of chemical neuroanatomy* 14:1-19.
- Dennis J, White MA, Forrest AD, Yuelling LM, Nogaroli L, Afshari FS, Fox MA, Fuss B (2008). Phosphodiesterase-1alpha/autotaxin's MORFO domain regulates oligodendroglial process network formation and focal adhesion organization. *Molecular and cellular neurosciences* 37:412-424.
- Dircks L, Sul HS (1999). Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis. *Progress in lipid research* 38:461-479.
- Du J, Szabo ST, Gray NA, Manji HK (2004). Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 7:243-248.
- Dubin AE, Herr DR, Chun J (2010). Diversity of lysophosphatidic acid receptor-mediated intracellular calcium signaling in early cortical neurogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30:7300-7309.
- Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Oliet SH, Piazza PV, Abrous DN (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology* 5:e214.
- Durgam GG, Virag T, Walker MD, Tsukahara R, Yasuda S, Liliom K, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Wilke N, Siess W, Tigyi G, Miller DD (2005). Synthesis, structure-activity relationships, and biological evaluation of fatty alcohol phosphates as lysophosphatidic acid receptor ligands, activators of PPARgamma, and inhibitors of autotaxin. *Journal of medicinal chemistry* 48:4919-4930.
- Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Staels B (2002). The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends in molecular medicine* 8:422-430.
- Eder AM, Sasagawa T, Mao M, Aoki J, Mills GB (2000). Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)-induced LPA production: role of phospholipase D and phospholipase A2. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6:2482-2491.
- Egeland M, Warner-Schmidt J, Greengard P, Svenningsson P (2010). Neurogenic effects of fluoxetine are attenuated in p11 (S100A10) knockout mice. *Biological psychiatry* 67:1048-1056.
- Eichenbaum H (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature reviews Neuroscience* 1:41-50.
- Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH (1993). The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *The Biochemical journal* 291 (Pt 3):677-680.

- Eisch AJ, Petrik D (2012). Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* (New York, NY) 338:72-75.
- Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M (1999). Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *The Journal of biological chemistry* 274:23996-24006.
- Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35:495-516.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* 4:1313-1317.
- Estivill-Torrus G, Llebreg-Zayas P, Matas-Rico E, Santin L, Pedraza C, De Diego I, Del Arco I, Fernandez-Llebreg P, Chun J, De Fonseca FR (2008). Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991) 18:938-950.
- Estivill-Torrús G, Santín L, Pedraza C, Castilla-Ortega E, Rodríguez de Fonseca F (2013). Lysophospholipid Acid Signaling and Behavior. *Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry* (Ed: Chun J) Wiley-Blackwell (impresión de John Wiley & Sons Ltd), Hoboken, New Jersey, USA 451-474.
- Evans RM (2005). The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 19:1429-1438.
- Faigle R, Song H (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1830:2435-2448.
- Fernandes C, Gonzalez MI, Wilson CA, File SE (1999). Factor analysis shows that female rat behaviour is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 64:731-738.
- Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, Simon MF, Rodriguez M, Boucher J, Tack I, Gesta S, Chomar P, Dieu M, Raes M, Galizzi JP, Valet P, Boutin JA, Saulnier-Blache JS (2003). Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *The Journal of biological chemistry* 278:18162-18169.
- Fink CC, Meyer T (2002). Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Current opinion in neurobiology* 12:293-299.
- Fishell G, Rudy B. (2011) Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". *Annual Review of Neuroscience* 34:535-67.
- Fogarty M, Grist M, Gelman D, Marín O, Pachnis V, Kessar N (2007). Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *The Journal of Neuroscience* 27, 10935–10946.

- Folkman S, Lazarus RS (1986). Stress-processes and depressive symptomatology. *Journal of abnormal psychology* 95:107-113.
- Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Paparountas T, Thanassopoulou A, Zhao Z, Xu Y, Kontoyiannis DL, Remboutsika E, Aidinis V (2010). ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Developmental biology* 339:451-464.
- Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H (1995). Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 80:919-927.
- Freund TF, Buzsáki G (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470.
- Frugier T, Crombie D, Conquest A, Tjhong F, Taylor C, Kulkarni T, McLean C, Pebay A (2011). Modulation of LPA receptor expression in the human brain following neurotrauma. *Cellular and molecular neurobiology* 31:569-577.
- Fujiwara Y, Sebok A, Meakin S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tigyi G (2003). Cyclic phosphatidic acid elicits neurotrophin-like actions in embryonic hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* 87:1272-1283.
- Fukushima N, Ishii I, Contos JJ, Weiner JA, Chun J (2001). Lysophospholipid receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 41:507-534.
- Fukushima N, Kimura Y, Chun J (1998). A single receptor encoded by *vzg-1/lpA1/edg-2* couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6151-6156.
- Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Contos JJ, Rehen SK, Kingsbury MA, Kim KY, Chun J (2002). Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Molecular and cellular neurosciences* 20:271-282.
- Fuss B, Baba H, Phan T, Tuohy VK, Macklin WB (1997). Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 17:9095-9103.
- Fuss J, Ben Abdallah NM, Hensley FW, Weber KJ, Hellweg R, Gass P (2010). Deletion of running-induced hippocampal neurogenesis by irradiation prevents development of an anxious phenotype in mice. *PLoS one* 5.
- Gage FH, Temple S (2013). Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron* 80:588-601.
- Gajewiak J, Tsukahara R, Fujiwara Y, Tigyi G, Prestwich GD (2008). Synthesis, pharmacology, and cell biology of sn-2-aminoxy analogues of lysophosphatidic acid. *Organic letters* 10:1111-1114.

- García Díaz B (2010). Defective myelination in mice lacking the lysophosphatidic acid receptor LPA1: newcomer models for demyelinating and neuroinflammatory diseases. . Tesis Doctoral Universidad de Málaga- Universidad de Hasselt.
- García-Díaz B, Matas Rico E, Riquelme R, Varela-Nieto I, Jiménez A, Chun J, Leyva L, O. F, Rodríguez de Fonseca F (2007). Defective myelination in mice lacking the lysophosphatidic acid receptor LPA1: newcomer models for demyelinating diseases. *Multiple Sclerosis* 13: S258.
- García-Fernandez M, Castilla-Ortega E, Pedraza C, Blanco E, Hurtado-Guerrero I, Barbancho MA, Chun J, Rodríguez-de-Fonseca F, Estivill-Torrus G, Santin Nunez LJ (2012). Chronic immobilization in the malpar1 knockout mice increases oxidative stress in the hippocampus. *The International journal of neuroscience* 122:583-589.
- Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H (2007). GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends in neurosciences* 30:1-8.
- Gelman D, Griveau A, Dehorter N, Teissier A, Varela C, Pla R, Pierani A, Marin O (2011). A wide diversity of cortical GABAergic interneurons derives from the embryonic preoptic area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:16570-16580.
- Gelman DM, Marín O. (2010). Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *European Journal Neuroscience* 31(12):2136-41.
- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW (1999). Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402:75-79.
- Goetzl EJ, Graeler M, Huang MC, Shankar G (2002). Lysophospholipid growth factors and their G protein-coupled receptors in immunity, coronary artery disease, and cancer. *TheScientificWorldJournal* 2:324-338.
- Goldman-Rakic PS (1994). Working memory dysfunction in schizophrenia. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 6:348-357.
- Goldshmit Y, Munro K, Leong SY, Pebay A, Turnley AM (2010). LPA receptor expression in the central nervous system in health and following injury. *Cell and tissue research* 341:23-32.
- Gonzalez-Burgos G, Lewis DA (2008). GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 34:944-961.
- Gotoh M, Fujiwara Y, Yue J, Liu J, Lee S, Fells J, Uchiyama A, Murakami-Murofushi K, Kennel S, Wall J, Patil R, Gupte R, Balazs L, Miller DD, Tigyi GJ (2012). Controlling cancer through the autotaxin-lysophosphatidic acid receptor axis. *Biochemical Society transactions* 40:31-36.
- Gotzsche CR, Nikitidou L, Sorensen AT, Olesen MV, Sorensen G, Christiansen SH, Angehagen M, Woldbye DP, Kokaia M (2012). Combined gene overexpression of neuropeptide Y and its receptor Y5 in the hippocampus suppresses seizures. *Neurobiology of disease* 45:288-296.

