



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Programa de Doctorado en Psicología
Facultad de Psicología y logopedia
Universidad de Málaga



ibima
Instituto de Investigación
Biomédica de Málaga

Tesis Doctoral

**DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE LPA
EN HIPOCAMPO DE RATÓN.
EFECTO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTRÉS**

Sara Tabbai Amal

DIRECTORAS

Dra. Carmen Pedraza Benítez


Dra. Margarita Pérez Martín





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Sara Tabbai Amal

 <http://orcid.org/0000-0003-2005-2003>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

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





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



Determinación de las especies de LPA en hipocampo de ratón. Efecto de diferentes protocolos de estrés

**LPA species determinations in mouse hippocampus.
Effect of different stress protocols**

Memoria presentada por Sara Tabbai Amal para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga, bajo la dirección de las

Dras. Carmen Pedraza Benítez y Margarita Pérez Martín





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



Dña. Carmen Pedraza Benítez, Doctora en Psicología y Catedrática del Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Málaga, y Dña. Margarita Pérez Martín, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

CERTIFICAN:

Que Dña. Sara Tabbai Amal ha realizado en el Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Málaga, bajo nuestra dirección, el presente trabajo de investigación titulado: "Determinación de las especies de LPA en hipocampo de ratón. Efecto de diferentes protocolos de estrés", 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 13 de noviembre de 2019.

Fdo. Carmen Pedraza Benítez

Fdo. Margarita Pérez Martín



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Yo, Sara Tabbai Amal, DECLARO que soy autora del presente trabajo y que lo he realizado en el Laboratorio de Psicobiología de la Facultad de Psicología bajo la dirección de las Dras. Carmen Pedraza Benítez y Margarita Pérez Martín.

Y para que así conste, firmo la presente declaración en Málaga, 13 de noviembre de 2019.



Fdo. Sara Tabbai Amal



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

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 Aplicada en Enfermedades Neurológicas y Neuropsiquiátricas*, 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.

El trabajo se ha llevado a cabo en las siguientes *instalaciones de la Universidad de Málaga*: Laboratorio de Psicobiología, Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento, IBIMA, Universidad de Málaga; Laboratorio de Fisiología Animal, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, IBIMA, Universidad de Málaga; ECAI Centro de Experimentación Animal, IBIMA, Universidad de Málaga; SCAI centros de servicios de apoyo a la investigación, Universidad de Málaga.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Entidades financiadoras

Incentivos para la formación de personal docente e investigador predoctoral en las Universidades Públicas de Andalucía. 2012. 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: Sara Tabbai Amal.

Estrés, neurogénesis y depresión: ¿Cuál es el papel del receptor LPA1 para el ácido lisofosfatídico?. Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia SEJ-1863). IP: Carmen Pedraza (2014-2018).

“Implicación de la interacción entre neuroinflamación, neurogénesis y ácido lisofosfatídico (LPA) en la depresión inducida por estrés”. FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades – Agencia Estatal de Investigación/ (PSI2017-83408-P). IP: Carmen Pedraza Benítez.

Relevancia clínica y eficacia terapéutica del secretoma de células troncales mesenquimales secretoras de interferón beta en modelos animales de esclerosis múltiple (Exp.: FIS PI16/ 01510). Acción Estratégica en Salud. Proyectos de Investigación en Salud. 2016. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. 110.715 € 2017-2019. IP: G. Estivill Torrús





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mi marido y a Sumaya,

“En general, los hombres juzgan más por los ojos que por la inteligencia, pues todos pueden ver, pero pocos comprenden lo que ven”

(Nicolás Maquiavelo)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	29
1. LÍPIDOS	31
1.1 Clasificación y categorización de lípidos	33
<i>1.1.1 Acilos grasos</i>	<i>33</i>
<i>1.1.2 Glicerolípidos</i>	<i>34</i>
<i>1.1.3 Glicerofosfolípidos</i>	<i>34</i>
<i>1.1.4 Esfingolípidos</i>	<i>35</i>
<i>1.1.5 Lípidos Esteroles</i>	<i>36</i>
<i>1.1.6 Lípidos Prenoles</i>	<i>36</i>
<i>1.1.7 Sacarolípidos</i>	<i>37</i>
<i>1.1.8. Policétidos</i>	<i>37</i>
2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LÍPIDOS	38
2.1 Técnicas basadas en espectrometría de masas aplicadas a estudios lipidómicos.. 38	
<i>2.1.1 Sonda directa en espectrometría de masas</i>	<i>39</i>
<i>2.1.2 Espectrometría de masas acoplada a la cromatografía</i>	<i>39</i>
<i>2.1.3 Espectroscopía de masas basada en imagen</i>	<i>40</i>
2.2 Sistemas de ionización aplicadas en espectrometría de masas en lipidómica 41	
<i>2.2.1 Ionización por Electrospray (ESI)</i>	<i>41</i>
<i>2.2.2 Desorción/Ionización láser asistida por matriz (MALDI)</i>	<i>42</i>
<i>2.2.3 Ionización química por presión atmosférica (APCI)</i>	<i>42</i>
<i>2.2.4 Fotoionización a presión (APPI)</i>	<i>42</i>
<i>2.2.5 Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)</i>	<i>43</i>
<i>2.2.6 Desorción con electrospray (DESI)</i>	<i>43</i>
3. LÍPIDOS Y SISTEMA NERVIOSO	44
4. LÍPIDOS Y ESTRÉS	46
5. LÍPIDOS Y PSICOPATOLOGÍAS	50
6. ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO (LPA)	53
6.1 Mecanismos de biosíntesis de LPA	54
<i>6.1.1 Producción de LPA en suero/plasma</i>	<i>55</i>
<i>6.1.1.1 Lisofosfolípidos como precursores de LPA</i>	<i>56</i>
<i>6.1.1.2 Producción de LPA por la acción secuencial de LCAT y lisoPLD</i>	<i>57</i>
<i>6.1.1.3 Conversión de PA en LPA a través de plaquetas activas</i>	<i>58</i>
<i>6.1.2 Producción de LPA a nivel intracelular</i>	<i>58</i>
6.2 Metabolización de LPA	60
7. LPA Y SISTEMA NERVIOSO	61
7.1 Tipos de receptores de LPA	64

7.1.1 El receptor LPA_1	64
7.1.2 El receptor LPA_2	65
7.1.3 El receptor LPA_3	66
7.1.4 El receptor LPA_4	67
7.1.5 El receptor LPA_5	68
7.1.6 El receptor LPA_6	69
8. LPA Y PSICOPATOLOGÍA	69
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
CAPÍTULO III: PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE LPA EN TEJIDO Y SUERO	81
1. INTRODUCCIÓN	83
2. MATERIAL Y MÉTODOS	85
2.1 Muestras biológicas.....	85
2.2 Reactivos.....	86
2.3 Aparatos	86
2.4 Preparación de disoluciones patrón	86
2.5 Perfusión intracardíaca y extracción del hipocampo.....	87
2.6 Método de extracción de las especies de LPA.....	88
2.6.1 Extracción de LPA en tejido hipocampal.....	88
2.6.1.1 Extracción de LPA en tejido hipocampal inferior a 100 mg	88
2.6.2 Extracción de LPA en suero.....	91
3. RESULTADOS	93
3.1 Obtención de la recta de calibrado.....	93
3.2 Espectros en muestras de tejido	97
3.3 Espectros en muestras en suero.....	99
4. DISCUSIÓN	101
5. CONCLUSIONES.....	103
CAPÍTULO IV: EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO EN LAS ESPECIES DE LPA EN HIPOCAMPO DE RATONES TIPO SILVESTRE Y CARENTES DE RECEPTOR LPA_1	105
1. INTRODUCCIÓN	107
2. MATERIAL Y MÉTODOS	109
2.1 Animales	109
2.2 Diseño experimental.....	110
2.3 Estrés Agudo.....	112
2.3.1 Laberinto elevado en cruz (EPM).....	112
2.3.2 Estrés por inmovilización.....	115
2.3.3 Estrés por inmovilización + EPM.....	116
2.4 Decapitación y extracción del hipocampo	116

2.5 Determinación de especies de LPA en tejido de hipocampo	116
2.6 Determinación de los niveles de corticosterona	117
2.7 Análisis estadístico.....	117
2.7.1 <i>Test de EPM</i>	117
2.7.2 <i>Cuantificación de LPA</i>	118
2.7.3 <i>Análisis de corticosterona</i>	118
3. RESULTADOS	119
3.1 Análisis conductual del EPM en ratones silvestres y carentes del receptor LPA ₁	119
3.2 Determinación de especies de LPA en condiciones basales en ratones silvestres y carentes del receptor LPA ₁	122
3.3 Determinación de las especies de LPA en condiciones de estrés agudo.....	124
3.4 Efectos de la ausencia del receptor LPA ₁ y de diferentes estresores agudos en el perfil de LPA hipocampal	126
3.5 Determinación de los niveles de corticosterona	129
4. DISCUSIÓN	130
5. CONCLUSIONES	137
CAPÍTULO V: EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO Y LA ADMINISTRACIÓN DE LPA EN LAS ESPECIES DE LPA EN HIPOCAMPO DE RATONES TIPO SILVESTRE..	139
1.INTRODUCCIÓN	141
2. MATERIAL Y MÉTODOS	144
2.1 Animales.....	144
2.2 Diseño experimental	144
2.3 Administración intracerebroventricular.....	146
2.5 Modelo de estrés por inmovilización	147
2.6 Perfusión intracardiaca y extracción de hipocampo	148
2.7 Determinación de las especies de LPA	149
2.8 Análisis Estadístico.....	149
3. RESULTADOS	150
3.1 Determinación de las especies de LPA en condiciones de estrés crónico	150
3.2 Efectos de la administración continuada de LPA en las especies hipocampales de LPA	151
4. DISCUSIÓN	152
5. CONCLUSIONES	152
CONCLUSIONES GENERALES	152
SUMMARY.....	152
ANEXOS.....	221
REFERENCIAS.....	237
AGRADECIMIENTOS.....	259

Índice de Figuras

Introducción

Figura 1: Diferentes vías de producción de LPA en medio extracelular e intracelular.....	59
Figura 2: Diferentes mecanismos de degradación de LPA	61
Figura 3: Las diferentes especies de LPA inciden sobre los distintos tipos de receptores de LPA.....	62

Capítulo III

Figura 4: Procedimiento de extracción de hipocampo.....	88
Figura 5: Diagrama de extracción de LPA a partir del tejido de hipocampo.....	89
Figura 6: Procedimiento de análisis de las especies de LPA mediante MALDI-TOF.....	92
Figura 7: Ejemplos de rectas de calibrado para cada estándar de LPA.....	94
Figura 8: Espectros para los estándares de las especies de LPA para la recta de calibrado.....	95
Figura 9: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos de la extracciones de tejidos inferior a 100 mg de hipocampo de ratón.....	96
Figura 10: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos de las extracciones de tejidos inferior a 100 mg de cerebro de hámster.....	97
Figura 11: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos de las extracciones de tejidos de cerebro de ratón superior a 100 mg.....	97
Figura 12: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidas de hipocampo de ratones.....	98
Figura 13: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos en 25 µl suero bovino fetal.....	98
Figura 14: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos en 25 µl suero de conejo.....	99
Figura 15: Espectros de las señales ruidos de las especies de LPA obtenidos en muestras de 25 µl de suero de tres ratones.....	99

Capítulo IV

Figura 16: Diseño experimental con estrés agudo.....	111
Figura 17: Laberinto elevado en cruz.....	105
Figura 18: Conductas analizadas durante la prueba de EPM.....	121
Figura 19: LPA hipocampal de ratones en condiciones basales.....	123
Figura 20: LPA en condiciones de estrés.....	125
Figura 21: Efectos de la ausencia del receptor LPA ₁ y de diferentes estresores agudos en las concentraciones y el perfil de LPA en el hipocampo.....	129
Figura 22: Concentración de corticosterona en suero.....	130

Capítulo V

Figura 23: Diseño experimental con estrés crónico y administración LPA.....	145
Figura 24: Efectos del estrés crónico en el LPA hipocampal.....	150
Figura 25: Efectos de la administración continuada de LPA 18:1 en el LPA hipocampal.....	152

Índice de Tablas

Introducción

Tabla 1: Categoría lipídica y ejemplos.....	32
Tabla 2: Diferentes especies de LPA.....	54

Capítulo IV

Tabla 3: Grupos experimentales.....	111
--	------------

Capítulo V

Tabla 4: Grupos experimentales.....	146
--	------------



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abreviaturas



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abreviaturas

AA: Ácido araquidónico	iPLA2: PLA2 intracelular
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico	Km: Constante cinética de Michaelis Menten
APCI: Ionización química por presión atmosférica	LisoPLD: Lisofosfolipasas tipo D
APPI: Fotoionización a presión	LCAT: Lecitina-colesterol aciltransferasa
ARNm : Ácido ribonucleico mensajero	LPA: Ácido lisofosfatídico
ATX: Autotaxina	LPAAT: LPA-aciltransferasa
CA3: Cuerno de Amón 3	LPA 16: 0: 1-palmitoil-LPA
CCF: Cromatografía Capa Fina.	LPA 18: 1: oleoil-LPA
CG: Cromatografía de gases	LPA 18: 2: 1-linoleil-LPA
CL: Cromatografía líquida	LPC: Ácido lisofosfatidilcolina
cPLA2: PLA2 citosólica	LPE: Ácido lisofosfatidiletanolamina
CRH: Hormona liberadora de corticotropina	LPI: Ácido lisofosfatidilinositol
DESI: Desorción con electrospray	LPS: Ácido lisofosdatidilserina
dhSM: Dihidrosfingomielina	MAG: Monoacilglicerol
ENPP: Ectonucleótido pirofosfatasa / fosfodiesterasa	MALDI: Desorción/Ionización mediante láser asistida por matriz
ESI: Ionización electrospray	MAPK: Proteína quinasa activada por Mitogenos
ERK1/2: Quinasas reguladas por señales extracelulares	NMDA: N-metil-D-aspartato
FST: Prueba de natación forzada	PA: Ácido fosfatídico
G3P: Gliceraldehído-3-fosfato	PAF: Factores activadores de plaquetas
HDL: Lipoproteínas de alta densidad	PAF-AH: Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa
HHHA: Hipotálamo-hipófisis-adrenal	PC: Ácido fosfatidilcolina
i.c.v: Intracerebroventricular	PCe: Éter fosfatidilcolina
IHC: (International Conference on Harmonisation)	PE: fosfatidiletanolamina

PI: Fosfatidilinositol

PFC: Corteza prefrontal

PLA1: Fosfolipasas tipo A1

PLA2: Fosfolipasa A2

PLD: Lisosfosfolipasas tipo D

PLs: Fosfolípidos

PPAR: receptores activadores de peroxisomas

PS: Ácido fosfatidilserina

PS-PLA1: Fosfolipasa específica del ácido fosfatidilserina

PUFA n-3: Ácidos grasos polinsaturados

P2Y: Receptores purinérgicos

SIMS: Espectrometría de masas de iones secundario

SANCO: Procedimientos de validación de métodos y control de calidad para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos

SM: Esfíngomielina

SNC: Sistema Nervioso Central

S1P: Esfingosina-1-fosfato

sPLA2: PLA2 secretora

sPLA2-IIA: Fosfolipasas secretoras del grupo II



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

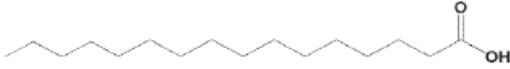
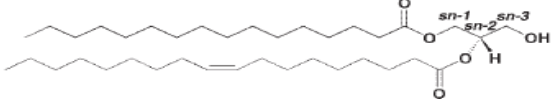
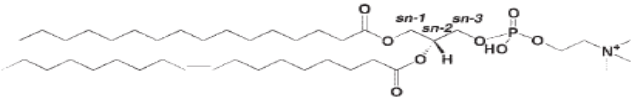
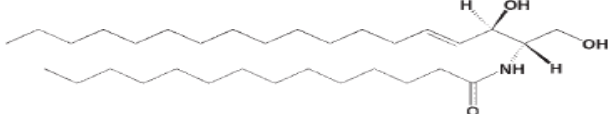


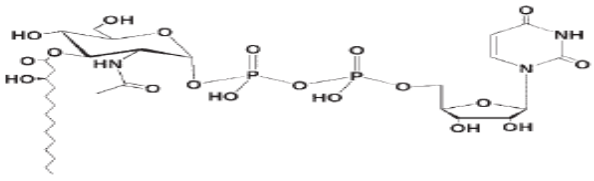


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. LÍPIDOS

Los lípidos son moléculas o compuestos de moléculas que presentan propiedades hidrofóbicas, es decir, se caracterizan por ser solubles en disolventes orgánicos y ser escasamente solubles en disolventes acuosos (Cammack et al., 2006). Estas biomoléculas, que presentan generalmente heterogeneidad, están formadas básicamente por cadenas de carbono, hidrógeno y, en menor proporción, oxígeno y pueden contener entre sus cadenas de carbono elementos como fósforo, nitrógeno y azufre. De esta manera, según sus propiedades químicas, los lípidos se podrían clasificar en grupos de ácidos grasos, fosfolípidos, esteroides, esfingolípidos, terpenos y otros (Christie, 2003). La clasificación de los lípidos no es tarea sencilla, teniendo en cuenta que son sustancias con carácter hidrofóbico o anfipático. Pueden originarse a partir de carbaniones, formados por la condensación de tioésteres (ácidos grasos, policétidos, etc...) y/ o por carbocationes, a partir de la condensación de unidades de isoprenos (dando lugar a prenoles, esteroides, entre otros), pudiéndose subdividir en grupos simples, donde el resultado de la hidrólisis de dicho lípido pueden ser dos productos (por ejemplo, ácidos grasos) o grupos complejos, cuando el resultado son más de tres productos (como los glicerofosfolípidos) (Fahy et al., 2005).

Varios estudios intentan clasificar y categorizar a los lípidos en 8 grupos que comprenden a los ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, prenoles, sacarolípidos y policétidos (Fahy et al., 2005, 2009; Knobloch, 2017) (tabla 1).

Clase	Ejemplo de lípidos
Acilos grasos	 <p style="text-align: center;">Ácido hexadecanóico</p>
Glicerolípidos	 <p style="text-align: center;">1-hexadecanoil-2-(9z-octadecanoil)-sn-glicerol</p>
Glicerofosfolípidos	 <p style="text-align: center;">1-hexadecanoil-2-(9z-octadecanoil)-sn-glicerol-3-fosfocolina</p>
Esfingolípidos	 <p style="text-align: center;">N-(tetradecanoil)-esfing-4-enino</p>
Esteroles	 <p style="text-align: center;">Colest-5-en-3β-ol</p>
Prenoles	 <p style="text-align: center;">2E,6E-farnesol</p>
Sacarolípidos	 <p style="text-align: center;">UDP-3-O-(3-R-hidroxitetradecanoil)-αD-N-acetilglucosamina</p>

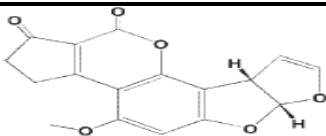
Policétidos	 <p>Aflatoxin B1</p>
--------------------	---

Tabla 1: Categorías lipídicas y ejemplos (modificada de Fahy et al., 2005).

1.1 Clasificación y categorización de lípidos

1.1.1 Acilos grasos

Los acilos grasos participan en la formación de lípidos con estructuras complejas, por ello, son fundamentales para los lípidos biológicos, puesto que cualquier variación en las cadenas de los ácidos grasos, ya sea en longitud o por la presencia de dobles enlaces, contribuirán en la modificaciones de las propiedades y/o en sus funciones (Fahy et al., 2005; Taguchi & Ishikawa, 2010). Dentro de los acilos grasos se encuentran las clases de ácidos grasos y conjugados, que se caracterizan por tener series repetidas de metileno, que le confieren propiedades hidrofóbicas, y un grupo de ácido carboxílico (Fahy et al., 2005). La longitud de sus cadenas de carbono es variable y puede contener dobles e incluso triples enlaces, además de heteroátomos de oxígeno, halógeno y nitrógeno que pueden unirse a los carbonos, originando subclases de lípidos (Fahy et al., 2005; Schick, 1987). Estas clases de lípidos no solamente se encuentran en la naturaleza en forma de cadenas lineales o cadenas formando bloque, sino que pueden encontrarse formando estructuras cíclicas con tres o seis anillos, como es el caso del ácido graso ciclopentil (Fahy et al., 2005). Según el número de carbonos de la cadena, el de heteroátomos y las ramificaciones se podrían definir distintas subclases de acilos grasos (Fahy et al., 2005).

1.1.2 Glicerolípidos

Los glicerolípidos se caracterizan por constituir lípidos con un grupo glicerol (propano 1, 2, 3 - triol, grupo alcohol con tres grupos hidroxilos) que pueden estar sustituidos en posiciones mono, di y tri unidos a cadenas de ácidos grasos, formando subclases denominadas acilogliceroles (Coleman & Lee, 2004; Stam, Schoonderwoerd, & Hülsmann, 1987) mediante el mecanismo de esterificación, formando lípidos saponificables. La unión del grupo glicerol a glúcidos da lugar a otra subclase de glicerolípidos denominada glicero glucolípidos mediante la vía del enlace glucosídico (Påhlsson et al., 2001). En general, la estructura de los glicerolípidos suele ser lineal, aunque también existen macrociclos de éster lipídicos que están presentes en membranas de arqueobacterias (Koga, Nishihara, Morii, & Akagawa-Matsushita, 1993).

1.1.3 Glicerofosfolípidos

Por su importancia, los glicerofosfolípidos se agrupan en una categoría distinta a la de los glicerolípidos, aunque presentan la misma estructura principal, un grupo glicerol trisustituído. Estos lípidos tienen propiedades que los hacen componentes esenciales para las células, puesto que presentan una parte de su estructura denominada “cabeza” con propiedades hidrofílicas y una cadena de hidrocarburos con carácter apolar, lo que permite la formación de bicapas necesarias para la formación de una célula (Peretó, López-García, & Moreira, 2004). Dependiendo de la naturaleza del grupo polar y de la posición que ocupa la alquilación dentro de la cadena del glicerol en sn-3 (en eucariotas y procariotas) o en sn-2 (en arqueobacterias), pueden aparecer diferentes subclases dentro de esta categoría (Fahy et al., 2005; Pereto et al., 2004). La formación de esta clase de lípidos se basa en la esterificación de dos cadenas de ácidos grasos al esqueleto de glicerol, quedando la posición libre unida a un grupo fosfato (por ejemplo, el ácido fosfático que se detallará en los siguientes puntos de la tesis).

Los glicerofosfolípidos, además de servir como un componente primario de la estructura de las membranas celulares y de los sitios de unión a proteínas intracelulares e intercelulares, pueden actuar en células eucariotas como precursores de, o ser ellos mismos, segundos mensajeros derivados de la membrana (por ejemplo, el ácido lisofosfático, que se caracteriza por ser un lípido señalizador) (Fahy et al., 2005). Por último, una subclase dentro de esta categoría denominada como glicerofosfolípidos oxidados, está compuesta por moléculas en las que una o más de las cadenas laterales se han oxidado. Además, se dispone de varias descripciones generales sobre la clasificación, nomenclatura, metabolismo y perfil de los glicerofosfolípidos (Cevc, Allen, & Neidleman, 1993; Coleman & Lee, 2004; Cronan, 2003).

1.1.4 Esfingolípidos

Los esfingolípidos son estructuras complejas formadas por una cadena considerada base y denominada esfingosina (1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno). Están constituidas por un compuesto de serina y una cadena de acilo graso, dando lugar a productos como ceramidas (unión de esfingosina y ácidos grasos), fosfoesfingolípidos, glucoesfingolípidos y otros incluyendo a derivados de proteínas (Taniguchi et. al., 2002).

La estructura de los esfingolípidos presenta variaciones lo que le confiere diferentes características y por ello, diferentes funciones significativas; como por ejemplo, las bases de esfingosinas que se encuentran en la dermis presentando grupos de hidroxilos adicionales, bien en la posición 4 (denominándose fitoceramidas) o bien en la posición 6 de la base de esfingosina, creando diferencias en las estructuras que permiten la interacción entre moléculas vecinas, lo que refuerza la permeabilidad de la barrera de la piel (Fahy et al., 2005). Existen también otras estructuras que son bases análogas a las esfingosinas, con largas cadenas de alquil unidas a grupo amino y grupos hidroxilos, que aunque presentan diferentes características, cumplen funciones

semejantes a esta categoría ya que presentan actividades como inhibidores o antagonistas (Fahy et al., 2005).

1.1.5 Lípidos Esteroles

Esta categoría de lípidos se subdivide según sus funciones biológicas. Dentro de esta clase, se encuentra el colesterol y sus derivados, que constituyen uno de los componentes principales de la membrana celular (Bach & Wachtel, 2003). Los esteroides que se caracterizan por la condensación de cuatro anillos, presentan funciones o roles diferentes tales como hormonas y moléculas de señalización (Tsai & O'Malley, 1994). Las diferentes subclases se presentan según el número de carbonos que forman los anillos condensados, permitiendo la formación de moléculas más complejas como los progestágenos, glucocorticoides o mineralocorticoides (que contienen 21 átomos), así como varias formas de la vitamina D (Jones, Strugnell & Deluca, 1998; Russell, 2003).

1.1.6 Lípidos Prenoles

Los prenoles son sintetizados a partir de los 5 carbonos obtenidos del difosfato de isopentenil y difosfato dimetilalilo a través de la vía del mecanismo del ácido mevalónico (Kuzuyama & Seto, 2003). Existen otras vías y mecanismos de síntesis a partir de precursores de isoprenoides que se forman mediante la unión de unidades de 5 carbonos sucesivas, clasificándose en números de terpenos. Dentro de este grupo se encuentran estructuras importantes como los precursores de la vitamina A (Demmig-Adams & Adams, 2002; Porter & Spurgeon, 1981), vitamina E y K, puesto que se encuentran compuestos de isoprenoides unidas a ubiquinonas e hidroquinonas (Meganathan, 2001; Ricciarelli, Zingg & Azzi, 2001). Las estructuras formadas por poliprenoles y sus derivados fosforilados participan en el transporte de los oligosacáridos a través de las membranas celulares (Fahy et al., 2005), ya que en el citoplasma celular, los azúcares de fosfatos

de poliprenol y los azúcares de difosfatos de poliprenol participan en reacciones de glicosilación (Raetz & Whitfield, 2002). En cambio, en el medio extracelular, participan en la biosíntesis de polisacáridos (Lazar & Walker, 2002).

1.1.7 Sacarolípidos

Los sacarolípidos son compuestos constituidos por la unión de ácidos grasos a una base estructural de azúcar, manteniéndose las propiedades que permiten interactuar con la bicapa de la membrana celular. Los más conocidos son los precursores de los lípidos A (componentes principales de la membrana Gram negativa de las bacterias) formados a partir de la acilación de la glucosamina (Raetz & Whitfield, 2002).

1.1.8. Policétidos

Los policétidos se sintetizan a través de enzimas clásicas, enzimas iterativas y multimodulares con sitios activos semiautónomos que comparten características mecánicas con las sintasas de ácidos grasos, incluida la participación de proteínas transportadoras de acilo; sin embargo, las policétido sintasas generan una diversidad mucho mayor de estructuras de productos naturales (Khosla et al., 1999; Walsh, 2004), muchas de las cuales tienen las mismas propiedades que los lípidos (Fahy et al., 2005). Las policétido sintasas de clase I, forman lactonas macrocíclicas restringidas, que varían típicamente en tamaño de 14 a 40 átomos, mientras que las policétidos sintasas de clase II y III generan sistemas complejos de anillos aromáticos (Khosla, Gokhale, Jacobsen, & Cane, 1999; Walsh, 2004).

Muchas de las estructuras denominadas policétidas o derivados son usadas como antimicrobianos, antiparásitos e incluso como agentes antitumorales (tetraciclinas, avermectinas, etc) (Fahy et al., 2005).

2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LÍPIDOS

Los avances en la tecnología aplicada al análisis de lípidos han facilitado la detección, identificación y determinación del perfil de especies lipídicas en tejidos y en suero. El lipidoma es el perfil y la cuantificación, a gran escala, de moléculas de lípidos biogénicos, que incluye un estudio exhaustivo de sus vías y una interpretación fisiológica basado en el análisis químico y en el estadístico (Watson, 2006; Wenk, 2005). Por lo que el lipidoma, no solo aporta información sobre las funciones fisiológicas de las moléculas de lípidos, sino que también ofrece un enfoque para descubrir biomarcadores importantes para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades, puesto que la obtención del análisis descriptivo de la composición lipídica puede proporcionar una base para una investigación adicional de la señalización celular y las vías metabólicas, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Rapple et al., 2009).

Los estudios recientes del lipidoma se basan principalmente en áreas que incluyen la identificación de nuevas moléculas lipídicas, en el desarrollo de métodos de cuantificación, en el análisis de vías metabólicas, además del mapeo del tejido alterado y de aprovechamientos bioinformáticos para el diseño molecular (Han, Yang, & Gross, 2012; Wang et al., 2016).

A continuación, se hará una revisión de las principales técnicas analíticas para la detención de lípidos, comentando las principales ventajas e inconvenientes de cada una de ellas.

2.1 Técnicas basadas en la espectrometría de masas aplicadas a estudios lipidómicos

Entre las técnicas basadas en espectrometría de masas aplicadas a estudios lipidómicos, las analíticas son actualmente las herramientas más ampliamente utilizadas y efectivas para determinar el perfil y la cuantificación de lípidos debido a la alta capacidad para el análisis

cualitativo y cuantitativo (Hu & Zhang, 2018). Estas técnicas permiten la identificación de lípidos en función del número total de carbonos, de dobles enlaces en sus cadenas de acilo y del peso molecular. El procedimiento llevado a cabo para el análisis de lípidos requiere una etapa pretratamiento de la muestra, de extracción de los lípidos y de análisis de los espectros obtenidos (Hu & Zhang, 2018). Los lípidos en disolución pueden ser analizados mediante sondas de introducción directa o por el acoplamiento de sistemas cromatográficos a los detectores de masas (técnicas analíticas hifenadas). Otra alternativa surge del análisis de lípidos en tejido o en muestras celulares donde se emplea la espectrometría de masas de imágenes (Yang & Han, 2016).

2.1.1 Sonda directa en espectrometría de masas

Es un método analítico que no necesita una separación previa de la muestra, por lo que la muestra se introduce directamente en el espectrómetro con la ayuda de un soporte o una sonda (compuesta por una bomba de jeringas). Esta técnica es rápida y reproducible en comparación con otros métodos; además, permite el análisis de pequeñas muestras (Hu & Zhang, 2018).

2.1.2 Espectrometría de masas acoplada a la cromatografía

Los métodos de análisis que implican una separación previa de la muestra extraída reducen el efecto de la matriz (posibles señales procedentes de sustancias diferentes al analito), permitiendo la separación de isómeros y mejorando la calidad de resolución de los lípidos a baja concentración. Estas técnicas se convierten en necesarias para un análisis extenso del lipidoma de muestras biológicas complejas. Las tecnologías más utilizadas para la separación son la cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía líquida, cromatografía líquida por exclusión y cromatografía de fluidos supercríticos (Hu & Zhang, 2018).