- Grafman J, Vance SC, Weingartner H, Salazar AM, Amin D (1986). The effects of lateralized frontal lesions on mood regulation. *Brain : a journal of neurology* 109 (Pt 6):1127-1148.
- Gray JA, McNaughton N (1983). Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 7:119-188.
- Gross C, Santarelli L, Brunner D, Zhuang X, Hen R (2000). Altered fear circuits in 5-HT(1A) receptor KO mice. *Biological psychiatry* 48:1157-1163.
- Gulyás AI, Miettinen R, Jacobowitz DM, Freund TF (1992). Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus. I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fiber system. *Neuroscience* 48: 1-27.
- Gulyás AI, Tóth K, Dános P, Freund TF (1991). Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin-d28k, and cholecystinin in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology* 312: 371-378.
- Hacker G (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research* 301:5-17.
- Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mechanisms of development* 76:79-90.
- Haider B, McCormick DA (2009). Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms. *Neuron* 62:171-189.
- Hall A (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, NY)* 279:509-514.
- Hall CS (1934). Emotional behavior in the rat: The relationship between emotional and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology* 22:345-352.
- Hama K, Bando K, Kakehi Y, Aoki J, Arai H (2002). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS letters* 523:187-192.
- Hammack BN, Fung KY, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP, Gildea DH (2004). Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 10:245-260.
- Handford EJ, Smith D, Hewson L, McAllister G, Beer MS (2001). Edg2 receptor distribution in adult rat brain. *Neuroreport* 12:757-760.
- Harrison SM, Reavill C, Brown G, Brown JT, Cluderay JE, Crook B, Davies CH, Dawson LA, Grau E, Heidbreder C, Hemmati P, Hervieu G, Howarth A, Hughes ZA, Hunter AJ, Latcham J, Pickering S, Pugh P, Rogers DC, Shilliam CS, Maycox PR (2003). LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Molecular and cellular neurosciences* 24:1170-1179.

- Hattiangady B, Shetty AK (2008). Aging does not alter the number or phenotype of putative stem/progenitor cells in the neurogenic region of the hippocampus. *Neurobiology of aging* 29:129-147.
- Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E, Day JE, Wu T, Fulkerson Z, Albers HM, van Meeteren LA, Houben AJ, van Zeijl L, Jansen S, Andries M, Hall T, Pegg LE, Benson TE, Kasiem M, Harlos K, Kooi CW, Smyth SS, Ovaa H, Bollen M, Morris AJ, Moolenaar WH, Perrakis A (2011). Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nature structural & molecular biology* 18:198-204.
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J (1996). Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *The Journal of cell biology* 135:1071-1083.
- Heckers S (2004). The hippocampus in schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 161:2138-2139.
- Heise CE, Santos WL, Schreihof AM, Heasley BH, Mukhin YV, Macdonald TL, Lynch KR (2001). Activity of 2-substituted lysophosphatidic acid (LPA) analogs at LPA receptors: discovery of a LPA1/LPA3 receptor antagonist. *Molecular pharmacology* 60:1173-1180.
- Heninger GR, Delgado PL, Charney DS (1996). The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry* 29:2-11.
- Herr DR, Grillet N, Schwander M, Rivera R, Muller U, Chun J (2007). Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling is required for maintenance of hair cells mainly via activation of S1P2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:1474-1478.
- Herr KJ, Herr DR, Lee CW, Noguchi K, Chun J (2011). Stereotyped fetal brain disorganization is induced by hypoxia and requires lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA1) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:15444-15449.
- Heyser CJ, Vishnevetsky D, Berten S (2011). The effect of cocaine on rotarod performance in male C57BL/6J mice *Physiology & Behavior*, 118: 208-211.
- Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC (2008). Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33:406-417.
- Holmes A, Parmigiani S, Ferrari PF, Palanza P, Rodgers RJ.(2000). Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety. *Physiology Behavior*. 71(5):509-516.
- Holtsberg FW, Steiner MR, Keller JN, Mark RJ, Mattson MP, Steiner SM (1998). Lysophosphatidic acid induces necrosis and apoptosis in hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* 70:66-76.

- Hooks SB, Ragan SP, Hopper DW, Honemann CW, Durieux ME, Macdonald TL, Lynch KR (1998). Characterization of a receptor subtype-selective lysophosphatidic acid mimetic. *Molecular pharmacology* 53:188-194.
- Hope JM, Wang FQ, Whyte JS, Ariztia EV, Abdalla W, Long K, Fishman DA (2009). LPA receptor 2 mediates LPA-induced endometrial cancer invasion. *Gynecologic oncology* 112:215-223.
- Hosogaya S, Yatomi Y, Nakamura K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Ohta M, Yamazaki H, Koike T, Ozaki Y (2008). Measurement of plasma lysophosphatidic acid concentration in healthy subjects: strong correlation with lysophospholipase D activity. *Annals of clinical biochemistry* 45:364-368.
- Houben AJ, Moolenaar WH (2011). Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer metastasis reviews* 30:557-565.
- Hu E, Demmou L, Cauli B, Gallopin T, Geoffroy H, Harris-Warrick RM, Paupardin-Tritsch D, Lambolez B, Vincent P, Hepp R (2011). VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 21:708-718.
- Hudmon A, Schulman H (2002). Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annual review of biochemistry* 71:473-510.
- Hultman CM, Sparen P, Takei N, Murray RM, Cnattingius S (1999). Prenatal and perinatal risk factors for schizophrenia, affective psychosis, and reactive psychosis of early onset: case-control study. *BMJ (Clinical research ed)* 318:421-426.
- Ibanez-Sandoval O, Tecuapetla F, Unal B, Shah F, Koos T, Tepper JM (2011). A novel functionally distinct subtype of striatal neuropeptide Y interneuron. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:16757-16769.
- Im DS, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D, Lynch KR (2000). Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Molecular pharmacology* 57:753-759.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 224(3):855-62.
- Inoue A, Arima N, Ishiguro J, Prestwich GD, Arai H, Aoki J (2011). LPA-producing enzyme PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *The EMBO journal* 30:4248-4260.
- Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H (2004). Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nature medicine* 10:712-718.

- Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, Ueda H (2008). Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience* 152:296-298.
- Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual review of biochemistry* 73:321-354.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain research Molecular brain research* 57:1-9.
- Iwasawa Y, Fujii T, Nagamatsu T, Kawana K, Okudaira S, Miura S, Matsumoto J, Tomio A, Hyodo H, Yamashita T, Oda K, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Taketani Y (2009). Expression of autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 62:90-95.
- Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, Gage FH, Song H, Lie DC (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:7966-7977.
- Jaglin XH, Hjerling-Leffler J, Fishell G, Batista-Brito R (2012). The origin of neocortical nitric oxide synthase-expressing inhibitory neurons. *Frontiers in neural circuits* 6:44.
- Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, Aigrot MS, Calver AR, Duddy G, Walsh FS, Pangalos MN, Arimura N, Kaibuchi K, Zalc B, Lubetzki C (2005). Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:1459-1469.
- Jalink K, Hengeveld T, Mulder S, Postma FR, Simon MF, Chap H, van der Marel GA, van Boom JH, van Blitterswijk WJ, Moolenaar WH (1995). Lysophosphatidic acid-induced Ca²⁺ mobilization in human A431 cells: structure-activity analysis. *The Biochemical journal* 307 (Pt 2):609-616.
- Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH (1990). Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca²⁺-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *The Journal of biological chemistry* 265:12232-12239.
- Janssens R, Boeynaems JM, Godart M, Communi D (1997). Cloning of a human heptahelical receptor closely related to the P2Y5 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 236:106-112.
- Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingstrom A, Papp M, Wiborg O (2006). Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31:2395-2404.