La cromatografía en capa fina (CCF) puede separar mezclas de lípidos en categorías lipídicas de forma más rápida y económica que la cromatografía líquida y la cromatografía de

gases. Sin embargo, este método no es adecuado para muestras pequeñas, ya que presenta baja eficacia en la separación y requiere de cantidades mayores de muestra en comparación con técnicas directas, en las que no se necesita separación previa al análisis. Por lo general, la CCF se puede acoplar a la espectroscopía de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) (Griesinger et al., 2014; Ruh et al., 2013).

En cuanto a la cromatografía de gases (CG), es una técnica separativa con una alta eficiencia adecuada para compuestos volátiles. Este método, acoplado a la espectroscopía de masas, es actualmente el usado para la determinación de acilos grasos y cuantificación de colesterol (Son et al., 2014; Zanfini et al., 2014). Sin embargo, su restricción respecto a los lípidos volátiles, limita su uso (Hu & Zhang, 2018).

La cromatografía líquida (CL) es el método de cromatografía más universal, se puede acoplar fácilmente a la espectrometría de masas y es adecuado para la separación de lípidos tanto volátiles como no volátiles. La técnica de HPLC (del inglés High Performance Liquid Chromatography, cromatografía líquida de alta eficacia) muestra una alta eficiencia de separación y selectividad), lo que la convierte en el método de separación más popular y ampliamente utilizado en lipidómica (Hu Ting 2018).

2.1.3 Espectroscopía de masas basada en imagen

La espectroscopía de masas basada en imagen es un método relativamente novedoso que proporciona la visualización y distribución individual de moléculas lipídicas en el tejido. Por ello, permite conocer la distribución de especies de lípidos individuales pudiendo así investigar diferentes procesos biológicos asociados a su distribución espacial (Hu & Zhang, 2018; Yang & Han, 2016). Este método es sensible, rápido y permite la detección de moléculas de pequeño tamaño (Trim & Snel, 2016).

2.2 Sistemas de ionización aplicados en espectrometría de masas en lipidómica

Existen varios sistemas que permiten la ionización de los lípidos con el objeto de determinar su carga, masa y estructura. En algunos casos, el proceso de ionización se hace

complicado en ciertos compuestos lipídicos, por lo que se emplean derivaciones con el fin de aumentar su efectividad iónica (Hu & Zhang, 2018; Yang & Han, 2016). Las técnicas de ionización más populares son Ionización por Electrospray (ESI, del inglés Electrospray Ionization), Desorción/Ionización láser asistida por matriz (MALDI, del inglés Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization), Ionización química por presión atmosférica (APCI, del inglés Atmospheric Pressure Chemical Ionization), Fotoionización a presión (APPI, del inglés Atmospheric Pressure Photoionization), Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS, del inglés Secondary Ion Mass Spectrometry) y Desorción con Electrospray (DESI, del inglés Desorption Electrospray Ionization) (Yang & Han, 2016).

2.2.1 Ionización por Electrospray (ESI)

Es una técnica de ionización suave, en la que se usa un electrospray producido por la aplicación de un campo eléctrico fuerte sobre un líquido que pasa a través de un tubo capilar, creando un aerosol fino a partir del cual se forman iones debido a las interacciones electrostáticas producidas en el proceso de desolvatación (Yang & Han, 2016). Una de las características más ventajosa de la ionización por electrospray es que se adapta fácilmente a la introducción directa de muestras desde HPLC y columnas de electroforesis capilar, puesto que las muestras tienen que ser previamente purificadas (aunque no siempre) (Skoog, Holler, & Crouch, 2007), por ello,

no es recomendada para mezclas de muestras. Al ser una ionización suave, es usada para muestras biológicas con carácter no covalente (Snyder, 1996).

2.2.2 Desorción/Ionización láser asistida por matriz (MALDI)

Consiste en una ionización suave que permite el análisis de moléculas grandes (por ejemplo, proteínas, lípidos y polímeros), siendo especialmente utilizado para imágenes en espectrometría de masas en muestras de tejidos o células. Esta técnica implica fijar analitos en una matriz que absorbe energía en la longitud de onda del láser. Se irradia el analito, desencadenando la ablación y desorción de los analitos y del material de la matriz, facilitado así su ionización (Yang & Han, 2016).

2.2.3 Ionización química por presión atmosférica (APCI)

Se produce por reacciones de moléculas de iones en fase gaseosa a presión atmosférica. El procedimiento de formación del spray es producido por una fuerte descarga en la fuente que produce un plasma de iones reactivos del disolvente que origina el mecanismo de ionización de la muestra por ionización química (CI), normalmente por adición o cesión de un protón. Este mecanismo, que coexiste con el de evaporación iónica, produce abundantes iones (M+H)⁺ positivos, y (M-H)⁻ negativos.

Esta técnica, junto al HPLC, permite el análisis de fármacos, pesticidas y trazas de esteroides (Bruins, 1991). Es aplicada para compuestos que son estables térmicamente y permite la ionización sin una gran fragmentación de las moléculas con tamaños menores a los 1500 Da (Dass, 2007).

2.2.4 Fotoionización a presión (APPI)

Se emplea en el análisis de compuestos que presentan dificultades de ionización por ESI y APCI. Esta técnica utiliza una lámpara de vacío-ultravioleta diseñada para la detección de fotoionización en cromatografía de gases como fuente de 10-eV fotones. La mezcla de muestras

y solvente, después de evaporarse completamente, se introduce en la región de fotoionización donde los fotoiones dopantes reaccionan hasta completarse con moléculas de analito y disolvente. Esto es debido a que la fuente de iones está a la presión atmosférica y la tasa de colisión es alta (Yang & Han, 2016).

2.2.5 Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)

Es la técnica analítica superficial de superficies más sensible, útil para proporcionar datos de composición elemental y estructural. Permite detectar pequeñas concentraciones de elementos y su distribución en profundidad. El proceso consiste en bombardear la superficie con un haz de iones primario enfocado (por ejemplo, iones de plata u oro) y recolectar los iones secundarios expulsados, que serán introducidos en un espectrómetro de masas para su análisis (Yang & Han, 2016).

2.2.6 Desorción con electrospray (DESI)

Consiste en la ionización ambiental, basada en la combinación de ESI y métodos de ionización de desorción. La ionización se produce por electropulverización cargada sobre la superficie de la muestra; las gotas cargadas eléctricamente y los iones producidos a partir del electrospray son dirigidos por un chorro de gas (*gas jet*) de alta velocidad a la muestra de interés, impactan sobre la superficie y el analito se disuelve en esas gotitas cargadas eléctricamente. Debido al impacto se generan iones de los componentes de la muestra, llamadas gotas secundarias, que son expulsadas de la superficie y recogidas en el tubo iónico de transferencia o en la entrada a presión atmosférica de un espectrómetro de masas (Yang & Han, 2016).

La técnica DESI acoplada a un espectrómetro de masas permite el muestreo, análisis y obtención de imágenes de moléculas de superficies biológicas en condiciones ambientales, además es aplicada a muestras como trazas de explosivos en equipaje, presencia de drogas en la orina o lípidos en tejido intacto (Cooks et al; 2006). Los métodos de ionización ambiental

conservan la ventaja de ser rápidos, con especificidad química y límites de detección bajos (Cooks et al., 2006).

3. LÍPIDOS Y SISTEMA NERVIOSO

Las funciones de los lípidos son indispensables para los organismos superiores. Su diversidad fisicoquímica refleja múltiples funciones a nivel celular, como la modulación de las propiedades químicas y mecánicas de las membranas, el transporte de proteínas, el funcionamiento de los canales iónicos y la comunicación entre células (Piomelli, Astarita, & Rapaka, 2007).

Los lípidos constituyen un componente básico de las membranas plasmáticas de todas las células, incluidas neuronas y células de la glía, componente celular mayoritario del sistema nervioso de mamíferos (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Taverna, Götz, & Huttner, 2014). Asimismo, son componentes integrales de los núcleos de todas las células (Ledeen & Wu, 2004). Clásicamente, se consideraba que su función en el núcleo celular era simplemente de apoyo estructural para la envoltura nuclear; sin embargo, este concepto ha cambiado drásticamente en las dos últimas décadas, tras determinar la presencia de lípidos en diversos dominios del nucleoplasma (Ledeen & Wu, 2004). Aunque ha habido relativamente pocas comparaciones sistemáticas de lípidos nucleares de diferentes tejidos y animales, parece que las propiedades y los mecanismos derivados son comunes, independientemente del origen celular (Ledeen & Wu, 2004).

Junto a su participación como elementos constitutivos de las membranas celulares, presentan una amplia variedad de funciones de señalización, muchas de ellas aún sin descubrir (Bieberich, 2012). Las propiedades de señalización de los lípidos bioactivos se expresan siguiendo diferentes mecanismos. Existen lípidos que actúan específicamente a través de receptores (como los endocannabinoides), otros pueden unirse a receptores y a dianas de proteínas intracelulares

(como la esfingosina-1-fosfato (S1P)) y otros pueden modificar al mismo tiempo al receptor y a la proteína de señalización, al unirse a ellas directamente, al afectar las estructuras de las balsas lipídicas (como la ceramida), consideradas zonas de las membranas plasmáticas que presentan una fluidez mucho menor a las de su entorno (Bieberich, 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, los lípidos de señalización se pueden clasificar en tres categorías: lípidos de señalización a través de receptores; lípidos que se unen a proteínas quinasas, fosfatasas y otras proteínas de señalización; y por último, lípidos que regulan las balsas lipídicas y las proteínas asociadas a las balsas (Bieberich, 2012). El ácido lisofosfatídico (LPA), es un ejemplo de lípido que actúa como ligando para receptores, al unirse tanto a receptores de membrana plasmática como a receptores nucleares, como el receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), un tipo de receptor que desempeña un papel clave en la regulación del metabolismo de los lípidos, la inflamación, el crecimiento y la diferenciación celular (Bieberich, 2012).

Los receptores nucleares activados por una amplia gama de ácidos grasos y sus derivados, constituyen los principales sensores transcripcionales de ácidos grasos (Poulsen, Siersbæk, & Mandrup, 2012). Esto está vinculado a la importancia de los ligandos lipídicos en las cascadas de señalización, como las involucradas en el mantenimiento de células madre neurales (Lingwood et al., 2010; Resh, 2016). Además, pueden servir como marcadores en proteínas, indicando su localización, e influir en las cascadas de señalización, como es el caso de la señalización vía hedgehog, involucrada en procesos de diferenciación celular (Resh, 2016). Por lo tanto, los lípidos juegan también un papel relevante en procesos que participan en la regulación de la neurogénesis tanto embrionaria como adulta (revisado en Knobloch, 2017). A través de este mecanismo y dado que varios estudios recientes revelan que la neurogénesis adulta juega un papel crucial en los procesos de aprendizaje, memoria y en numerosas enfermedades

neurodegenerativas y psiquiátricas (Boldrini et al., 2018; Christian, Song, & Ming, 2014; Kang et al., 2016; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Taverna et al., 2014; Terranova, Ogawa, & Kitamura, 2019), podría decirse que cambios a nivel lipídico podrían estar relacionados con alteraciones a nivel neurogénico, que a su vez podrían tener multitud de implicaciones neurobiológicas (Müller et al., 2015).

Así pues, los lípidos son consideradas moléculas de gran importancia en la función cerebral debido a que constituyen un componente estructural fundamental de las células, juegan un papel relevante como moléculas señalizadoras y poseen la capacidad de modular los procesos neurogénicos. Es a través de estas funciones por lo que además, pueden tener un papel importante en la regulación del comportamiento, las emociones y la cognición (Kang et al., 2016; Müller et al., 2015).

En general, y a modo de resumen, debido a las diversas funciones que ocupan las diferentes categorías de lípidos a nivel celular, hace que cualquier alteración en su composición afecte en gran medida al sistema nervioso. El correcto funcionamiento del sistema nervioso se debe también a las diversas propiedades que presentan los lípidos, en especial su papel como señalizador, por lo que disfunciones en el sistema lipídico cerebral puede tener repercusiones importantes desde el punto de vista de la psicopatología (Müller et al., 2015).

4. LÍPIDOS Y ESTRÉS

El estrés es una respuesta natural a los desafíos ambientales, sin embargo, la exposición prolongada al estrés desencadena efectos perjudiciales en la estructura y función del cerebro. Las implicaciones de estas alteraciones inducidas por el estrés son múltiples, con un impacto en el aprendizaje, la memoria, la toma de decisiones y la respuesta emocional (Cerqueira et al; 2007;

Dias-Ferreira et al., 2009; Pinto et al., 2015). El impacto de cualquier estresor dependerá de la percepción del individuo que se expone a él y esta percepción, con el nivel de participación emocional que lo acompañe, es crucial para determinar la respuesta neurohumoral al estrés (Agnati et al., 1991; Goldstein et al.; 1987).

La respuesta neurohumoral al estrés se caracteriza por una respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), que tiene como resultado un aumento en la liberación de glucocorticoides desde la corteza adrenal. Este aumento en la disponibilidad de glucocorticoides ha sido intensamente relacionado con la respuesta de afrontamiento al estrés (McEwen et al; 1999). La exposición al estrés, fundamentalmente si es de forma prolongada o a estresores heterotípicos, suele conllevar un aumento de los niveles de glucocorticoides, lo que puede provocar efectos perjudiciales en la estructura y función del cerebro (McEwen & Gianaros, 2011).

Así, en modelos animales, se ha observado que el estrés crónico, fundamentalmente incontrolable e impredecible, activa genes de expresión inmediata seguido por otros cambios rápidos, como la inducción de la expresión del ARNm de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular hipotalámico y del ARNm de la enzima tirosina hidroxilasa en el locus cerúleo (Makino, Smith, & Gold, 2002). Esto podría constituir el mecanismo desencadenante de numerosas alteraciones morfológicas que sufre un organismo expuesto a un estresor, fundamentalmente cambios en la homeostasis de las células de la glía (revisado en Lin et al; 2018) o en la reorganización dendrítica. Así, las dendritas sufren atrofia en las regiones del hipocampo, concretamente las dendritas apicales de la neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (Magariños & McEwen, 1995; revisado en McEwen, 2016). Además, las sinapsis pueden experimentar cambios y puede modificarse el destino celular durante el proceso

neurogénico (Liston et al., 2013; McEwen & Gianaros, 2011). Estos cambios pueden ser debidos a la desregulación del eje HHA, dado que la administración de glucocorticoides, mediante inyección diaria, imita la atrofia inducida por el estrés de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo. Además, un exceso de glucocorticoides puede conllevar un aumento de aminoácidos excitadores, jugando los receptores de NMDA un papel crítico (Watanabe, Gould, & McEwen, 1992). Por lo tanto, la liberación de glucocorticoides: cortisol en primates corticosterona en roedores, parece mediar, en una parte significativa, los efectos patológicos del estrés crónico.

A su vez, estos cambios estructurales se han asociado a alteraciones funcionales en regiones clave para la regulación emocional (revisado en McEwen, 2010), resultando especialmente dañados el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala (Lupien et al., 2009; Sousa & Almeida, 2012). En humanos, la remodelación de estas estructuras se ha vinculado con respuestas maladaptativas al estrés y al desarrollo de numerosos trastornos, tanto cognitivos como psicopatológicos, entre ellos, el desarrollo de ansiedad y de alteraciones del estado de ánimo (Sousa & Almeida, 2012).