- Jeong KJ, Park SY, Seo JH, Lee KB, Choi WS, Han JW, Kang JK, Park CG, Kim YK, Lee HY (2008). Lysophosphatidic acid receptor 2 and Gi/Src pathway mediate cell motility through cyclooxygenase 2 expression in CAOV-3 ovarian cancer cells. *Experimental & molecular medicine* 40:607-616.
- Jiang G, Xu Y, Fujiwara Y, Tsukahara T, Tsukahara R, Gajewiak J, Tigyi G, Prestwich GD (2007). Alpha-substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA. *ChemMedChem* 2:679-690.
- Jinno S, Kosaka T (2006). Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neuroscience Research*. 56(3):229-45.
- Joca SR, Ferreira FR, Guimaraes FS (2007). Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 10:227-249.
- Jones EG (1986). Neurotransmitters in the cerebral cortex. *Journal of neurosurgery* 65:135-153.
- Joo JY, Kim BW, Lee JS, Park JY, Kim S, Yun YJ, Lee SH, Lee SH, Rhim H, Son H (2007). Activation of NMDA receptors increases proliferation and differentiation of hippocampal neural progenitor cells. *Journal of cell science* 120:1358-1370.
- Jovanovic JN, Thomson AM (2011). Development of cortical GABAergic innervation. *Frontiers in cellular neuroscience* 5:14.
- Jun H, Mohammed Qasim Hussaini S, Rigby MJ, Jang MH (2012). Functional role of adult hippocampal neurogenesis as a therapeutic strategy for mental disorders. *Neural plasticity* 2012:854285.
- Kalra SP, Kalra PS (2003). Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin. *Endocrine* 22:49-56.
- Kalueff AV, Tuohimaa P (2004). Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta neurobiologiae experimentalis* 64:439-448.
- Kanda H, Newton R, Klein R, Morita Y, Gunn MD, Rosen SD (2008). Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nature immunology* 9:415-423.
- Karl T, Duffy L, Herzog H (2008). Behavioural profile of a new mouse model for NPY deficiency. *The European journal of neuroscience* 28:173-180.
- Kawagoe H, Soma O, Goji J, Nishimura N, Narita M, Inazawa J, Nakamura H, Sano K (1995) Molecular cloning and chromosomal assignment of the human brain-type phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase gene (PDNP2). *Genomics* 30:380-384.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 7:476-486.

- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* (Cambridge, England) 130:391-399.
- Kepecs A, Fishell G (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature*. 505(7483):318-26.
- Kiec-Wilk B, Dembinska-Kiec A, Olszanecka A, Bodzioch M, Kawecka-Jaszcz K (2005). The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 56:149-162.
- Kim EK, Yun SJ, Do KH, Kim MS, Cho M, Suh DS, Kim CD, Kim JH, Birnbaum MJ, Bae SS (2008). Lysophosphatidic acid induces cell migration through the selective activation of Akt1. *Experimental & molecular medicine* 40:445-452.
- Kim J, Keys JR, Eckhart AD (2006). Vascular smooth muscle migration and proliferation in response to lysophosphatidic acid (LPA) is mediated by LPA receptors coupling to Gq. *Cellular signalling* 18:1695-1701.
- Kim WR, Park OH, Choi S, Choi SY, Park SK, Lee KJ, Rhyu IJ, Kim H, Lee YK, Kim HT, Oppenheim RW, Sun W (2009). The maintenance of specific aspects of neuronal function and behavior is dependent on programmed cell death of adult-generated neurons in the dentate gyrus. *The European journal of neuroscience* 29:1408-1421.
- Kim WR, Sun W (2011). Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system. *Development, growth & differentiation* 53:225-235.
- Kimura A, Ohmori T, Kashiwakura Y, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Shimazaki K, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y (2008). Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor-2 enhances migration of neural progenitor cells toward an area of brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:3411-3417.
- Kingsbury MA, Rehen SK, Contos JJ, Higgins CM, Chun J (2003). Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nature neuroscience* 6:1292-1299.
- Kishimoto T, Matsuoka T, Imamura S, Mizuno K (2003). A novel colorimetric assay for the determination of lysophosphatidic acid in plasma using an enzymatic cycling method. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 333:59-67.
- Kitayama J, Shida D, Sako A, Ishikawa M, Hama K, Aoki J, Arai H, Nagawa H (2004). Over-expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in human invasive ductal carcinoma. *Breast cancer research : BCR* 6:R640-646.
- Klapstein GJ, Colmers WF (1993). On the sites of presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampus in vitro. *Hippocampus* 3:103-111.
- Koike S, Keino-Masu K, Ohto T, Sugiyama F, Takahashi S, Masu M (2009). Autotaxin/lysophospholipase D-mediated lysophosphatidic acid signaling is required to form distinctive large lysosomes in

- the visceral endoderm cells of the mouse yolk sac. *The Journal of biological chemistry* 284:33561-33570.
- Kolb B (1984). Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain research* 320:65-98.
- Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, Lidington D, Bolz SS, Friedman TB, Hla T, Proia RL (2007). Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *The Journal of biological chemistry* 282:10690-10696.
- Kosaka T, Katsumaru K, Hama K, Wu JY, Heizmann CW (1987). GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Research* 419:119-130.
- Kotarsky K, Boketoft A, Bristulf J, Nilsson NE, Norberg A, Hansson S, Owman C, Sillard R, Leeb-Lundberg LM, Olde B (2006). Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318:619-628.
- Kramar EA, Bernard JA, Gall CM, Lynch G (2003). Integrins modulate fast excitatory transmission at hippocampal synapses. *The Journal of biological chemistry* 278:10722-10730.
- Kriegstein AR, Pitkanen A (2009). Commentary: the prospect of cell-based therapy for epilepsy. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 6:295-299.
- Kusaka S, Kapousta-Bruneau N, Green DG, Puro DG (1998). Serum-induced changes in the physiology of mammalian retinal glial cells: role of lysophosphatidic acid. *The Journal of physiology* 506 (Pt 2):445-458.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lamprea MR, Cardenas FP, Setem J, Morato S (2008). Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 41:135-140.
- Lee CW, Rivera R, Dubin AE, Chun J (2007). LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *The Journal of biological chemistry* 282:4310-4317.
- Lee CW, Rivera R, Gardell S, Dubin AE, Chun J (2006). GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *The Journal of biological chemistry* 281:23589-23597.

- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T (1998). Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* (New York, NY) 279:1552-1555.
- Lee SJ, Yun CC (2010). Colorectal cancer cells - Proliferation, survival and invasion by lysophosphatidic acid. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42:1907-1910.
- Lee Z, Cheng CT, Zhang H, Subler MA, Wu J, Mukherjee A, Windle JJ, Chen CK, Fang X (2008). Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Molecular biology of the cell* 19:5435-5445.
- Leon Rodriguez DA, Duenas Z (2013). Maternal Separation during Breastfeeding Induces Gender-Dependent Changes in Anxiety and the GABA-A Receptor Alpha-Subunit in Adult Wistar Rats. *PloS one* 8:e68010.
- Leonard AS, Lim IA, Hemsworth DE, Horne MC, Hell JW (1999). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:3239-3244.
- Leuner B, Gould E (2010). Structural plasticity and hippocampal function. *Annual review of psychology* 61:111-140, c111-113.
- Leussis MP, Bolivar VJ (2006). Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 30:1045-1064.
- Lever C, Burton S, O'Keefe J (2006). Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Reviews in the neurosciences* 17:111-133.
- Li ZG, Yu ZC, Yu YP, Ju WP, Wang DZ, Zhan X, Wu XJ, Zhou L (2010) Lysophosphatidic acid level and the incidence of silent brain infarction in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *International journal of molecular sciences* 11:3988-3998.
- Li ZG, Yu ZC, Wang DZ, Ju WP, Zhan X, Wu QZ, Wu XJ, Cong HM, Man HH (2008). Influence of acetylsalicylate on plasma lysophosphatidic acid level in patients with ischemic cerebral vascular diseases. *Neurological research* 30:366-369.
- Liliom K, Bittman R, Swords B, Tigyi G (1996). N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids are selective competitive antagonists of the lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology* 50:616-623.
- Lin ME, Rivera RR, Chun J (2012). Targeted deletion of LPA5 identifies novel roles for lysophosphatidic acid signaling in development of neuropathic pain. *The Journal of biological chemistry* 287:17608-17617.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature reviews Neuroscience* 3:175-190.

- Lister RG (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics* 46:321-340.
- Liu S, Umezū-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, Zhang F, Yu S, Stephens LC, Cui X, Murrow G, Coombes K, Muller W, Hung MC, Perou CM, Lee AV, Fang X, Mills GB (2009). Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer cell* 15:539-550.
- Liu YB, Kharode Y, Bodine PV, Yaworsky PJ, Robinson JA, Billiard J (2010). LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *Journal of cellular biochemistry* 109:794-800.
- Lloyd C (1980). Life events and depressive disorder reviewed. II. Events as precipitating factors. *Archives of general psychiatry* 37:541-548.
- Lopez OL, Wisniewski SR, Becker JT, Boller F, DeKosky ST (1999). Psychiatric medication and abnormal behavior as predictors of progression in probable Alzheimer disease. *Archives of neurology* 56:1266-1272.
- Lu WY, Xiong ZG, Lei S, Orser BA, Dudek E, Browning MD, MacDonald JF (1999). G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nature neuroscience* 2:331-338.
- Luckman SM, Dyball RE, Leng G (1994). Induction of c-fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:4825-4830.
- Luscher B, Shen Q, Sahir N (2011). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Molecular psychiatry* 16:383-406.
- Lynch KR, Macdonald TL (2002). Structure-activity relationships of lysophosphatidic acid analogs. *Biochimica et biophysica acta* 1582:289-294.
- Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Chun J, Aoki J, Ueda H (2009). Lysophosphatidic acid-3 receptor-mediated feed-forward production of lysophosphatidic acid: an initiator of nerve injury-induced neuropathic pain. *Molecular pain* 5:64.
- Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A (2006). Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:5069-5082.
- MacLennan AJ, Carney PR, Zhu WJ, Chaves AH, Garcia J, Grimes JR, Anderson KJ, Roper SN, Lee N (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *The European journal of neuroscience* 14:203-209.