En cuanto a los glucocorticoides, son hormonas procedentes del colesterol, por lo que derivan de lípidos, y generalmente están unidos a dos de los receptores intracelulares denominados receptores de mineralocorticoides y receptores de glucocorticoides, que se dimerizan con la unión del ligando y se translocan al núcleo, regulando la transcripción de genes (Sousa & Almeida, 2012). Debido a que los corticoides tienen mayor afinidad por el receptor de mineralocorticoides que por el de glucocorticoides, éste último solo se activa en presencia de niveles elevados de corticoides, como los desencadenados por el estrés crónico (Sousa, Cerqueira, & Almeida, 2008). A su vez, los glucocorticoides modulan la señalización de los

Capítulo I: Introducción

lípidos del cerebro a través de la estimulación de la fosfolipasa A2 (PLA2), una enzima lipídica clave que transforma a los fosfolípidos de la membrana en lisofosfolípidos y ácido araquidónico (AA), moléculas asociadas con procesos inflamatorios (Malcher-Lopes, Franco, & Tasker, 2008).

La determinación del lipidoma demuestra que los lípidos son susceptibles a los efectos del estrés, puesto que los perfiles lipídicos se encuentran alterados en las zonas más sensible al estrés, como es el hipocampo, la corteza prefrontal (PFC) y la amígdala (Miranda & Oliveira, 2015; Oliveira et al., 2016). El estrés crónico puede alterar la expresión de la enzima diacilglicerol lipasa α , por lo que modula los niveles de diacilglicerol y 2-araquidonoilglicerol en regiones cerebrales susceptibles al estrés (Patel et al; 2009) y conduce a un aumento de los niveles de ceramida en hipocampo de ratón (Gulbins et al., 2013) y en PFC (Oliveira et al., 2016). Además, en la zona PFC ocurre una disminución de esfingomielina (SM), dihidrosfingomielina (dhSM), fosfatidiletanolamina (PE) y éter fosfatidilcolina (PCe), con un aumento en el nivel de lisofosfatidiletanolamina (LPE) (Oliveira et al., 2016). El estrés también provoca un aumento de los fosfolípidos y diacilgliceroles con cadenas de 38 carbonos, en el hipocampo, mientras que dichas cadenas disminuyen en la zona del PFC (Oliveira et al., 2016).

En definitiva, el estrés puede alterar el correcto funcionamiento del eje HHA, provocando el aumento de los niveles de glucocorticoides y la alteración del lipidoma en las zonas involucradas en la regulación de los efectos del estrés. Existe una correlación entre los niveles de algunas especies lipídicas y los niveles de corticosterona en sangre (Oliveira et al., 2016), indicando que existe una relación entre el estrés y las variaciones en los perfiles de lípidos.

5. LÍPIDOS Y PSICOPATOLOGÍAS

Durante décadas, los lípidos han sido ignorados y descartados en el estudio de los factores involucrados en la regulación del comportamiento, sin embargo, el rol que ocupan en la función neuronal, está comenzando a recibir una atención creciente, cuya desregulación podría ser la causa de ciertas enfermedades (Schwarz et al., 2008).

En este sentido, se ha demostrado que las anomalías lipídicas pueden estar involucradas en numerosas enfermedades neurológicas. Puesto que más de la mitad del peso del cerebro está compuesto por sustancias lipídicas (Schwarz et al., 2008), alteraciones en el metabolismo de los fosfolípidos y ácidos grasos de membrana, podrían explicar muchas de las características patológicas que suceden en enfermedades neurodegenerativas (Piomelli et al., 2007; Schwz et al., 2008). Por otro lado, entre los problemas neuropsiquiátricos que se han relacionado con alteraciones de los lípidos cerebrales, se han incluido la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Schwarz et al., 2008). Además, se han identificado cambios en lípidos en pacientes con depresión (Brunkhorst-Kanaan et al., 2019; Lin, Herr, & Chun, 2010) y con ansiedad (Mühle et al., 2013; 2019). En este sentido, los modelos actuales suponen que las disfunciones en las proteínas neuronales y las actividades peptídicas son las causas principales de estos trastornos (Müller et al., 2015). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los lípidos del cerebro determinan la localización y función de las proteínas en la membrana celular y, al hacerlo, regulan el rendimiento sináptico en las neuronas (Brown & Murphy, 2009; Müller et al., 2015). También, pueden transmitir señales desde la membrana a los compartimentos intracelulares, actuando como segundos mensajeros (Revisado en Müller et al., 2015) o extracelularmente a otras células (Balla, 2013). Cambios en la composición lipídica del cerebro pueden inducir también

Capítulo I: Introducción

modificaciones en el sistema monoaminérgico, consistentemente implicado en los trastornos del estado de ánimo y de tipo ansioso (revisado en Müller et al., 2015).

Por tanto, los lípidos de membrana, que actúan como barrera y como medio para la transmisión de señales, contribuyen a la aparición de numerosos trastornos psicopatológicos (Müller et al., 2015). Así, los hallazgos preclínicos han sugerido un papel crucial para los ácidos grasos poliinsaturados, glicerolípidos, glicerofosfolípidos y esfingolípidos n-3 constituyentes de membrana que están involucrados en conductas relacionadas con la depresión y la ansiedad (Müller et al., 2015). Además, cada tipo de lípido se ha vinculado de forma específica a estos trastornos. Así, los glicerolípidos actúan en el control de los comportamientos relacionados con la ansiedad, mientras que los glicerofosfolípidos parecen estar involucrados para la acción terapéutica de los fármacos antidepresivos (Lee et al., 2009). En cambio, los esfingolípidos están relacionados con la depresión y la ansiedad y con la acción de numerosos fármacos antidepresivos conocidos como la amitriptilina o la fluoxetina (Gulbins et al., 2013). En particular, dentro del grupo de los esfingolípidos, las ceramidas se han vinculado con numerosos marcadores patológicos del trastorno depresivo, como la reducción de la neurogénesis, el aumento del riesgo cardiovascular, el aumento de la inflamación y el estrés oxidativo, por lo que estos lípidos podrían constituir una buena diana terapéutica para la acción de los fármacos antidepresivos (Gulbins et al., 2013). Además, se ha determinado que la falta de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA n-3) en el cerebro durante largos períodos de tiempo puede inducir conductas asociadas con la depresión y la ansiedad (Carrié et al; 2000; DeMar et al., 2006). Sin embargo, un aumento en el suministro de PUFA n-3 puede reducir el comportamiento relacionado con la depresión y la ansiedad en organismos normales y también atenuarlos en condiciones patológicas (Francès et al., 2000). La evidencia clínica apoya la hipótesis de que los sujetos con depresión diagnosticada podrían beneficiarse de la administración de PUFA n-3 (Müller et al., 2015). Por todo lo expuesto anteriormente, y debido a las evidencias de la



Capítulo I: Introducción

participación de los lípidos en la depresión, se ha propuesto incluso una hipótesis fosfolipídica de la depresión (Horrobin & Bennett, 1999).

Por otro lado, se ha demostrado que tanto en los trastornos que cursan con ansiedad como con depresión, se produce una alteración del sistema neuroendocrino del estrés (Boyer, 2000), que altera la composición lipídica del cerebro (Oliveira et al., 2016). Alteraciones en la composición lipídica del cerebro pueden reducir los niveles del factor de crecimiento nervioso (BDNF, del inglés brain-derived nerve growth factor), así como inducir cambios proinflamatorios (Sinclair et al., 2007), lo que a su vez puede tener repercusiones en la neurogénesis. Esto podría provocar alteraciones funcionales y morfológicas en varias regiones del cerebro como el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala (Lupien et al., 2009; Pedraza et al., 2014; Sousa & Almeida, 2012), que son fundamentales en la regulación emocional (Krishnan & Nestler, 2008). Dado que el estrés prolongado es el principal factor ambiental en la etiología de la depresión (Hill et al., 2012), y puesto que los lípidos se ven afectados por el estrés, tal como se ha descrito en el apartado anterior, alteraciones en el contenido lipídico en regiones responsables de la regulación emocional pueden ser uno de los substratos responsables de la aparición de depresión desencadenada por estrés.

En resumen, aunque el paisaje lipídico del cerebro es complejo y altamente dinámico, las clases específicas de lípidos parecen estar directamente involucradas en la depresión y los trastornos de ansiedad. Los mecanismos responsables de ello están empezando a dilucidarse.

Así, los lípidos están implicados en la modulación del sistema monoaminérgico, sin descartarse su participación en otros sistemas de neurotransmisión, pueden regular el equilibrio inflamatorio del cerebro, influir en la producción de factores de crecimiento, fundamentalmente BDNF, lo que a su vez puede tener repercusiones en la neurogénesis, entre otros procesos. Los lípidos pueden ser, por tanto, una nueva diana neurobiológica para la prevención y el tratamiento de numerosos trastornos psicopatológicos, fundamentalmente la ansiedad y la depresión.

6. ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO

El ácido lisofosfatídico (1-acil-2-hidroxi-snglicero-3-fosfato; LPA) es un fosfolípido simple, bioactivo, que se clasifica dentro de la categoría de los glicerofosfolípidos. Presenta un esqueleto de glicerol al que se une una cadena de ácido graso y un grupo fosfato libre. La mayoría de los ácidos grasos de LPA son cadenas largas saturadas (C18:0, C16:0) o insaturadas (C18:1, C18:2, C20:4) unidas al esqueleto de glicerol por el grupo acilo o alquilo (Pagès et al., 2001) (tabla 2), siendo las formas de LPA más abundantes el 1-oleoil-LPA (LPA 18: 1), el 1-palmitoil-LPA (LPA 16:0) y el 1-linoleil-LPA (LPA 18:2) (Sano et al., 2002).

El LPA pertenece a una familia de sustancias lipídicas endógenas dotadas de una serie de acciones biológicas que a menudo están mediadas a través de interacciones de alta afinidad con receptores situados en la membrana plasmática o con proteínas intracelulares (Tigyi, 2010). Es decir, actúa fundamentalmente a través de receptores acoplados a proteínas G, habiéndose descrito 6 subtipos (LPA1-6) (Choi et al., 2010, 2013; Kihara, Mizuno, & Chun, 2015), aunque también se han descubierto dos receptores adicionales (GPR87 y P2Y10) (Tabata et al., 2007; Oka et al., 2010), así como receptores intracelulares (Tigyi, 2010). Los receptores de membrana se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del sistema cardiovascular, sistema inmunológico, intestino, pulmón, órganos endocrinos y sistema nervioso (Choi et al., 2010, 2013). La señalización mediada por LPA, a través de sus receptores específicos, presentes en la superficie celular induce diversas respuestas tanto *in vivo* como *in vitro* en agregación de plaquetas (Simon, Chap, & Douste-Blazy, 1984), contracción de las células del músculo liso (Tokumura et al., 1980), en diversos procesos fisiológicos del desarrollo cerebral y vascular (Estivill-Torres et al., 2008), en la respuesta inmune (Yuan et al., 2003), en el metabolismo óseo (Hurst-Kennedy et al., 2010) y en la proliferación celular (van Corven et al., 1989).

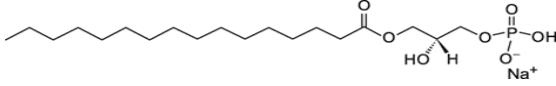
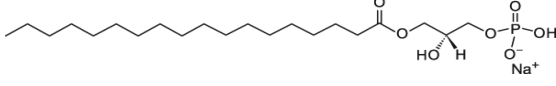
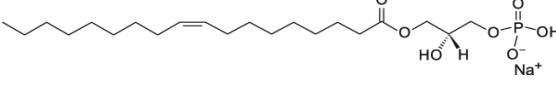
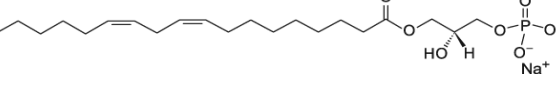

Especie de LPA	Estructura molecular
C16:0	
C18:0	
C18:1	
C18:2	
C20:4	

Tabla 2: Diferentes especies de LPA (extraídas de <https://avantilipids.com>)

6.1 Mecanismos de biosíntesis de LPA

La biosíntesis de LPA tiene lugar mediante reacciones enzimáticas que ocurren en medios intracelulares y extracelulares, usando a los glicerofosfolípidos como precursores para la producción de las diferentes especies de LPA. Estos compuestos precursores, están formados por

una molécula de alcohol (glicerol o esfingosina), a la que se unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo de átomos, que generalmente contienen nitrógeno, como colina, serina o etanolamina y muchas veces posee carga eléctrica. Los fosfolípidos más abundantes son la fosfatidiletanolamina (o cefalina, PE), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilcolina (o lecitina, PC) y fosfatidilserina (PS). A continuación, se detallan los mecanismos que dan a lugar a la producción de LPA en medio extracelular para posteriormente, indicar los mecanismos intracelulares implicados en su producción (Figura 1).

6.1.1 Producción de LPA en suero/plasma

La principal fuente de LPA en suero y plasma son los lisofosfolípidos. Existen diferentes vías de producción basadas en dos mecanismos consecutivos con dos rutas posibles (Sano et al., 2002; Aoki, 2004). En una de las rutas, el primer mecanismo consiste en la producción de especies de lisofosfolípidos, a partir de fosfolípidos, mediante la actuación de las enzimas fosfolipasas tipo A1 (PLA1) y A2 (PLA2), seguidamente las enzimas lisofosfolipasas tipo D (PLD) convierten a los lisofosfolípidos en especies de LPA. En cambio, en la segunda ruta posible, primero tiene lugar las actividades PLD, seguidas de las actividades de PLA1/PLA2 (Aoki, 2004), dando lugar a las especies de LPA.

Existen diferentes isoenzimas encargadas de la actividad catalítica en la biosíntesis de LPA, éstas son PLA2 citosólica (cPLA2), PLA2 intracelular (iPLA2), lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), varias isoformas del factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH) y PLA2 secretora (sPLA2) y secretora de grupo II. Además, la expresión de cada isoenzima sPLA2 es específica de cada especie animal (Makoto Murakami & Kudo, 2002), por lo que la contribución de cada isoenzima PLA2 a la producción de LPA debe examinarse cuidadosamente dependiendo de cada especie. Las isoenzimas PLA1 (Richmond & Smith, 2011) y otros tipos de fosfolipasas, también se expresan de una manera específica en cada especie (Aoki, 2004). Entre

los diferentes tipos de fosfolipasas, las isoenzimas PLA1 producen mayormente LPA con cadenas de ácidos grasos insaturados, mientras que las isoenzimas PLA2 producen fundamentalmente especies con LPA con ácidos grasos saturados (Aoki, 2004). Las especies de LPA con cadenas saturadas (16:0, 18:0) e insaturadas (16:1, 18:1, 18:2, 20:4) presentan diferentes actividades biológicas, lo que implica que son reconocidas por diferentes receptores de LPA (revisado en Aikawa et al., 2015).

6.1.1.1 Lisofosfolípidos como precursores de LPA

La mayor parte de la síntesis de LPA se produce desde los lisofosfolípidos (LPLs) generados a partir de fosfolípidos (PLs) de membrana, mediante la activación de enzimas fosfolipasas secretoras del grupo II (sPLA2-IIA) o fosfolipasas específicas de la fosfatidilserina (PS-PLA1) presentes en plaquetas, y seguidas por la actuación de lisofosfolipasas tipo D (lisoPLD) para producir LPA (Aoki, 2004; Aoki, Inoue, & Okudaira, 2008). La lisoPLD se detecta en plasma y suero en una amplia variedad de especies de mamíferos, incluidas ratas, ratones, bovinos y humanos (Tokumura et al., 1998; 1999). Para el funcionamiento de las enzimas lisoPLD se requiere la presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Aoki et al., 2004).