- Maisano X, Carpentino J, Becker S, Lanza R, Aaron G, Grabel L, Naegele JR (2009). Embryonic stem cell-derived neural precursor grafts for treatment of temporal lobe epilepsy. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 6:263-277.
- Majno G, Joris I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 146:3-15.
- Malleret G, Hen R, Guillou JL, Segu L, Buhot MC (1999). 5-HT1B receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:6157-6168.
- Mamiya T, Ukai M (2001). [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *British journal of pharmacology* 134:1597-1599.
- Maren S, Hobin JA (2007). Hippocampal regulation of context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 14:318-324.
- Marin O (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature reviews Neuroscience* 13:107-120.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews Neuroscience* 5:793-807.
- Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Espinosa A, Ariza J, Parker P, Orasji S, Daadi MM, Bankiewicz K, Alvarez-Buylla A, Kriegstein AR (2010). Embryonic MGE precursor cells grafted into adult rat striatum integrate and ameliorate motor symptoms in 6-OHDA-lesioned rats. *Cell stem cell* 6:238-250.
- Matas-Rico E (2009). Participación de la señalización mediada por ácido lisofosfatídico en los procesos de neurogénesis del sistema nervioso central en la etapa adulta. Tesis Doctoral Universidad de Málaga.
- Matas-Rico E, Garcia-Diaz B, Llebreg-Zayas P, Lopez-Barroso D, Santin L, Pedraza C, Smith-Fernandez A, Fernandez-Llebreg P, Tellez T, Redondo M, Chun J, De Fonseca FR, Estivill-Torrus G (2008). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Molecular and cellular neurosciences* 39:342-355.
- Mátyás F, Freund TF, Gulyás AI (2004). Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of mouse strains used in transgenic technology. *Hippocampus* 14: 460-481.
- Maurice T, Hiramatsu M, Itoh J, Kameyama T, Hasegawa T, Nabeshima T (1994). Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain research* 647:44-56.
- Mazarati A, Wasterlain CG (2002). Anticonvulsant effects of four neuropeptides in the rat hippocampus during self-sustaining status epilepticus. *Neuroscience letters* 331:123-127.

- McDonald AJ (1994). Calretinin immunoreactive neurons in the basolateral amygdala of the rat and monkey. *Brain research* 667:238-242.
- McDonald AJ (1997). Calbindin-D28k immunoreactivity in the rat amygdala. *The Journal of comparative neurology* 383:231-244.
- McDonald AJ, Betette RL (2001). Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and co-localization of Calbindin-D(28k). *Neuroscience* 102:413-425.
- McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD (2003). Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:131-136.
- McKay BM, Oh MM, Disterhoft JF (2013). Learning increases intrinsic excitability of hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33:5499-5506.
- McLean IW, Nakane PK (1974). Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 22:1077-1083.
- Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH (2007). Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1768:923-940.
- Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M (2002). Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36:507-519.
- Mills GB, May C, Hill M, Campbell S, Shaw P, Marks A (1990). Ascitic fluid from human ovarian cancer patients contains growth factors necessary for intraperitoneal growth of human ovarian adenocarcinoma cells. *The Journal of clinical investigation* 86:851-855.
- Mills GB, Moolenaar WH (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nature reviews Cancer* 3:582-591.
- Ming GL, Song H (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687-702.
- Mirendil H, Lin M-E, Chun J (2013). Lysophosphatidic acid (LPA) receptor signaling. En: *Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry* (Ed: Chun J) Wiley-Blackwell (impresión de John Wiley & Sons Ltd), Hoboken, New Jersey, USA ISBN-10: 0470569050, ISBN-13: 978-0470569054 812 pags1-40.
- Miyamoto E (2006). Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *Journal of pharmacological sciences* 100:433-442.

- Mohler H (2012). The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62:42-53.
- Moller T, Contos JJ, Musante DB, Chun J, Ransom BR (2001). Expression and function of lysophosphatidic acid receptors in cultured rodent microglial cells. *The Journal of biological chemistry* 276:25946-25952.
- Monville C, Torres EM, Dunnett SB (2006). Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *The Journal of Neuroscience Methods* 158:219–223.
- Moolenaar WH, Kruijer W, Tilly BC, Verlaan I, Bierman AJ, de Laat SW (1986). Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* 323:171-173.
- Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26:870-881.
- Morris RG, Baddeley AD (1988). Primary and working memory functioning in Alzheimer-type dementia. *Journal of clinical and experimental neuropsychology* 10:279-296.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Morris SE, Heerey EA, Gold JM, Holroyd CB (2008). Learning-related changes in brain activity following errors and performance feedback in schizophrenia. *Schizophrenia research* 99:274-285.
- Moughal NA, Waters CM, Valentine WJ, Connell M, Richardson JC, Tigyi G, Pyne S, Pyne NJ (2006). Protean agonism of the lysophosphatidic acid receptor-1 with Ki16425 reduces nerve growth factor-induced neurite outgrowth in pheochromocytoma 12 cells. *Journal of neurochemistry* 98:1920-1929.
- Moyer JR, Jr., Deyo RA, Disterhoft JF (1990). Hippocampectomy disrupts trace eye-blink conditioning in rabbits. *Behavioral neuroscience* 104:243-252.
- Mueller NK, Beck SG (2000). Corticosteroids alter the 5-HT(1A) receptor-mediated response in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 23:419-427.
- Murai R, Noda Y, Matsui K, Kamei H, Mouri A, Matsuba K, Nitta A, Furukawa H, Nabeshima T (2007). Hypofunctional glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex is involved in the emotional deficit induced by repeated treatment with phencyclidine in mice: implications for abnormalities of glutamate release and NMDA-CaMKII signaling. *Behavioural brain research* 180:152-160.

- Murph M, Tanaka T, Pang J, Felix E, Liu S, Trost R, Godwin AK, Newman R, Mills G (2007). Liquid chromatography mass spectrometry for quantifying plasma lysophospholipids: potential biomarkers for cancer diagnosis. *Methods in enzymology* 433:1-25.
- Murph MM, Nguyen GH, Radhakrishna H, Mills GB (2008). Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: expression in cancer and mechanisms of regulation. *Biochimica et biophysica acta* 1781:547-557.
- Musazzi L, Di Daniel E, Maycox P, Racagni G, Popoli M (2011). Abnormalities in alpha/beta-CaMKII and related mechanisms suggest synaptic dysfunction in hippocampus of LPA1 receptor knockout mice. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 14:941-953.
- Mutoh T, Rivera R, Chun J (2012). Insights into the pharmacological relevance of lysophospholipid receptors. *British journal of pharmacology* 165:829-844.
- Nacher J, Crespo C, McEwen BS (2001). Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *The European journal of neuroscience* 14:629-644.
- Nagai J, Uchida H, Matsushita Y, Yano R, Ueda M, Niwa M, Aoki J, Chun J, Ueda H (2010). Autotaxin and lysophosphatidic acid1 receptor-mediated demyelination of dorsal root fibers by sciatic nerve injury and intrathecal lysophosphatidylcholine. *Molecular pain* 6:78.
- Nahum S, Morice-Picard F, Taieb A, Sprecher E (2011). A novel mutation in LPAR6 causes autosomal recessive hypotrichosis of the scalp. *Clinical and experimental dermatology* 36:188-194.
- Nakamura K, Igarashi K, Ide K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Masuda A, Oshima N, Takeuchi T, Nangaku M, Okudaira S, Arai H, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y (2008). Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 388:51-58.
- Nakamura K, Kishimoto T, Ohkawa R, Okubo S, Tozuka M, Yokota H, Ikeda H, Ohshima N, Mizuno K, Yatomi Y (2007a). Suppression of lysophosphatidic acid and lysophosphatidylcholine formation in the plasma in vitro: proposal of a plasma sample preparation method for laboratory testing of these lipids. *Analytical biochemistry* 367:20-27.
- Nakamura K, Ohkawa R, Okubo S, Tozuka M, Okada M, Aoki S, Aoki J, Arai H, Ikeda H, Yatomi Y (2007b). Measurement of lysophospholipase D/autotaxin activity in human serum samples. *Clinical biochemistry* 40:274-277.
- Nakamura K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Ikeda H, Yatomi Y, Igarashi K, Ide K, Kishimoto T, Masuda A, Yamamoto T, Tsuji S, Saito N, Kurokawa M, Okudaira S, Aoki J (2009). Autotaxin enzyme immunoassay in human cerebrospinal fluid samples. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 405:160-162.