La enzima lisoPLD actúa sobre LPLs como ácido lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilserina (LPS), lisofosfatidilinositol (LPI), y de factores activadores de plaquetas (PAF, lisoPAF) (Aoki et al., 2002; Aoki, 2004), dando lugar a la producción de LPA y alquil-LPA. La lisoPLD no actúa sobre la fosfatidilcolina (PC), ni sobre otros diacilfosfolípidos, puesto que es específica de las especies liso (Umezu-Goto et al., 2002). La actividad de la lisoPLD es muy sensible a cambios biológicos; por ejemplo, se altera drásticamente en el embarazo, indicando un papel potencial del enzima tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Tokumura et al., 2002; Aoki, 2004; Black et al., 2004) .

Una de las enzimas con actividad de LisoPLD y específica de las especies de LPC es la enzima denominada autotaxina (ATX). La ATX es miembro de la familia ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP) (Bollen et al., 2000). Esta familia de ENPP posee siete ectoenzimas relacionadas estructuralmente que hidrolizan los enlaces pirofosfato y fosfodiéster en nucleótidos y sus derivados (van Meeteren et al., 2006; Houben & Moolenaar, 2011). La ATX es la única enzima con actividad lisoPLD dentro de la familia ENPP. Se sintetiza como una proenzima, procesada por una proteasa de tipo furina y secretada a lo largo de la vía secretora clásica como una proteína glicosilada en el medio extracelular (Stefan, Jansen, & Bollen, 2005; Houben & Moolenaar, 2011).

La ATX es específica en hidrolizar LPC en LPA y colina (Albers et al., 2010), por lo que presenta una alta afinidad por la LPC en comparación con el sustrato nucleósido (para el que se ha encontrado una K_m superior) (Umezú-Goto et al., 2002). Además, las LPC en plasma están presentes en mayores cantidades que los nucleósidos, como por ejemplo el ATP, esto sugiere que la LPC sirve como un sustrato fisiológicamente relevante para ATX (Aoki et al., 2002). Aunque la ATX no posee ninguna homología estructural con las fosfolipasas caracterizadas previamente, guarda semejanza con ellas al no hidrolizar la PC con dos cadenas largas de acilo y ser selectiva para la forma “liso” de fosfolípidos (Aoki, 2004) (figura 1). Además, la ATX con su actividad semejante a la lisoPLD, también estimula la motilidad celular a través de la producción de LPA (Tokumura et al., 2002; Umezú-Goto et al., 2002).

6.1.1.2 Producción de LPA por la acción secuencial de LCAT y lisoPLD

La lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) es una enzima soluble que convierte el colesterol y las fosfatidilcolinas (lecitinas) en ésteres de colesterol y lisofosfatidilcolinas en la superficie de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Jonas, 2000). La reacción tiene lugar en

múltiples etapas en la superficie de las HDL. Así, involucra la unión interfacial, la activación, la unión a PC, la formación de enzima acilo, la liberación de LPC, la unión a colesterol y la liberación de éster y enzima colessterilo. Aunque dichas reacciones son favorables, existe también reversibilidad de las reacciones, dando lugar a los compuestos precursores. Por lo tanto, la PC puede formarse a partir de LPC mediante la transesterificación de la cadena acilo sn-2 (Subbaiah et al., 1980). Esta reacción es especialmente significativa en lipoproteínas de baja densidad (LDL), que contiene niveles sustanciales de LPC (Liu & Subbaiah, 1993). La regeneración de PC a partir de un éster de colesterol y LPC es posible, en principio, pero no es probable que sea importante en condiciones fisiológicas normales (Jonas, 2000). Después de la actuación de la LCAT, intervienen LisoPLD/ATX dando lugar a las moléculas de LPA (Figura 1).

6.1.1.3 Conversión de PA en LPA a través de plaquetas activas

Las enzimas sPLA2-IIA o mPA-PLA1 presentes en las plaquetas activadas facilitan la conversión del ácido fosfatídico (PA) en LPA. Así, mediante una reacción de hidrólisis se libera el grupo acilo perteneciente a una de las cadenas, produciendo por lo tanto el LPA. Esta vía de síntesis presenta contribuciones menores a la producción de LPA en suero en condiciones fisiológicas. Sin embargo, produce LPA rápidamente y puede tener un papel relevante en condiciones patológicas (Aoki, 2004).

6.1.2 Producción de LPA a nivel intracelular

A nivel intracelular, el LPA puede ser sintetizado a partir de fosfolípidos y triacilglicerol. Esta producción de LPA, que tiene lugar por acilación del glicerol-3-fosfato (G3P) y la acil-coenzima A, es llevada a cabo por la enzima glicerolfosfato aciltransferasa (GPAT) y a partir de la fosforilización del monoacilglicerol (MAG) por la enzima monoacilglicerol quinasa (MAG-Kinasa) (Aoki, 2004; Aoki et al., 2008; Bektas et al., 2005). Por último, la reducción del acilhidroxiacetona fosfato en peroxisomas también contribuye a la producción de LPA (Pagès et

al., 2001). Esta producción de LPA tiene lugar intracelularmente en el retículo endoplasmático o en las mitocondrias. También se produce en organismos simples, en los que no se observan acciones extracelulares de LPA (Pagès et al., 2001). El LPA producido a través de esta vía no se considera involucrado en la señalización extracelular de LPA (Aoki, 2004) y se cree que el LPA sintetizado intracelularmente puede actuar como intermediario para la biosíntesis de otros fosfolípidos, no tanto como mensajero extracelular (Okudaira, Yukiura, & Aoki, 2010). Además de estas vías de síntesis, también es posible la síntesis de LPA mediante las actividades PLA1 o PLA2, disponibles en el medio citosólico o en la membrana celular, a partir de fosfolípidos como PA (Aoki et al., 2008; Yung, Stoddard, & Chun, 2014).

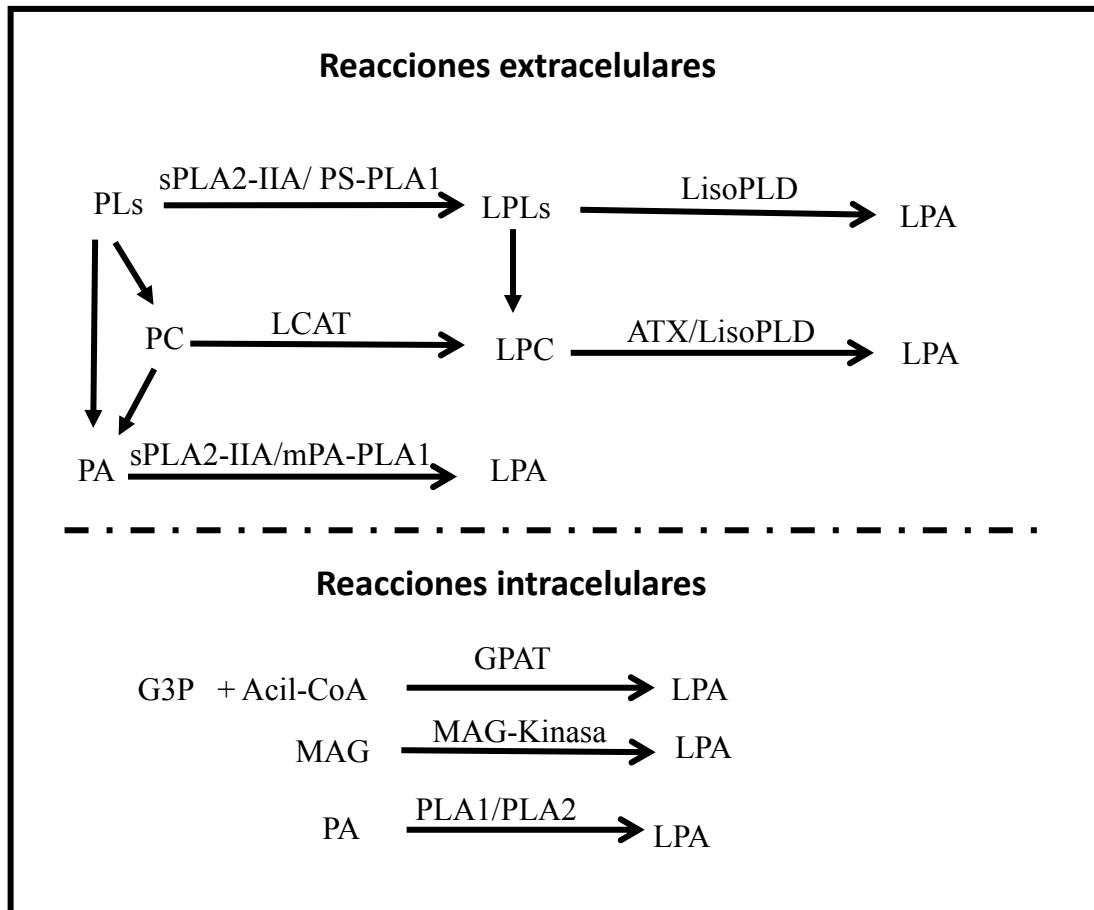


Figura 1: Diferentes vías de producción de LPA en medio extracelular e intracelular.

6.2 Metabolización de LPA

Para la síntesis de LPA, tanto a nivel intracelular como extracelular, se necesitan proteínas de unión que eviten la toxicidad y/o que faciliten el transporte desde el plasma a la célula o a un orgánulo específico. En medio extracelular, debido a la gran afinidad por el LPA, la albúmina constituye su principal proteína de unión (Thumser, Voysey & Wilton, 1994). Por otro lado, en el medio intracelular, el LPA se une con alta afinidad a proteínas de unión a ácidos grasos, lo que permite el transporte de LPA mitocondrial a los microsomas para ser convertidos en PA (Vancura & Haldar, 1992). La gelsolina es otra proteína que también cumple la función de transportador de LPA (Meerschaert et al., 1998; Pagès et al., 2001).

La metabolización o degradación de LPA (ver Figura 2) puede tener lugar mediante la actividad de la LPA-aciltransferasa (LPAAT), convirtiéndose en PA. Esta enzima dependiente del AMPc, está localizada en los microsomas y membranas plasmáticas y es importante para la síntesis de nuevos lípidos (Pagès et al., 2001). También, y a través de la actividad de la enzima fosfatidato fosfohidrolasa (PAP), el LPA es desfosforilado rápidamente a monoacilglicerol (MAG) (van der Bend et al., 1992), con lo que disminuye su presencia a nivel extracelular, provocando la reducción de su actividad biológica (Jasinska et al., 1999). Por último, el LPA puede ser hidrolizado y convertido en gliceraldehído-3-fosfato (G3P) mediante la actividad de la enzima lisofosfolipasa, que desempeña una función importante controlando el nivel de LPA disponible (Wang & Dennis, 1999).

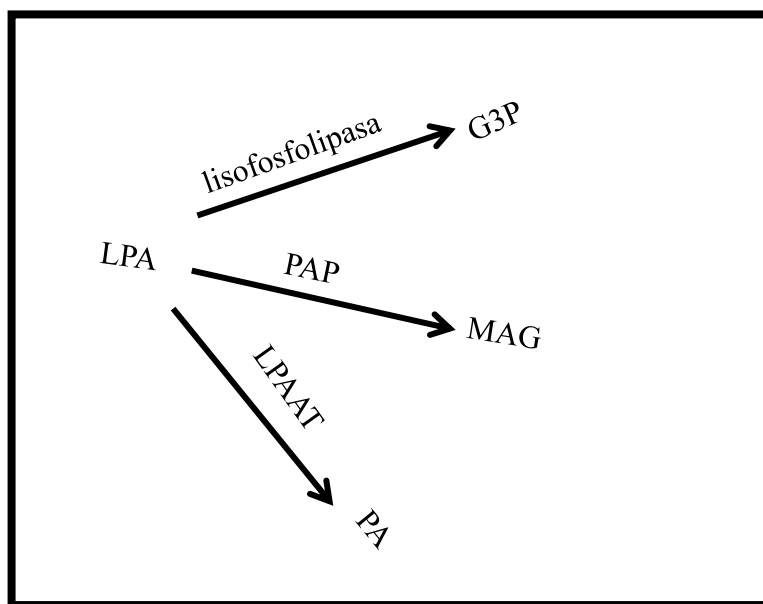


Figura 2: Diferentes mecanismos de degradación de LPA.

7. LPA Y SISTEMA NERVIOSO

Como anteriormente se ha comentado, el LPA es una importante molécula señalizadora que se encuentra distribuida por todo el organismo, incluido el sistema nervioso, donde actúa en numerosos procesos celulares. Estas acciones biológicas las realiza actuando fundamentalmente a través de sus receptores específicos (Choi & Chun, 2013; Noguchi et al., 2009) (Figura 3).

Hasta la actualidad, se han identificado ocho receptores, de los cuales seis pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, (LPA1-LPA6), estando cada uno de ellos acoplados a una o más proteínas heterodiméricas de la subunidad proteica $G\alpha$ ($G_{12/13}$, $G_{q/11}$, $G_{i/o}$ y G_s) (Yung, Stoddard, & Chun, 2014b; revisada Yung et al., 2015). Adicionalmente a los receptores acoplados a proteínas G, se han identificado dos receptores más (GPCR y P2Y10) que parecen que responden al LPA (Murakami et al., 2008; Tabata et al., 2007). Esta diversidad de receptores resulta en la activación de numerosas cascadas de señalización, permitiendo que el LPA pueda participar en diferentes procesos biológicos (Choi et al., 2010). Entre ellos se incluye la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular (Anliker & Chun, 2004;

Birgbauer & Chun, 2006; Choi et al., 2010; Chun et al., 2010; Ishii et al., 2004; Noguchi et al., 2009; Rivera & Chun, 2006), contribuyendo al desarrollo del sistema nervioso. Además, está involucrado en la sinapsis neuronal (Trimbuch et al., 2009) y en la respuesta inmunológica (Yukiura et al., 2011), entre otras. Todo ello puede tener repercusiones conductuales, implicando al LPA en numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Revisado en Yung et al., 2015).

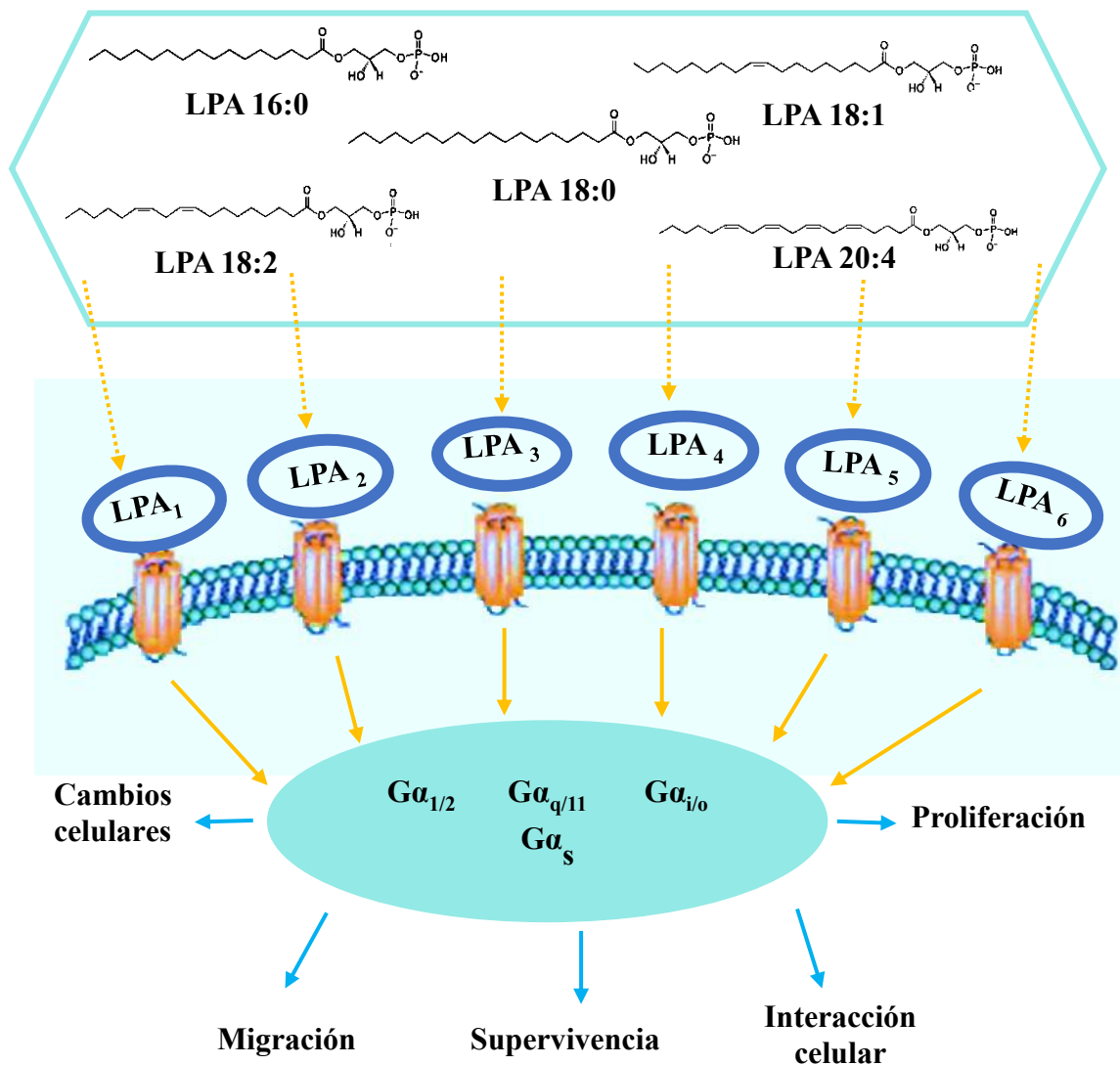


Figura 3: Incidencia de distintas especies de LPA sobre distintos receptores de LPA. Las diferentes especies de LPA inciden sobre los distintos tipos de receptores de LPA activando cascadas de señalización implicadas en el control de diversos procesos biológicos.

Capítulo I: Introducción

Son muchas las evidencias que apoyan un papel de LPA en la regulación de la neurogénesis. En este sentido, se expresa con una alta especificidad en células precursoras neuronales tipo 1 y tipo 2 a en el hipocampo (*in vivo*). Esto hace que pueda ser usado como un marcador específico de este tipo celular (Walker et al., 2016). Además, la administración prolongada de LPA parece incrementar la neurogénesis (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2018, Rosell del Valle (tesis doctoral)). En cambio, la ausencia de receptor LPA₁ afecta tanto la proliferación como la maduración de las nuevas neuronas hipocampales (Matas-Rico et al., 2008). Por todo ello, es posible afirmar que el LPA, fundamentalmente a través del receptor LPA₁, está involucrado en diversos procesos neurogénicos (Choi & Chun, 2013; Estivill-Torrus et al., 2008; García-Díaz et al., 2015; Noguchi et al., 2009).

Asimismo, parece que, a través de sus receptores específicos, el LPA puede estar involucrado en la modulación de numerosos sistemas de neurotransmisión. Entre ellos, el sistema serotoninérgico. Así, los animales carentes del receptor LPA₁ presentan un importante déficit en la producción de serotonina, en numerosas áreas cerebrales como la corteza frontal, el hipocampo, el hipotálamo y el núcleo accumbens, entre otras y, en cambio, presentan un incremento en los niveles de este neurotransmisor en el estriado (Harrison et al., 2013).

Por otro lado, tanto estudios con animales que no expresan receptores para LPA, fundamentalmente el receptor LPA₁, así como mediante aproximaciones farmacológicas, han puesto de manifiesto que el LPA está involucrado en la regulación de la neurotransmisión tanto excitatoria (Blanco et al., 2012; Musazzi et al., 2011; Peñalver et al., 2017) como inhibitoria (Cunningham et al., 2006; Rosell-Valle et al., datos no publicados). En este sentido, la administración de LPA induce una depresión rápida y reversible de las corrientes postsinápticas excitatorias (García-Morales et al., 2015), y en cambio produce una depresión de la transmisión GABAérgica, mediante la desfosforilación de GABA_Aγ₂ (García-Morales et al., 2015).

En resumen, el LPA, actuando a través de receptores específicos, puede tener un papel relevante en la regulación de numerosas funciones en el sistema nervioso.

7.1 Tipos de receptores de LPA

7.1.1 El receptor LPA_1

El receptor LPA_1 fue el primer receptor identificado para el LPA (Hecht et al., 1996) y el mejor estudiado hasta el momento. Su expresión genética en ratones es denominada *Lpral* y en humano *LPAR1*. Está ampliamente distribuido por todo el organismo (An et al., 1998). Así, en ratones, se ha observado que se expresa en testículos, pulmones, corazón, intestino, bazo, riñón, timo, estómago y en el sistema nervioso (Contos et al., 2000). En humanos, se expresa de manera similar en muchos órganos, incluidos cerebro, corazón, colon, intestino delgado, placenta, próstata, ovario, páncreas, testículos, bazo, músculo esquelético y riñón (An et al., 1998). En ratones, su expresión ha sido estudiada exhaustivamente durante el desarrollo embrionario (Ohuchi et al., 2008). Después del nacimiento, en el sistema nervioso, está presente en oligodendrocitos y células de Schwann, estando involucrado en el proceso de mielinización tanto en el SNC como en el periférico (Weiner, Hecht, & Chun, 1998; Weiner & Chun, 1999). En el cerebro de ratones adultos se expresa en células precursoras neurales del giro dentado (DG) (Allard et al., 1998; Pilpel & Segal, 2006; Tabuchi et al., 2000), empleándose como un marcador funcional de neurogénesis hipocampal adulta (Walker et al., 2016).

Su activación induce respuestas celulares a través de las vías de señalización de la proteína MAPK, fosfolipasa C, Akt, Rho, e inhibición de la adenilciclase (revisado en Choi et al., 2010). 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 (Choi et al., 2010; Fukushima et al., 2001).

Capítulo I: Introducción

Muchas de las funciones nerviosas atribuidas a este receptor han sido posibles gracias al uso de un modelo knockout para el mismo. Así, se ha puesto de manifiesto que los ratones nulos que carecen de forma constitutiva del receptor LPA₁, presentan defectos en el desarrollo cortical, una reducción en las poblaciones proliferativas, maduración prematura de las células neuroprogenitoras, un aumento de la apoptosis (Estivill-Torrús et al., 2008) y una reducción notable en la neurogénesis hipocampal adulta (Matas-Rico et al., 2008a). Además, los ratones nulos para este receptor, presentan numerosas alteraciones de comportamiento, entre ellas problemas de memoria (Santín et al., 2000); Castilla-Ortega et al., 2011); un perfil ansioso (Santín et al., 2009; Moreno-Fernández et al., 2017); mayor vulnerabilidad a los efectos negativos del estrés (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012); alteraciones en la regulación emocional (Pedraza et al., 2014) y un fenotipo depresivo con rasgos ansiosos (con anhedonia, desesperanza, agitación y una mayor reactividad al estrés (Moreno-Fernández et al., 2017). Además, presentan alteraciones en el sistema neuroendocrino del estrés, con una respuesta exagerada del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal ante un estresor agudo (Pedraza et al., 2014) y una alteración del eje después de estrés crónico (Castilla-Ortega et al., 2011).

7.1.2 El receptor LPA₂

La expresión cerebral del gen que codifica para el receptor LPA₂ (*lpar2*) es menor que la del gen *lpar1* (An et al., 1998). El gen *lpar2* presenta los niveles más altos durante el desarrollo embrionario y disminuye tras la primera semana posnatal (Contos et al., 2000), por lo que su expresión es reducida en el adulto, tanto en ratón como en humano. El receptor LPA₂ está acoplado a diferentes familias de proteínas G heterotriméricas (*Gai* /*o*, *Gα11/q* y *Gα12 / 13*), actuando sobre diferentes rutas de señalización: familia Ras/Rho; cascadas de proteínas MAPK; fosfatidilinositol 3-quinasa; Rac; fosfolipasa C y diacilglicerol (Contos et al., 2000). La activación de estas vías de señalización mediada por el receptor LPA₂ se asocia generalmente

con procesos como la supervivencia (Deng et al., 2002) y la migración celular (Zheng, Kong, & Goetzl, 2001).

Se ha observado que, en animales de laboratorio, la ausencia del receptor LPA₂, a diferencia de la ausencia del receptor de LPA₁, no produce modificaciones anatómicas. Sin embargo, sí provoca una disminución en las respuestas mediadas por el receptor como la proliferación, la movilización de calcio y la activación de las vías intracelulares asociadas (Contos et al., 2002).

7.1.3 El receptor LPA₃

La expresión del receptor LPA₃ en ratón es más abundantemente en testículos, riñón y pulmón, con niveles moderados en intestino delgado y niveles bajos en corazón, estómago, bazo y cerebro perinatal y adulto (Contos et al., 2000).

En humanos, el LPA₃ es más abundante en próstata, testículos, páncreas y corazón, presentando niveles moderados en pulmón, ovario y cerebro (Bandoh et al., 2000). No se ha detectado expresión en placenta, hígado, músculo esquelético, riñón, bazo, timo, intestino delgado, colon o leucocitos de sangre periférica (Contos et al., 2000).

El receptor LPA₃ se acopla a las subunidades G α i / o y G α q de las proteínas G para mediar la activación de la fosfolipasa C inducida por LPA, la movilización de Ca², la inhibición y activación del adenilil ciclasa y por último, la activación de la proteína quinasa (Ishii et al., 2000).

Este receptor, a diferencia del receptor LPA₁ y LPA₂, no se une a la subunidad G α 12/13 (Ishii et al 2000). Otro de los aspectos diferenciales de este receptor, con respecto a los receptores LPA₁ y LPA₂, es su mayor afinidad por las cadenas de LPA con insaturaciones, frente a la mayor afinidad por la cadenas saturadas de los receptores LPA₁ y LPA₂, aunque es menos sensible que estos a las especies de LPA con cadenas de acilo saturadas, y tiene una afinidad relativamente

alta por 2-acil-LPA que contiene ácidos grasos insaturados (Bandoh et al., 2000; Sonoda et al., 2002).

Los ratones machos y nulos para el receptor LPA₃ no presentan ninguna alteración en términos generales, a diferencia de las hembras, donde se observan alteraciones en la reproducción, encontrándose afectada la implantación y localización del embrión, así como el tamaño de la camada (Xiaoqin Ye et al., 2005). Desde un punto de vista neuroanatómico, el sistema nervioso no muestra ninguna alteración en ausencia del receptor LPA₃, a pesar de que se expresa en algunas estructuras cerebrales como el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala (revisado en Choi et al., 2010). Pero sí que juega un papel relevante en la modulación del dolor. En este sentido, se ha implicado en el dolor post-ictus (Ueda et al., 2018) y en el dolor neuropático (Uchida, Nagai, & Ueda, 2014; Ueda et al., 2018).

7.1.4 El receptor LPA₄

Los receptores LPA₄ presentan homología estructural con los receptores purinérgicos P2Y y se diferencian estructuralmente de los otros receptores de LPA (Choi et al., 2010). Además de en el cerebro en desarrollo, el gen para este receptor (*Lpar4*) se ha localizado en varios tejidos tales como corazón, ovarios y fibroblastos embrionarios (Lee et al., 2007). En humanos, su distribución es ubicua, encontrándose la máxima concentración en ovario (Noguchi, Ishii, & Shimizu, 2003).

Desde el punto de vista de la especificidad, presenta una mayor afinidad por la especie LPA 18:1 en comparación con otras especies lisofosfolípídicas (Noguchi, Ishii, & Shimizu, 2003). LPA₄ cuando es activado por los ligandos de LPA induce cambios morfológicos a través de las vías G_{α12/13}, Rho / Rho-kinasa (Lee et al., 2007), tal y como hacen los receptores LPA₁, LPA₂ y LPA₅ (Yanagida et al., 2007). A diferencia de los otros receptores, el LPA₄ interviene en el proceso de agregación celular mediante las Rho-quinasa y la adhesión celular mediante la

cadherina neuronal (Yanagida et al 2007). La función de este receptor se conoce con más detalle gracias al uso de animales que no lo expresan. Estos animales presentan una disminución de la supervivencia prenatal causada por hemorragias asociadas con malformación de los vasos sanguíneos (Lee et al., 2008) además, el sistema linfático se encuentra afectado (Sumida et al., 2010).

En relación a la implicación del receptor LPA₄ en la regulación del comportamiento, ningún estudio de los revisados hasta la fecha, ha demostrado su implicación en conducta.

7.1.5 El receptor LPA₅

Desde el punto de vista estructural, este receptor comparte mayor homología con el receptor LPA₄ que con el resto de receptores para LPA (Lee et al., 2006). Su expresión génica (Lpar5) es ubicua en todos los tejidos, habiéndose determinado tanto en cerebro embrionario como en células madre embrionarias (Kotarsky et al., 2006), sugiriendo un papel importante durante el neurodesarrollo (Ohuchi et al., 2008).

Los receptores LPA₅ tienen una alta afinidad por la especie LPA 18:1, pero pueden ser activados por otros ligandos derivados de lípidos, como farnesil pirofosfato y naracidonilglicina (Ohuchi et al., 2008), aunque se necesitan cantidades superiores de estos compuestos para inducir su activación (Williams et al., 2009).

Una vez activados, y a través de proteínas G, en concreto la subfamilia G $\alpha_{12/13}$, ejercen acciones biológicas, entre ellas la retracción de neuritas y la formación de las fibras de estrés, que son haces de filamentos citoplasmáticos de actina que, asociadas a proteínas, permiten movimientos ameboides de algunas células. A través de la activación de la subunidad G α_q contribuye al aumento de niveles de calcio intracelular (Lee et al., 2006). Además, aumenta los niveles de AMPc y la producción de fosfato de inositol (Lee et al., 2006), favoreciendo su acumulación.

Desde un punto de vista neurofisiológico, se ha observado en ratones que carecen del receptor LPA₅ una reducción del umbral nociceptivo (Callaerts-Vegh et al., 2012; Tsukahara et al., 2018) y una conducta menos ansiosa en comparación con ratones silvestres (Callaerts-Vegh et al., 2012). Lo que parece indicar que este receptor estaría implicado en la regulación de la nocicepción y la hipersensibilidad al dolor, así como en la conducta emocional. Todo ello sugiere su posible implicación en trastornos psicopatológicos (Callaerts-Vegh et al., 2012).

7.1.6 El receptor LPA₆

El receptor LPA₆ fue denominado inicialmente como P2Y₅, por su homología estructural con los receptores P2Y (Webb, Kaplan, & Barnard, 1996). El receptor LPA₆ se expresa predominantemente en células endoteliales de capilares del cerebro de rata (Masago et al., 2018).

Este receptor tiene una mayor afinidad por las cadenas de LPA de tipo 2-acil-LPA en comparación con las cadenas 1-acil-LPA además, necesita concentraciones más altas de los ligandos de LPA en comparación con los otros receptores de LPA, para activarse y producir efecto (Yung et al., 2014).

8. LPA Y PSICOPATOLOGÍA

Como se ha visto en el apartado anterior, tanto los distintos receptores como vías de señalización de LPA están presente en el SNC (Sugiura et al., 1999).