- Nakamura K, Takeuchi T, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Tozuka M, Aoki J, Arai H, Ikeda H, Ohshima N, Kitamura T, Yatomi Y (2007c). Serum lysophospholipase D/autotaxin may be a new nutritional assessment marker: study on prostate cancer patients. *Annals of clinical biochemistry* 44:549-556.
- Nakane S, Tokumura A, Waku K, Sugiura T (2001). Hen egg yolk and white contain high amounts of lysophosphatidic acids, growth factor-like lipids: distinct molecular species compositions. *Lipids* 36:413-419.
- Nakasaki T, Tanaka T, Okudaira S, Hirosawa M, Umemoto E, Otani K, Jin S, Bai Z, Hayasaka H, Fukui Y, Aozasa K, Fujita N, Tsuruo T, Ozono K, Aoki J, Miyasaka M (2008). Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *The American journal of pathology* 173:1566-1576.
- Nam SW, Clair T, Campo CK, Lee HY, Liotta LA, Stracke ML (2000). Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene* 19:241-247.
- Nardicchi V, Macchioni L, Ferrini M, Goracci G (2007). The presence of a secretory phospholipase A2 in the nuclei of neuronal and glial cells of rat brain cortex. *Biochimica et biophysica acta* 1771:1345-1352.
- Narita M, Goji J, Nakamura H, Sano K (1994). Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I alpha) from rat brain. *The Journal of biological chemistry* 269:28235-28242.
- Nelson MD, Saykin AJ, Flashman LA, Riordan HJ (1998). Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study. *Archives of general psychiatry* 55:433-440.
- Nemeroff CB (2003). The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacology bulletin* 37:133-146.
- Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, Mihara E, Dohmae N, Inoue A, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O (2011). Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nature structural & molecular biology* 18:205-212.
- Nogaroli L, Yuelling LM, Dennis J, Gorse K, Payne SG, Fuss B (2009). Lysophosphatidic acid can support the formation of membranous structures and an increase in MBP mRNA levels in differentiating oligodendrocytes. *Neurochemical research* 34:182-193.
- Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J (2009). Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Current opinion in pharmacology* 9:15-23.

- Nurnberg A, Brauer AU, Wettschureck N, Offermanns S (2008). Antagonistic regulation of neurite morphology through Gq/G11 and G12/G13. *The Journal of biological chemistry* 283:35526-35531.
- Ohl F, Roedel A, Storch C, Holsboer F, Landgraf R (2002). Cognitive performance in rats differing in their inborn anxiety. *Behavioral neuroscience* 116:464-471.
- Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S (2000). Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *Journal of cell science* 113 (Pt 17):3073-3084.
- Ohta H, Sato K, Murata N, Damirin A, Malchinkhuu E, Kon J, Kimura T, Tobo M, Yamazaki Y, Watanabe T, Yagi M, Sato M, Suzuki R, Murooka H, Sakai T, Nishitoba T, Im DS, Nochi H, Tamoto K, Tomura H, Okajima F (2003). Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology* 64:994-1005.
- Ohuchi H, Hamada A, Matsuda H, Takagi A, Tanaka M, Aoki J, Arai H, Noji S (2008). Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237:3280-3294.
- Okudaira S, Yukiura H, Aoki J (2010). Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92:698-706.
- Olton DS, Papas BC (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17:669-682.
- Osborn M, Rustom N, Clarke M, Littelljohn D, Rudyk C, Anisman H, Hayley S (2013). Antidepressant-like effects of erythropoietin: a focus on behavioural and hippocampal processes. *PloS one* 8:e72813.
- Overstreet-Wadiche LS, Westbrook GL (2006). Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* 16: 208-215.
- Palmiter RD, Erickson JC, Hollopeter G, Baraban SC, Schwartz MW (1998). Life without neuropeptide Y. *Recent progress in hormone research* 53:163-199.
- Pare D, Gaudreau H (1996). Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala: distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:3334-3350.
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10734-10739.
- Parra A, Vinader-Caerols C, Monleon S, Simon V (1999). Learned immobility is also involved in the forced swimming test in mice. *Psicothema* Vol 11: nº 2, pp. 239-246.
- Patel YC (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinology Journal* 20: 157-198.
- Pasternack SM, von Kugelgen I, Al About K, Lee YA, Ruschendorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nurnberg P, Nothen MM, Betz RC (2008). G protein-coupled receptor P2Y5

- and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature genetics* 40:329-334.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pedraza C, Sanchez-Lopez J, Castilla-Ortega E, Rosell-Valle C, Zambrana-Infantes E, Garcia-Fernandez M, Rodriguez de Fonseca F, Chun J, Santin LJ, Estivill-Torrus G (2013). Fear extinction and acute stress reactivity reveal a role of LPA receptor in regulating emotional-like behaviors. *Brain structure & function*.
- Peinado, M. A., Pedrosa, J. A., Rodrigo, J. (1996). *Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Jaen: Publicaciones de la Universidad de Jaén.
- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 177:245-255.
- Petrik D, Lagace DC, Eisch AJ (2012). The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology* 62:21-34.
- Pieringer RA, Hokin LE (1962). Biosynthesis of phosphatidic acid from lysophosphatidic acid and palmitoyl coenzyme A. *The Journal of biological chemistry* 237:659-663.
- Pilpel Y, Segal M (2004). Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *The European journal of neuroscience* 19:3151-3164.
- Pilpel Y, Segal M (2006). The role of LPA1 in formation of synapses among cultured hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* 97:1379-1392.
- Pilquill C, Singh I, Zhang Q, Ling Z, Buri K, Stromberg LM, Dewald J, Brindley DN (2001). Lipid phosphate phosphatase-1 dephosphorylates exogenous lysophosphatidate and thereby attenuates its effects on cell signalling. *Prostaglandins* 64:83-92.
- Pittenger C, Duman RS (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 33:88-109.
- Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life sciences* 67:335-364.
- Plumpe T, Ehninger D, Steiner B, Klempin F, Jessberger S, Brandt M, Romer B, Rodriguez GR, Kronenberg G, Kempermann G (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC neuroscience* 7:77.
- Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development (Cambridge, England)* 129:3147-3160.

- Porsolt RD (1979). Animal model of depression. *Biomedicine* / [publiee pour l'AAICIG] 30:139-140.
- Porsolt RD (1997). Historical perspective on CMS model. *Psychopharmacology* 134:363-364; discussion 371-367.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977a). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 229:327-336.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977b). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732.
- Pouille F, Scanziani M (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science (New York, NY)* 293:1159-1163.
- Powell EM, Campbell DB, Stanwood GD, Davis C, Noebels JL, Levitt P (2003). Genetic disruption of cortical interneuron development causes region- and GABA cell type-specific deficits, epilepsy, and behavioral dysfunction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:622-631.
- Pradere JP, Klein J, Gres S, Guigne C, Neau E, Valet P, Calise D, Chun J, Bascands JL, Saulnier-Blache JS, Schanstra JP (2007). LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18:3110-3118.
- Prut L, Belzung C (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology* 463:3-33.
- Pyne S, Kong KC, Darroch PI (2004). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Seminars in cell & developmental biology* 15:491-501.
- Raedt R, Van Dycke A, Vonck K, Boon P (2007). Cell therapy in models for temporal lobe epilepsy. *Seizure : the journal of the British Epilepsy Association* 16:565-578.
- Ramón y Cajal S (1888). Sobre las fibras nerviosas de la capa molecular del cerebro. *Revista trimestral de Histología normal y patología* 1:3-49.
- Ramos A, Mormede P (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 22:33-57.
- Rancoule C, Dusaulcy R, Treguer K, Gres S, Attane C, Saulnier-Blache JS (2014). Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis. *Biochimie* 96:140-143.
- Rawlins JN, Olton DS (1982). The septo-hippocampal system and cognitive mapping. *Behavioural brain research* 5:331-358.
- Reul JM, Hesketh SA, Collins A, Mécinas MG (2009). Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 4:434-439.