El receptor LPA₁ es fundamental para el desarrollo embrionario del SNC; su ausencia ha revelado que es importante para el desarrollo de la corteza cerebral, siendo necesario para los procesos de proliferación, supervivencia y migración celular (Estivill-Torrús et al., 2008). La vía de señalización mediada por el receptor LPA₁ es importante tanto en condiciones fisiológicas

como patológicas (Choi et al., 2010; Ye, 2008), y está involucrada en la etiología de numerosas enfermedades neurológicas y psicopatológicas (como por ejemplo en la esquizofrenia o el dolor neuropático) (Choi et al., 2010). Estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en animales adultos demuestran que la ausencia del receptor de LPA₁ produce una disminución de la población proliferativa, acortamiento del ciclo celular y maduración temprana de los precursores neurales del hipocampo (Matas-Rico et al., 2008), por lo que afecta al proceso neurogénico en el giro dentado adulto, lo que a su vez provoca alteraciones de conductas asociadas al hipocampo (Matas-Rico et al., 2008; Castilla-Ortega et al., 2010; Santín et al., 2009). En este sentido, y tal como se indicó anteriormente, es un receptor importante en la regulación de la respuesta al estrés (Castilla-Ortega et al., 2011), estando implicado en la memoria dependiente de hipocampo (Santín et al., 2009; Castilla-Ortega et al., 2010; 2011) y en la regulación emocional (Pedraza et al., 2014) y del estado de ánimo (Moreno-Fernández et al., 2017; 2018).

Otro receptor que también se ha implicado en la regulación del comportamiento es el receptor LPA₅. Así, usando ratones que no expresan dicho receptor, se ha puesto de manifiesto que, al contrario de lo que sucede con los ratones carentes del receptor LPA₁, existe una mayor memoria espacial combinada con repuestas ansiolíticas (Callaerts-Vegh et al., 2012a), por lo que el LPA a través de sus receptores, al menos el LPA₁ y LPA₅, regula la memoria dependiente de hipocampo y la emoción, aunque de forma contrapuesta (Callaerts-Vegh et al., 2012b; Castilla-Ortega et al., 2014).

El receptor LPA₆, una vez activado por ligandos de LPA, induce diferentes efectos actuando a través de la proteína G $\alpha_{12/13}$. La vía de activación de la proteína Rho regula la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la morfología celular (Yanagida et al., 2009). Además, el receptor LPA₆ contribuye al aumento de los niveles de calcio intracelulares, y

produce una reducción de AMPc y una activación de la ERK_{2/2} (Lee et al., 2009). Todo ello permite pensar que este receptor pueda estar implicado en la regulación de la conducta. Aunque hasta la fecha no existen estudios que permitan afirmar esta implicación.

Se han propuesto varios mecanismos a través de los cuales el LPA, fundamentalmente a través del receptor LPA₁, regula las conductas dependientes de hipocampo. Así, el receptor LPA₁ es expresado en células neuronales en el GD del hipocampo de ratón adulto (Walker et al., 2016). Además, presenta una gran afinidad por la especie de LPA 18:1 (Choi et al., 2010; Sano et al., 2002), lo cual activa varias vías de señalización intracelular mediadas a través de las proteínas Rho, Fosfolipasa C, Ras y Fosfatidilinositol 3-quinasa (Chun et al., 2010), dando lugar a la cascadas de señalización que podrían regular la expresión de genes de expresión inmediata como el gen c-Fos (Muscella et al., 2003). Estas vías se han relacionado con la ansiedad (Saitoh et al., 2006; Xiao et al., 2012). Dado que una disminución neurogénica también puede inducir ansiedad (Walker et al., 2016,) este receptor podría tener un papel muy relevante en la fisiopatología de este trastorno.

El receptor LPA₁ también puede estar implicado en la conducta de afrontamiento al estrés. Así, los animales que carecen de dicho receptor, muestran una mayor vulnerabilidad a los efectos negativos de este factor ambiental. En esta línea, se ha observado, en estos animales, tras la exposición a estrés una patología hipocampal exacerbada, mayor alteración neurogénica; mayor apoptosis en el hipocampo (Castilla-Ortega et al., 2011) y mayores índices de estrés oxidativo (García-Fernández et al., 2012), en comparación con animales silvestres.

Por otro lado, en modelos animales, se ha puesto de manifiesto que el receptor LPA₁ puede jugar un papel relevante en la etiopatología de la depresión. Así, animales que no expresan dicho receptor muestran anhedonia (Moreno-Fernández et al., 2017), una pobre estrategia de afrontamiento al estrés ((Moreno-Fernández et al., 2017; 2018), fatigabilidad y falta de

motivación (Moreno-Fernández et al., 2017), reducida neurogénesis (Matas-Rico et al., 2008; Castilla-Ortega et al., 2011) y una mala adaptación del eje HHA (Castilla-Ortega et al., 2011; Pedraza et al., 2014), factores todos ellos, junto con la mayor vulnerabilidad a los efectos negativos al estrés, que se han relacionado consistentemente con la aparición de síntomas depresivos.

El trabajo en humanos confirma ampliamente los resultados obtenidos con modelos animales. Enfoques indirectos indican que el polimorfismo en el receptor LPA₁ se relaciona con un aumento del riesgo de hipertensión y la exposición al estrés aumenta la susceptibilidad de los pacientes con alelos de riesgo (Xu et al., 2015), por lo que las variantes genéticas en este receptor pueden aumentar la vulnerabilidad al estrés. De hecho, una reducción de la expresión del receptor LPA₁ se observó después del estrés crónico impredecible, que pudo revertirse mediante el tratamiento con antidepresivos (Sibille et al., 2009). Además, en pacientes con depresión, la expresión de receptor LPA₁ se redujo tres o cuatro veces en la corteza temporal (Aston, Jiang, & Sokolov, 2005). Por el contrario, un aumento en la expresión del receptor LPA₁ se ha relacionado con estados de ánimo positivo (Le-Niculescu et al., 2009) y puede ser un biomarcador de respuesta exitosa a la terapia cognitiva conductual (Kéri, Szabó, & Kelemen, 2014).

Por otro lado, el receptor LPA₁ también se ha visto que puede estar implicado en la respuesta a los antidepresivos. Así, los antidepresivos tricíclicos, tetracíclicos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina o noradrenalina a través de los receptores LPA₁, acoplados a una proteína Gi/o, estimulan la vía de señalización ERK1/2 (Olianas, Dedoni, & Onali, 2015). La vía ERK1/2, está involucrada en la protección al estrés oxidativo y la inflamación (Li et al., 2017), y se encuentra reducida después de la exposición a estrés crónico en áreas cerebrales relacionadas con el estrés (Castro et al., 2012; Nho et al., 2015). Así pues, la señalización del receptor LPA₁ puede estar involucrada en las acciones de los fármacos

Capítulo I: Introducción

antidepresivos y, por lo tanto, en algunas de sus acciones terapéuticas (Olianas, Dedoni, & Onali, 2016). Además, la función adecuada de la vía LPA-LPA₁ también puede actuar como un factor protector contra el desarrollo de hipertensión (Orosa et al., 2012) y el desarrollo de enfermedad cerebrovascular (Yukiura et al., 2011), alteraciones que están relacionadas con la depresión en los ancianos (Daulatzai, 2014).

Junto con la implicación del receptor LPA₁, otros estudios, involucran a la enzima ATX (una de las enzimas responsables de la síntesis de LPA), en la aparición de síntomas depresivos. De este modo, se ha relacionado la baja expresión del receptor LPA₁ con el aumento de expresión de ATX en pacientes con deterioro cognitivo y Alzheimer (Frugier et al., 2011; Umemura et al., 2006). Los niveles altos de ATX inducen una ralentización del metabolismo del lóbulo temporal medio y de la corteza prefrontal, lo que parece afectar a las funciones ejecutivas y a la memoria, funciones cognitivas que también parecen verse afectadas por la depresión (Dotson et al., 2014). Asimismo, recientemente, se ha observado una reducción en los niveles de ATX en suero y en fluido cerebro-espal de pacientes con depresión (Itagaki et al., 2019) (Itagaki et al., 2019).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, puede afirmarse que los estudios llevados a cabo, tanto en modelos animales como humanos, están empezando a revelar mecanismos que involucran la participación del receptor LPA₁ en la emoción y la respuesta al estrés. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los cambios en LPA en general y de las especies de LPA en particular y su participación en la regulación emocional. Conocer la implicación de este sistema lipídico en los efectos del estrés y en la aparición de problemas psicopatológicos puede mejorar nuestro conocimiento sobre las bases biológicas de estos trastornos, así como abordar de forma más efectiva el tratamiento de los mismos.



CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El LPA es un lípido bioactivo que está involucrado en la señalización intracelular a través de los seis receptores acoplados a proteínas G (LPA₁₋₆). Entre estos receptores, LPA₁ es un fuerte candidato para mediar los efectos centrales de LPA en la emoción y puede participar en la regulación de conductas emocionales normales. Cambios en la expresión o funcionalidad de este receptor puede aumentar la vulnerabilidad a los efectos negativos del estrés y predisponer a un individuo al desarrollo de un trastorno psicopatológico. De hecho, los ratones que carecen del receptor LPA₁ exhiben desregulación emocional y una aumentada vulnerabilidad a los efectos negativos del estrés (Pedraza et al., 2014; Castilla-Ortega et al., 2011). La pérdida de este receptor resulta en un fenotipo ansioso, con baja resiliencia en respuesta al estrés y con alteraciones conductuales y neurobiológicas similares a las que aparecen en los trastornos del estado de ánimo. En base a los datos acumulados de los estudios llevados a cabo con animales que carecen del receptor LPA₁ y teniendo en cuenta los criterios de validez, nuestro grupo de investigación propuso que los ratones maLPA₁-nulos representan un modelo animal de depresión ansiosa (Moreno-Fernández et al., 2017; 2018).

Por otro lado, la administración continuada de LPA induce diferentes efectos neurobiológicos y conductuales en animales de investigación. Por un lado, aumenta la neurogénesis hipocampal (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2018; Walker et al., 2016; Rosell del Valle, tesis doctoral, 2014). A nivel comportamental, se ha observado que reduce las conductas similares a depresión en animales de investigación (Rosell del Valle, tesis doctoral, 2014) y aumenta la conducta hedónica (Moreno-Fernández et al., 2019, en revisión). En cambio, en ratas aumenta la conducta ansiosa y en condiciones de estrés, induce indefensión y anhedonia. Efectos contrapuestos a los observados en situación basal.

Debido a que la activación del receptor LPA₁ requiere LPA, posiblemente la ausencia de dicho receptor afectará los niveles de LPA hipocampal. Además, dado que las especies de LPA difieren en las afinidades por los diferentes receptores de LPA (Bandoh et al., 2000; Cerutis et al., 2014), posiblemente el perfil de las diferentes especies de LPA se vea afectado en el hipocampo. Puesto que este receptor tiene una alta afinidad tanto para las moléculas de LPA saturadas como insaturadas (Bandoh et al., 2000), posiblemente la ausencia de LPA afecte a las concentraciones de las diferentes especies de LPA más que a su perfil.

Por otra parte, es un hecho ampliamente constatado que el estrés altera el metabolismo de numerosos lípidos en estructuras clave para el control de la emoción (Faria et al., 2015; Oliveira et al., 2016), en cambio se desconoce cómo el estrés regula las diferentes especies de LPA en el hipocampo.

Por ello nos planteamos las siguientes hipótesis:

1. Dado que la activación del receptor LPA₁ requiere LPA, la ausencia del receptor LPA₁ provocará una reducción de los niveles de las diferentes especies de LPA y alterará el perfil de LPA en el hipocampo.
2. El estrés alterará los niveles y el perfil LPA en el hipocampo, que dependerá de la modalidad del estresor y de la duración del mismo.
3. La administración crónica de LPA provocará cambios en los niveles de LPA y modificará el perfil de LPA en el hipocampo.

Teniendo en cuenta lo expuesto, en la presente tesis doctoral se planteó el siguiente **OBJETIVO PRINCIPAL**: estudiar el efecto del estrés en el sistema LPA hipocampal.

Este objetivo general se ha abordado en 3 objetivos específicos tratados en tres bloques experimentales: 1) Puesta a punto de la técnica MALDI-TOF para la determinación de las concentraciones de las diferentes especies de LPA en el hipocampo; 2) Estudio del perfil

lisofosfolípídico en el hipocampo de ratón en situaciones de estrés agudo, en ausencia del receptor LPA₁ y tras la combinación de ambos factores. 3) Estudio del perfil de lisofosfolípídico hipocampal tras la exposición al estrés crónico y la administración continuada de LPA.

1. PRIMER BLOQUE EXPERIMENTAL (capítulo III).

- a) Determinación de las especies de LPA en tejido de hipocampo mediante la técnica MALDI-TOF.
- b) Determinación de las especies de LPA en suero mediante la técnica MALDI-TOF.

2. SEGUNDO BLOQUE EXPERIMENTAL (capítulo IV)

- a) Determinación de las concentraciones y del perfil hipocampal de las especies de LPA en condiciones basales.
- b) Determinación del efecto de la ausencia de expresión del receptor LPA₁ en las concentraciones y perfil hipocampal de las especies de LPA.
- c) Determinación de las concentraciones y perfil hipocampal de las especies de LPA en diferentes condiciones de estrés agudo.
- d) Determinación del efecto de la combinación de la ausencia del receptor LPA₁ y la exposición a diferentes estresores agudos en las concentraciones y perfil hipocampal de las especies de LPA.

3. TERCER BLOQUE EXPERIMENTAL (capítulo V)

- a) Determinación de las concentraciones y el perfil hipocampal de las especies de LPA en situaciones de estrés crónico.
- b) Determinación de las concentraciones y el perfil hipocampal de las especies de LPA tras la administración exógena de LPA, en situación basal o tras la exposición a estrés crónico.



CAPÍTULO III: PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE LPA EN TEJIDO Y SUERO



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN

Los estudios de lípidos han sufrido retrasos en comparación con las investigaciones genómicas y proteómicas debido a las limitaciones técnicas. Gracias a los avances experimentados en los últimos años por la tecnología lipidómica, que ha proporcionado la posibilidad de cuantificar a gran escala moléculas lipídicas, es posible realizar estudios sobre la composición lipídica de regiones de interés, lo que permite a su vez, una interpretación fisiológica basada en la química analítica y en el análisis estadístico (Watson, 2006; Wenk, 2005). En este sentido, las mejoras que han experimentado las técnicas analíticas, sobre todo las basadas en espectrometría de masas, permiten un estudio completo del perfil lipídico de diferentes sistemas, desde células a tejidos e incluso organismos enteros, facilitando la comprensión del papel de los lípidos en condiciones fisiológicas y en procesos patológicos (Miranda & Olivera, 2015; Wenk, 2010).

Hasta donde sabemos, sólo tres trabajos han determinado las especies de LPA en tejido nervioso. Uno de ellos en el cerebro completo de rata (Morishige et al., 2010) y los otros dos en la médula espinal, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, en concreto tras la inducción de dolor neuropático (Ma et al., 2013; Uchida et al., 2014). Sin embargo, no hay estudios disponibles sobre el perfil de LPA en regiones cerebrales. Por ello y antes de pasar a los siguientes objetivos de la presente tesis, basados en conocer el impacto de la ausencia del receptor LPA₁ y de diferentes tipos de estrés en las especies de LPA, ha resultado necesario poner a punto la técnica de extracción, determinación, cuantificación de dichas especies y obtención de su perfil lipídico en las diferentes situaciones experimentales en tejido, en concreto en hipocampo. Asimismo, se han

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

realizado estudios de optimización del perfil LPA en suero de ratón. Para estos estudios se ha elegido la técnica de espectrometría MALDI-TOF por ser un método sensible, rápido y que permite la detección de moléculas de pequeño tamaño. Además, debido a que usa una ionización suave, facilita el análisis de moléculas sensibles procedentes de muestras biológicas. Por tanto, esta técnica permite la detección y cuantificación de las diferentes especies de LPA tanto en suero como en tejido de ratón.