- Rhee HJ, Nam JS, Sun Y, Kim MJ, Choi HK, Han DH, Kim NH, Huh SO (2006). Lysophosphatidic acid stimulates cAMP accumulation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in immortalized hippocampal progenitor cells. *Neuroreport* 17:523-526.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-410.
- Rivera R, Chun J (2008). Biological effects of lysophospholipids. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 160:25-46.
- Roberts C, Winter P, Shilliam CS, Hughes ZA, Langmead C, Maycox PR, Dawson LA (2005). Neurochemical changes in LPA1 receptor deficient mice--a putative model of schizophrenia. *Neurochemical research* 30:371-377.
- Roberts WW, Dember WN, Brodwick M (1962). Alternation and exploration in rats with hippocampal lesions. *Journal of comparative and physiological psychology* 55:695-700.
- Ruschenschmidt C, Koch PG, Brustle O, Beck H (2005). Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats. *Epilepsia* 46 Suppl 5:174-183.
- Saffen DW, Cole AJ, Worley PF, Christy BA, Ryder K, Baraban JM (1988). Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:7795-7799.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science (New York, NY)* 240:1328-1331.
- Sanderson DJ, Bannerman DM (2012). The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. *Hippocampus* 22:981-994.
- Sano T, Baker D, Virag T, Wada A, Yatomi Y, Kobayashi T, Igarashi Y, Tigyi G (2002). Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *The Journal of biological chemistry* 277:21197-21206.
- Santin LJ, Bilbao A, Pedraza C, Matas-Rico E, Lopez-Barroso D, Castilla-Ortega E, Sanchez-Lopez J, Riquelme R, Varela-Nieto I, de la Villa P, Suardiaz M, Chun J, De Fonseca FR, Estivill-Torrus G (2009). Behavioral phenotype of maLPA1-null mice: increased anxiety-like behavior and spatial memory deficits. *Genes, brain, and behavior* 8:772-784.
- Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y (2001). Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochemical and biophysical research communications* 286:292-297.
- Sato K, Malchinkhuu E, Muraki T, Ishikawa K, Hayashi K, Tosaka M, Mochiduki A, Inoue K, Tomura H, Mogi C, Nochi H, Tamoto K, Okajima F (2005). Identification of autotaxin as a neurite

- retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources. *Journal of neurochemistry* 92:904-914.
- Savaskan NE, Rocha L, Kotter MR, Baer A, Lubec G, van Meeteren LA, Kishi Y, Aoki J, Moolenaar WH, Nitsch R, Brauer AU (2007). Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 64:230-243.
- Savitz J, Lucki I, Drevets WC (2009). 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Progress in neurobiology* 88:17-31.
- Savitz SI, Dhallu MS, Malhotra S, Mammis A, Ocava LC, Rosenbaum PS, Rosenbaum DM (2006). EDG receptors as a potential therapeutic target in retinal ischemia-reperfusion injury. *Brain research* 1118:168-175.
- Sawada M, Sawamoto K (2013). Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *The Keio journal of medicine* 62:13-28.
- Schober A, Siess W (2012). Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *British journal of pharmacology* 167:465-482.
- Schweitzer P, Madamba SG, Siggins GR (1998). Somatostatin increases a voltage-insensitive K⁺ conductance in rat CA1 hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology* 79:1230-1238.
- Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP (2001). Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behavioral Brain Research*, 125 pp. 109–125.
- Sengupta S, Wang Z, Tipps R, Xu Y (2004). Biology of LPA in health and disease. *Seminars in cell & developmental biology* 15:503-512.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 478:359-378.
- Shah BH, Catt KJ (2005). Roles of LPA3 and COX-2 in implantation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16:397-399.
- Shano S, Moriyama R, Chun J, Fukushima N (2008). Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. *Neurochemistry international* 52:216-220.
- Shea BS, Tager AM (2012) Sphingolipid regulation of tissue fibrosis. *The open rheumatology journal* 6:123-129.
- Shen Q, Fuchs T, Sahir N, Luscher B (2012). GABAergic control of critical developmental periods for anxiety- and depression-related behavior in mice. *PloS one* 7:e47441.
- Shen Z, Belinson J, Morton RE, Xu Y, Xu Y (1998). Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulates lysophosphatidic acid secretion from ovarian and cervical cancer cells but not from breast or leukemia cells. *Gynecologic oncology* 71:364-368.

- Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW (2001). A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophrenia research* 49:1-52.
- Shetty AK, Hattiangady B (2007). Concise review: prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:2396-2407.
- Shida D, Kitayama J, Yamaguchi H, Okaji Y, Tsuno NH, Watanabe T, Takuwa Y, Nagawa H (2003). Lysophosphatidic acid (LPA) enhances the metastatic potential of human colon carcinoma DLD1 cells through LPA1. *Cancer research* 63:1706-1711.
- Shida D, Watanabe T, Aoki J, Hama K, Kitayama J, Sonoda H, Kishi Y, Yamaguchi H, Sasaki S, Sako A, Konishi T, Arai H, Nagawa H (2004). Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84:1352-1362.
- Shimomura Y, Garzon MC, Kristal L, Shapiro L, Christiano AM (2009). Autosomal recessive woolly hair with hypotrichosis caused by a novel homozygous mutation in the P2RY5 gene. *Experimental dermatology* 18:218-221.
- Shin TJ, Kim HJ, Kwon BJ, Choi SH, Kim HB, Hwang SH, Lee BH, Lee SM, Zukin RS, Park JH, Kim HC, Rhim H, Lee JH, Nah SY (2012). Gintonin, a ginseng-derived novel ingredient, evokes long-term potentiation through N-methyl-D-aspartic acid receptor activation: involvement of LPA receptors. *Molecules and cells* 34:563-572.
- Shindo A, Nakamura T, Matsumoto Y, Kawai N, Okano H, Nagao S, Itano T, Tamiya T (2010). Seizure suppression in amygdala-kindled mice by transplantation of neural stem/progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. *Neurologia medico-chirurgica* 50:98-105; discussion 105-106.
- Shine J, Potter EK, Biden T, Selbie LA, Herzog H (1994). Neuropeptide Y and regulation of the cardiovascular system. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 12:S41-45.
- Sidman RL, Miale IL, Feder N (1959). Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Experimental neurology* 1:322-333.
- Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, Aepfelbacher M (1999). Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6931-6936.

- Sim-Selley LJ, Goforth PB, Mba MU, Macdonald TL, Lynch KR, Milstien S, Spiegel S, Satin LS, Welch SP, Selley DE (2009). Sphingosine-1-phosphate receptors mediate neuromodulatory functions in the CNS. *Journal of neurochemistry* 110:1191-1202.
- Simon P, Dupuis R, Costentin J (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural brain research* 61:59-64.
- Smyth SS, Cheng HY, Miriyala S, Panchatcharam M, Morris AJ (2008). Roles of lysophosphatidic acid in cardiovascular physiology and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1781:563-570.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 476:458-461.
- Song J, Christian KM, Ming GL, Song H (2012). Life or death: developing cortical interneurons make their own decision. *The EMBO journal* 31:4373-4374.
- Sperk G, Marksteiner J, Gruber B, Bellmann R, Mahata M, Ortler M (1992). Functional changes in neuropeptide Y- and somatostatin-containing neurons induced by limbic seizures in the rat. *Neuroscience*. ;50:831-46.
- Southwell DG, Froemke RC, Alvarez-Buylla A, Stryker MP, Gandhi SP (2010). Cortical plasticity induced by inhibitory neuron transplantation. *Science (New York, NY)* 327:1145-1148.
- Southwell DG, Paredes MF, Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Baraban SC, Alvarez-Buylla A (2012). Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* 491:109-113.
- Spoehr TC, Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rehen SK, Gomes FC, Chun J (2008). Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *The Journal of biological chemistry* 283:7470-7479.
- Stankoff B, Barron S, Allard J, Barbin G, Noel F, Aigrot MS, Premont J, Sokoloff P, Zalc B, Lubetzki C (2002). Oligodendroglial expression of Edg-2 receptor: developmental analysis and pharmacological responses to lysophosphatidic acid. *Molecular and cellular neurosciences* 20:415-428.
- Stanley EM, Fadel JR, Mott DD (2012). Interneuron loss reduces dendritic inhibition and GABA release in hippocampus of aged rats. *Neurobiology of aging* 33:431.e431-413.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46:41-52.
- Stone SS, Teixeira CM, Zaslavsky K, Wheeler AL, Martinez-Canabal A, Wang AH, Sakaguchi M, Lozano AM, Frankland PW (2011). Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus* 21:1348-1362.

- Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, Liotta LA (1992). Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *The Journal of biological chemistry* 267:2524-2529.
- Sugiura T, Nakane S, Kishimoto S, Waku K, Yoshioka Y, Tokumura A (2002). Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *Journal of lipid research* 43:2049-2055.
- Sugiura T, Tokumura A, Gregory L, Nouchi T, Weintraub ST, Hanahan DJ (1994). Biochemical characterization of the interaction of lipid phosphoric acids with human platelets: comparison with platelet activating factor. *Archives of biochemistry and biophysics* 311:358-368.
- Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano MR, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S (2010). LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* 116:5060-5070.
- Sun Y, Nam JS, Han DH, Kim NH, Choi HK, Lee JK, Rhee HJ, Huh SO (2010). Lysophosphatidic acid induces upregulation of Mcl-1 and protects apoptosis in a PTX-dependent manner in H19-7 cells. *Cellular signalling* 22:484-494.
- Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C (2011). Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Molecular psychiatry* 16:1177-1188.
- Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G, Belzung C, Sibille E (2009). Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34:1363-1380.
- Swaney JS, Chapman C, Correa LD, Stebbins KJ, Bunday RA, Prodanovich PC, Fagan P, Baccei CS, Santini AM, Hutchinson JH, Seiders TJ, Parr TA, Prasit P, Evans JF, Lorrain DS (2010). A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *British journal of pharmacology* 160:1699-1713.
- Tabuchi S, Kume K, Aihara M, Shimizu T (2000). Expression of lysophosphatidic acid receptor in rat astrocytes: mitogenic effect and expression of neurotrophic genes. *Neurochemical research* 25:573-582.
- Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD (2008). The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nature medicine* 14:45-54.
- Tallent MK, Siggins GR (1999). Somatostatin acts in CA1 and CA3 to reduce hippocampal epileptiform activity. *Journal of neurophysiology* 81:1626-1635.

- Tanaka DH, Toriumi K, Kubo K, Nabeshima T, Nakajima K (2011). GABAergic precursor transplantation into the prefrontal cortex prevents phencyclidine-induced cognitive deficits. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 31:14116-14125.
- Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, Noji S, Yatomi Y, Aoki J, Arai H (2006). Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 281:25822-25830.
- Tanti A, Belzung C (2010). Open questions in current models of antidepressant action. *British journal of pharmacology* 159:1187-1200.
- Taupin P (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews* 53:198-214.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koos T, Ibanez-Sandoval O (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in neuroanatomy* 4:150.
- Tham CS, Lin FF, Rao TS, Yu N, Webb M (2003). Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 21:431-443.
- Thiele TE, Sparta DR, Hayes DM, Fee JR (2004). A role for neuropeptide Y in neurobiological responses to ethanol and drugs of abuse. *Neuropeptides* 38:235-243.
- Thompson K (2009). Transplantation of GABA-producing cells for seizure control in models of temporal lobe epilepsy. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 6:284-294.
- Thompson K, Donegan N, Lavond D (1988). The psychobiology of learning and memory. In: RC Atkinson, RJ Herrnstein, G Lindzey and RD Luce (Eds), *Stevens' handbook of experimental psychology: Vol 2 Learning and cognition* New York: Wiley 245-347.
- Thompson R (1986). The neurobiology of learning and memory. *Science (New York, NY)* 233:941-947.
- Tigyi G, Miledi R (1992). Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *The Journal of biological chemistry* 267:21360-21367.
- Tigyi G, Parrill AL (2003). Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Progress in lipid research* 42:498-526.
- Tischmeyer W, Grimm R (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 55:564-574.
- Tokumura A (2004). Metabolic pathways and physiological and pathological significances of lysolipid phosphate mediators. *Journal of cellular biochemistry* 92:869-881.

- Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K, Fukuzawa K (2002). Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry* 277:39436-39442.
- Tokumura A, Miyake M, Nishioka Y, Yamano S, Aono T, Fukuzawa K (1999). Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biology of reproduction* 61:195-199.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.
- Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke M, Streu N, Kieselmann O, Brunk I, Laube G, Strauss U, Battefeld A, Wende H, Birchmeier C, Wiese S, Sendtner M, Kawabe H, Kishimoto-Suga M, Brose N, Baumgart J, Geist B, Aoki J, Savaskan NE, Brauer AU, Chun J, Ninnemann O, Schmitz D, Nitsch R (2009). Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell* 138:1222-1235.
- Trollope AF, Gutierrez-Mecinas M, Mifsud KR, Collins A, Saunderson EA, Reul JM (2012). Stress, epigenetic control of gene expression and memory formation. *Experimental neurology* 233:3-11.
- Tsuda S, Okudaira S, Moriya-Ito K, Shimamoto C, Tanaka M, Aoki J, Arai H, Murakami-Murofushi K, Kobayashi T (2006). Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. *The Journal of biological chemistry* 281:26081-26088.
- Tsukahara T (2012). The Role of PPARgamma in the Transcriptional Control by Agonists and Antagonists. *PPAR research* 2012:362361.
- Tu B, Timofeeva O, Jiao Y, Nadler JV (2005). Spontaneous release of neuropeptide Y tonically inhibits recurrent mossy fiber synaptic transmission in epileptic brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:1718-1729.
- Ubeda M, Vallejo M, Habener JF (1999). CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. *Molecular and cellular biology* 19:7589-7599.
- Ueda H, Matsunaga H, Olaposi OI, Nagai J (2013). Lysophosphatidic acid: chemical signature of neuropathic pain. *Biochimica et biophysica acta* 1831:61-73.
- Umemura K, Yamashita N, Yu X, Arima K, Asada T, Makifuchi T, Murayama S, Saito Y, Kanamaru K, Goto Y, Kohsaka S, Kanazawa I, Kimura H (2006). Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients. *Neuroscience letters* 400:97-100.
- Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H (2002). Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *The Journal of cell biology* 158:227-233.

- Urs NM, Kowalczyk AP, Radhakrishna H (2008). Different mechanisms regulate lysophosphatidic acid (LPA)-dependent versus phorbol ester-dependent internalization of the LPA1 receptor. *The Journal of biological chemistry* 283:5249-5257.
- Valente MF, Romariz S, Calcagnotto ME, Ruiz L, Mello LE, Frussa-Filho R, Longo BM (2013). Postnatal transplantation of interneuronal precursor cells decreases anxiety-like behavior in adult mice. *Cell transplantation* 22:1237-1247.
- van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH (1989). Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. In: *Cell*, vol. 59, pp 45-54.
- van Meeteren LA, Brinkmann V, Saulnier-Blache JS, Lynch KR, Moolenaar WH (2008). Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer letters* 266:203-208.
- van Meeteren LA, Moolenaar WH (2007). Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Progress in lipid research* 46:145-160.
- van Meeteren LA, Ruurs P, Christodoulou E, Goding JW, Takakusa H, Kikuchi K, Perrakis A, Nagano T, Moolenaar WH (2005). Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *The Journal of biological chemistry* 280:21155-21161.
- van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Molecular and cellular biology* 26:5015-5022.
- van Straaten F, Muller R, Curran T, Van Beveren C, Verma IM (1983). Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:3183-3187.
- Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipskind RA, Caboche J (1999). Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Molecular and cellular biology* 19:136-146.
- Vezzani A, Rizzi M, Conti M, Samanin R (2000). Modulatory role of neuropeptides in seizures induced in rats by stimulation of glutamate receptors. *The Journal of nutrition* 130:1046s-1048s.
- Vincent SR, Johansson O (1983). Striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities and NADPH-diaphorase activity: a light and electron microscopic study. *The Journal of comparative neurology* 217:264-270.
- Vincent SR, Johansson O, Hokfelt T, Skirboll L, Elde RP, Terenius L, Kimmel J, Goldstein M (1983). NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both

- somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *The Journal of comparative neurology* 217:252-263.
- Vollenweider I, Smith KS, Keist R, Rudolph U (2011). Antidepressant-like properties of alpha2-containing GABA(A) receptors. *Behavioural brain research* 217:77-80.
- Vollmayr B, Simonis C, Weber S, Gass P, Henn F (2003). Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with the development of learned helplessness. *Biological psychiatry* 54:1035-1040.
- Waldau B, Hattiangady B, Kuruba R, Shetty AK (2010). Medial ganglionic eminence-derived neural stem cell grafts ease spontaneous seizures and restore GDNF expression in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28:1153-1164.
- Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, Aoki J, Hama K, Okudaira S, Tanaka M, Tomiya T, Yanase M, Tejima K, Nishikawa T, Arai M, Arai H, Omata M, Fujiwara K, Yatomi Y (2007). Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *Journal of clinical gastroenterology* 41:616-623.
- Watzman N, Barry H 3rd, Kinnard WJ Jr., Buckley JP (1967). Influence of certain parameters on the performance of mice on the rotarod. *Archives Internationales Pharmacodynamie Ther*, 169 pp. 362-374.
- Weinberger DR (1997). The biological basis of schizophrenia: new directions. *The Journal of clinical psychiatry* 58 Suppl 10:22-27.
- Weiner JA, Hecht JH, Chun J (1998). Lysophosphatidic acid receptor gene *vzg-1/lpA1/edg-2* is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *The Journal of comparative neurology* 398:587-598.
- West AP (1990). Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 14:863-877.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18:779-791.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A (1999). Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nature neuroscience* 2:461-466.
- Willier S, Butt E, Grunewald TG (2013). Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: a focussed review and analysis of LPA receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 105:317-333.
- Woelk H, Rubly N, Arienti G, Gaiti A, Porcellati G (1981). Occurrence and properties of phospholipases A1 of plasma membranes prepared from neuronal- and glial-enriched fractions of the rabbit cerebral cortex. *Journal of neurochemistry* 36:875-880.

- Wonders CP, Anderson SA (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nature reviews Neuroscience* 7:687-696.
- Wu YP, Mizugishi K, Bektas M, Sandhoff R, Proia RL (2008). Sphingosine kinase 1/S1P receptor signaling axis controls glial proliferation in mice with Sandhoff disease. *Human molecular genetics* 17:2257-2264.
- Xie W, Matsumoto M, Chun J, Ueda H (2008). Involvement of LPA1 receptor signaling in the reorganization of spinal input through Abeta-fibers in mice with partial sciatic nerve injury. *Molecular pain* 4:46.
- Xu Q, Pan Y, Yi LT, Li YC, Mo SF, Jiang FX, Qiao CF, Xu HX, Lu XB, Kong LD, Kung HF (2008). Antidepressant-like effects of psoralen isolated from the seeds of *Psoralea corylifolia* in the mouse forced swimming test. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31:1109-1114.
- Xu X, Roby KD, Callaway EM (2010). Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *The Journal of comparative neurology* 518:389-404.
- Xu Y, Gaudette DC, Boynton JD, Frankel A, Fang XJ, Sharma A, Hurteau J, Casey G, Goodbody A, Mellors A, et ál. (1995). Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1:1223-1232.
- Yan H, Lu D, Rivkees SA (2003). Lysophosphatidic acid regulates the proliferation and migration of olfactory ensheathing cells in vitro. *Glia* 44:26-36.
- Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S (2009). Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *The Journal of biological chemistry* 284:17731-17741.
- Yang C, Lafleur J, Mwaikambo BR, Zhu T, Gagnon C, Chemtob S, Di Polo A, Hardy P (2009). The role of lysophosphatidic acid receptor (LPA1) in the oxygen-induced retinal ganglion cell degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:1290-1298.
- Yang E, Schulman H (1999). Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of biological chemistry* 274:26199-26208.
- Yang X, Chen Y, Gabuzda D (1999). ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry* 274:27981-27988.
- Yannielli PC, Harrington ME (2001). Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides* 22:547-556.

- Yatomi Y (2010). [Clinical introduction of lysophosphatidic acid and autotaxin assays]. *Rinsho byori The Japanese journal of clinical pathology* 58:631-635.
- Ye X, Ishii I, Kingsbury MA, Chun J (2002). Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochimica et biophysica acta* 1585:108-113.
- Yukiura H, Hama K, Nakanaga K, Tanaka M, Asaoka Y, Okudaira S, Arima N, Inoue A, Hashimoto T, Arai H, Kawahara A, Nishina H, Aoki J (2011). Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *The Journal of biological chemistry* 286:43972-43983
- Yung YC, Mutoh T, Lin ME, Noguchi K, Rivera RR, Choi JW, Kingsbury MA, Chun J (2011). Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Science translational medicine* 3:99ra87.
- Zarcone D, Prasthofer EF, Malavasi F, Pistoia V, LoBuglio AF, Grossi CE (1987). Ultrastructural analysis of human natural killer cell activation. *Blood* 69:1725-1736.
- Zheng ZQ, Fang XJ, Qiao JT (2004). Dual action of lysophosphatidic acid in cultured cortical neurons: survival and apoptogenic. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 56:163-171.
- Zheng ZQ, Fang XJ, Zhang Y, Qiao JT (2005). Neuroprotective effect of lysophosphatidic acid on AbetaP31-35-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]* 57:289-294.
- Zhou Y, Wu H, Li S, Chen Q, Cheng XW, Zheng J, Takemori H, Xiong ZQ (2006). Requirement of TORC1 for late-phase long-term potentiation in the hippocampus. *PloS one* 1:e16.
- Zipancic I, Calcagnotto ME, Piquer-Gil M, Mello LE, Alvarez-Dolado M (2010). Transplant of GABAergic precursors restores hippocampal inhibitory function in a mouse model of seizure susceptibility. *Cell transplantation* 19:549-564.
- Zondag GC, Postma FR, Etten IV, Verlaan I, Moolenaar WH (1998). Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *The Biochemical journal* 330 (Pt 2):605-609.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis agradecimientos a todas las personas que me han ayudado a realizar este trabajo.

A mis directores de Tesis, Dr. Luis J. Santín y Dr. Guillermo Estivill por la confianza mostrada en mí desde el primer día, por el apoyo, la dedicación y la enseñanza a lo largo de estos años.

A la Dra. Carmen Pedraza quiero dar las gracias por su disposición a ayudarme en cualquier momento y por todos los buenos consejos que me han enriquecido profesional y personalmente.

A mis compañeros Ana, Bea, Carolina, Eduardo, Isaac y en especial a Estela, Emma y Jorge, por hacer que las horas de trabajo sean tan amenas con divertidas anécdotas y entretenidas conversaciones. Mis compañeros del laboratorio del Civil, Carmen, Curro y Lourdes, por vuestra grata compañía. Gracias a todos por el apoyo, ánimo y por estar siempre ahí. Un placer haber pasado estos años junto a grandes personas.

Marina y Chema, mi especial agradecimiento por la gran aportación y calidad humana a la realización de este trabajo, contando con vuestro tiempo y disponibilidad en esos largos días de experimentos.

Al Dr. Manuel Álvarez y a su excelente grupo, Dra. Magdalena Martínez, Dra. Inés Martins, Daniel Rodríguez y Mercedes Pérez, les agradezco la gran acogida y la gran amabilidad que me mostraron en esos meses de estancia. Al igual que al servicio de estabulario del CABIMER por la disponibilidad y la atención prestada. Gracias por darme la oportunidad de continuar aprendiendo y mejorando mi carrera investigadora. Fue una valiosa experiencia compartir tan buenos momentos con vosotros.

Gracias a Mercedes Martín por facilitarme la labor como docente, por la ayuda, comprensión y también, por la paciencia que has tenido en los dos últimos años.

A mis amigas y amigos por enseñarme que la distancia no rompe con las grandes amistades. Gracias por todos los años compartidos, complicidad, risas y sincera compañía.

Jesús, decirte que gracias por transmitirme serenidad, estabilidad, pero sobre todo por regalarme los mejores momentos manteniendo siempre una buena armonía.

A mi hermano y mi cuñada por creer en lo que hago y apoyarme. A mis dos sobrinos, Marta y Jacinto, por todas las fuerzas que me dan cada vez que les veo sonreír.

Por último, y no menos importante, a mis padres dedicarles que la palabra gracias se queda pequeña a vuestro lado por todo lo que habéis hecho y seguís haciendo por mí. El esfuerzo, la ilusión, la curiosidad por conocer más sobre la vida os la debo a vosotros.

“Gracias a Málaga por adoptar a una sevillana”