Para la optimización y validación del método en nuestras muestras de estudio, se han seguido las directrices incluidas en la guía de Validación de Procedimientos Analíticos de la IHC (International Conference on Harmonisation) y en el documento de la SANCO 10684/2009.

La validación del método permite considerar que el procedimiento utilizado es útil para los objetivos perseguidos. Para dicha valoración se ha tenido en cuenta la linealidad del método, la precisión, la exactitud, el límite de detección y el límite de cuantificación. En nuestro caso, para la determinación de las concentraciones de las diferentes especies de LPA examinadas en tejido y suero, hemos considerado la linealidad del método (curva de calibrado) para confirmar que el procedimiento utilizado proporciona datos que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (R^2). La precisión hace referencia a la reproductibilidad y repetición de los resultados cuando el procedimiento se repite, es decir, a la obtención de resultados similares tras la realización de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de análisis. La exactitud, hace alusión al grado de concordancia de los resultados experimentales obtenidos a un valor de referencia aceptado. Por último, hemos tenido en cuenta el límite de detección que indica la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser

detectada y el límite de cuantificación, que es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con exactitud y precisión.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Muestras biológicas

Para la puesta a punto del método de determinación de las especies de LPA, se usaron tejidos de cerebro de hámster y ratón. En el caso de los ratones, estos poseían un fondo genético mixto 129X1/SvJ x C57BL/, tanto los animales silvestres (WT) como los animales que no expresaban el receptor LPA₁ (maLPA₁-nulos). Para poner a punto las determinaciones de las diferentes especies de LPA en suero, se emplearon muestras de suero fetal bovino, así como de conejo y ratón (129X1/SvJ x C57BL/6J; WT y maLPA₁-nulos).

Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de ventilación, temperatura y disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*, con un ritmo circadiano de 12 horas de períodos luz/oscuridad con efecto amanecer/anocheceer en las instalaciones de la Universidad de Málaga.

Los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Málaga (CEUMA 2013-0008-A/ CEUMA: 1-2015- A, 08-7- 15-273) y de la Junta de Andalucía (08-7- 15-273), de acuerdo a la normativa legal vigente europea (European Communities Council Directives 2010/63/UE, 90/219/CEE, Regulation (EC) No. 1946/2003) y nacional: 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.

2.2 Reactivos

Los patrones estándares de las especies lipídicas LPA 16:0, 18:2, 18:1, 18:0, 20:4 y el patrón interno LPA 17:0, fueron suministrados por Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL). El compuesto monoisotópico $^{68}\text{Zn}^{2+}$ -Phos-tag (Phos-tag®) se obtuvo del NARD Instituto Ltd. (Hyogo, Japón). Asimismo, se emplearon los siguientes disolventes: acetona, cloroformo, metanol, O- vanadato, cloruro de potasio, amoníaco (28%), matriz THAP y acetonitrilo, suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Para la calibración del equipo MALDI-TOF se empleó el péptido de calibración estándar externo suministrado por Bruker Daltonics (Bremen, Alemania).

2.3 Aparatos

Como espectrómetro de masas se empleó el sistema MALDI-TOF, equipo UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Para la cristalización de las muestras, se usó la placa de MALDI (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Por último, para la separación de las fases en las extracciones de las especies de LPA se empleó una centrifugadora en frío (equipo Sigma, 2-16PK, Sartorius).

2.4 Preparación de disoluciones patrón

Los patrones estándares de LPA (16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 20:4) se disolvieron en metanol y amoníaco (0.1%) a diferentes concentraciones 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 nmol, con estándar interno a 0.2 nmol (17:0 LPA) en cada muestra de patrón. Para ello, se preparó una disolución madre que contenía la mezcla de todos los estándares y a partir de ella se fueron diluyendo con la disolución de metanol hasta obtener las diferentes concentraciones que permitieron la obtención de la recta de calibrado. Posteriormente, se

añadió 50 μ L se Phostag [1mM] y se cuantificaron usando el MALDI-TOF tal como se describe en los apartados siguientes.

2.5 Perfusión intracardíaca y extracción del hipocampo.

Una vez finalizados los tratamientos experimentales, los animales fueron anestesiados con una dosis eutanásica del anestésico pentobarbital sódico, vía intraperitoneal (200 mg/kg; Dolethal, Vétoquinol, Especialidades Veterinarias, S.A., Madrid, España). Tras la comprobación de la ausencia de reflejos en las extremidades, los animales se colocaron en posición de cúbito supino y se practicó una incisión en el torso, cortando el diafragma, para exponer de forma accesible el corazón. Posteriormente, se insertó una cánula en el ventrículo izquierdo conectada a una bomba de perfusión (modelo D-25V, DINTER SA-DINKO Instruments, Barcelona) y se realizó una incisión en la aurícula derecha con el objetivo de permitir la extravasación sanguínea. Posteriormente, en el ventrículo izquierdo se administró una solución de lavado (tampón fosfato salino a 0,1 M y pH 7,4 (PBS)) durante aproximadamente 10 minutos. Tras la perfusión, el animal se decapitó y se procedió a la extracción del cerebro, para la extracción del hipocampo.

Para la extracción del hipocampo, los cerebros de ratón se dividieron por la línea media en dos mitades. De cada mitad, se separó la parte rostral de la parte caudal, y con la ayuda de un sacabocados de 0.5 mm de diámetro, se fue extrayendo el hipocampo en partes dorsales y ventrales. Todo el hipocampo se usó para las determinaciones de especies de LPA (Figura 4).

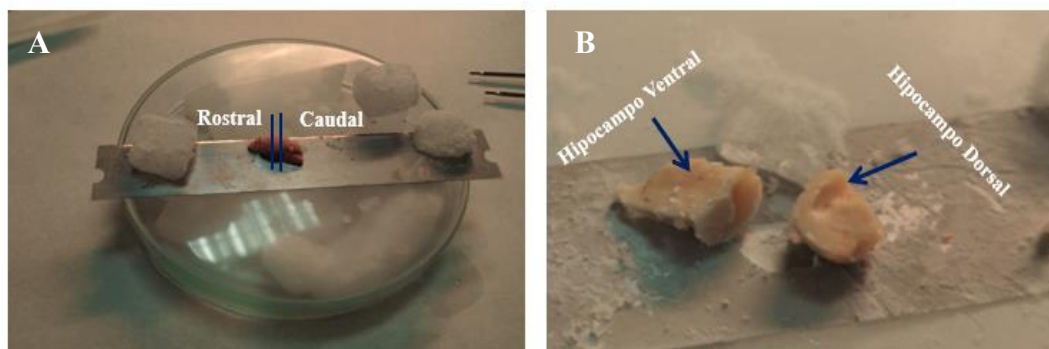


Figura 4: Procedimiento de extracción de hipocampo. Los cerebros se dividieron por la línea media en dos mitades. De cada mitad, se separó la parte rostral de la parte caudal. A su vez, se separó la parte dorsal de la parte ventral para favorecer la disección del hipocampo. A) Imagen de mitad de cerebro de ratón cortada sagitalmente. B) Extracción de hipocampo de las partes dorsal y ventral.

2.6 Método de extracción de las especies de LPA

2.6.1 Extracción de LPA en tejido hipocampal

Tras la realización de varios estudios piloto, se optimizó el procedimiento de extracción de LPA en tejido dependiendo de la cantidad en miligramos a analizar de tejido cerebral, con el fin de realizar una adecuada extracción y emplear los utensilios óptimos. El procedimiento seguido se indica a continuación.

2.6.1.1 Extracción de LPA en tejido hipocampal inferior a 100 mg

Para la extracción de LPA en tejido de hipocampo con un peso inferior a 100 mg, se empleó una modificación del método de extracción de lípidos empleado por varios autores (Ma et al., 2013; Morishige et al., 2010; Tanaka et al., 2004). Este método está basado en el protocolo de extracción de lípidos desarrollado originalmente por Bligh y Dyer (Bligh & Dyer, 1959). Tras aislar el hipocampo, se resuspendió en 200 μ L de O-vanadato [100 mM] y EDTA [1 mM] y se trituró hasta la homogenización total. Seguidamente, se añadieron 0.5 nmoles de patrón interno (LPA 17:0 en 1 mL de acetona), y se centrifugó a 1300G durante 5 minutos. El pellet resultante se lavó dos veces con 0.5

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

mL acetona, y se secó con nitrógeno. Posteriormente, se añadieron 380 μL de CHCl_3 , MeOH y H_2O (en relación 1:2:0.8), centrifugándose y manteniendo el sobrenadante, se repitió una vez más. Al sobrenadante total se le añadió una solución de 0.4 mL CHCl_3 , 0.4 mL KCl y 2 μL amonía (28%) centrifugando y eliminando la fase cloroformo. Se realizaron 4 lavados de la fase acuosa con una solución de 0.8 mL de CHCl_3 y MeOH (en relación 17:3). A continuación, se añadieron 50 μL de Phostag [1mM] en 0.8 mL de CHCl_3 y MeOH (17:3), sobre la que se realizó una centrifugación y se mantuvo la fase CHCl_3 . La fase acuosa resultante se lavó dos veces con 0.8 mL CHCl_3 y MeOH (17:3) y la fase de CHCl_3 se secó con nitrógeno. Finalmente, el LPA extraído se disolvió en 100 μL $\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (0.1%) para ser analizado mediante el MALDI-TOF (ver figura 5 y figura 6).

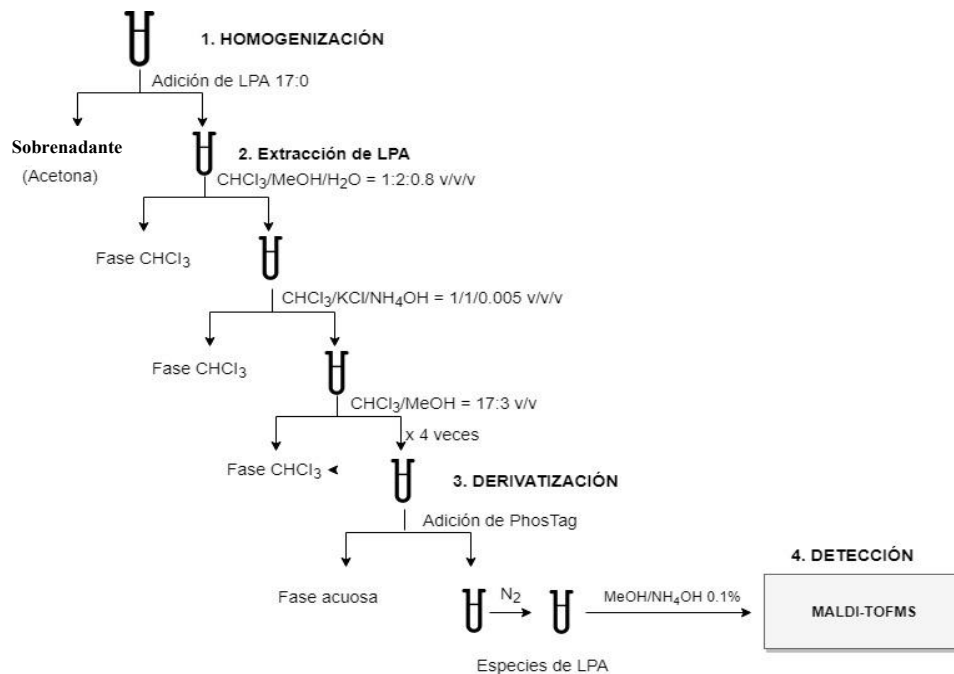


Figura 5: Diagrama de extracción de LPA a partir de hipocampo. Se inicia el proceso de extracción con una etapa de homogenización, extracción por fases de LPA y derivatización de la molécula de LPA para la mejora de su detección.

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

Adicionalmente, la concentración de cada una de las especies de LPA fue normalizada tomando como referencia las concentraciones de todas las especies de LPA detectadas en el hipocampo (Oliveira et al., 2016), y los datos se presentaron como los porcentajes medios (ver ecuación 1). Estos valores pueden ser interpretados como un reflejo de la abundancia relativa de especies de LPA analizadas en el hipocampo.

$$\% \text{ de las especies de LPA} = 100 * \frac{\text{Especies de LPA}}{([\text{LPA } 16:0] + [\text{LPA } 18:0] + [\text{LPA } 18:1] + [\text{LPA } 18:2])} \quad [\text{Ec.1}]$$

2.6.1.2 Extracción de LPA en tejido hipocampal superior a 100 mg

Para muestras que superan los 100 mg de tejido, se realiza una adaptación respecto al apartado anterior. En este caso, se suspendió la muestra en 1 mL O-vanadato [100 mM] y EDTA [1 mM] y se trituró hasta la homogenización total. Se añadieron 2.5 nmoles de patrón interno (LPA 17:0 en 5 mL de acetona), centrifugándose a 1300G durante 5 min. El pellet se lavó dos veces con 2.5 mL de acetona, secándose con nitrógeno. Posteriormente, se añadió al pellet 1.9 mL de la disolución CHCl₃, MeOH y H₂O (en relación 1:2:0.8), centrifugándose y manteniéndose el sobrenadante, repitiéndose una vez más el proceso. Al conjunto de sobrenadante se añadió 1 mL CHCl₃, 1 mL KCl y 5 µL amonía (28%), y se centrifugó a 1300G durante 5 min. Seguidamente, se eliminó la fase de CHCl₃ y se lavó 4 veces con 4 mL de la mezcla de CHCl₃ y MeOH (en relación de 17:3). A la fase acuosa resultante se le añadieron 50 µL de Phostag y 2 mL de la disolución de CHCl₃ y MeOH (en relación de 17:3) y se centrifugó a 1300G durante 5 min. La fase del CHCl₃ resultante después de haberse lavado la fase acuosa, se secó con nitrógeno. Finalmente, el producto final se disolvió en 100 µL MeOH/NH₄OH (0.1%) y se preparó para su análisis.

2.6.2 Extracción de LPA en suero

Para las determinaciones de las especies de LPA en suero, se ha utilizado una versión modificada del método descrito por Morishige et al., 2010. Para ello hemos partido de cantidades de 25 μ l de suero. A la muestra de suero se le añadió directamente 0.5 nmol de patrón interno (LPA 17:0 en 400 μ l de MeOH). Seguidamente, se agitó en un baño de hielo durante 10 min y se centrifugó a 8000G durante 5 minutos. A continuación, se recuperó la fase de MeOH y se lavó precipitando con 100 μ l de MeOH, recuperando de nuevo la fase de MeOH. Posteriormente, a toda la fase de MeOH se le añadió la mitad de volumen de H₂O y seguidamente se añadió la mitad de volumen total de la disolución de CHCl₃ y MeOH (en relación a 17:3). La fase acuosa resultante se lavó cuatro veces con CHCl₃ y MeOH (en relación a 17:3), manteniéndose la fase de CHCl₃ y secándose con nitrógeno. Al producto final se le añadieron 50 μ L MeOH/NH₄OH (0.1%).

Para detección de las especies de LPA se empleó el modo positivo del espectrofotómetro de masas con un voltaje de aceleración de 25 kV, el láser con una energía de 30 –70% (3.0 – 7.0 μ J) y una tasa de repetición de 10 Hz. El espectro de masas fue calibrado mediante el uso del péptido de calibración estándar externo (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Las señales pertenecientes a las especies en los espectros obtenidos son el resultado de la suma de a 3000 ó 6000 disparos consecutivos del láser, obteniéndose de este modo los espectros de las diferentes especies de LPA. Asimismo, se calculó la concentración total de LPA sumando las concentraciones de cada una de las especies.

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

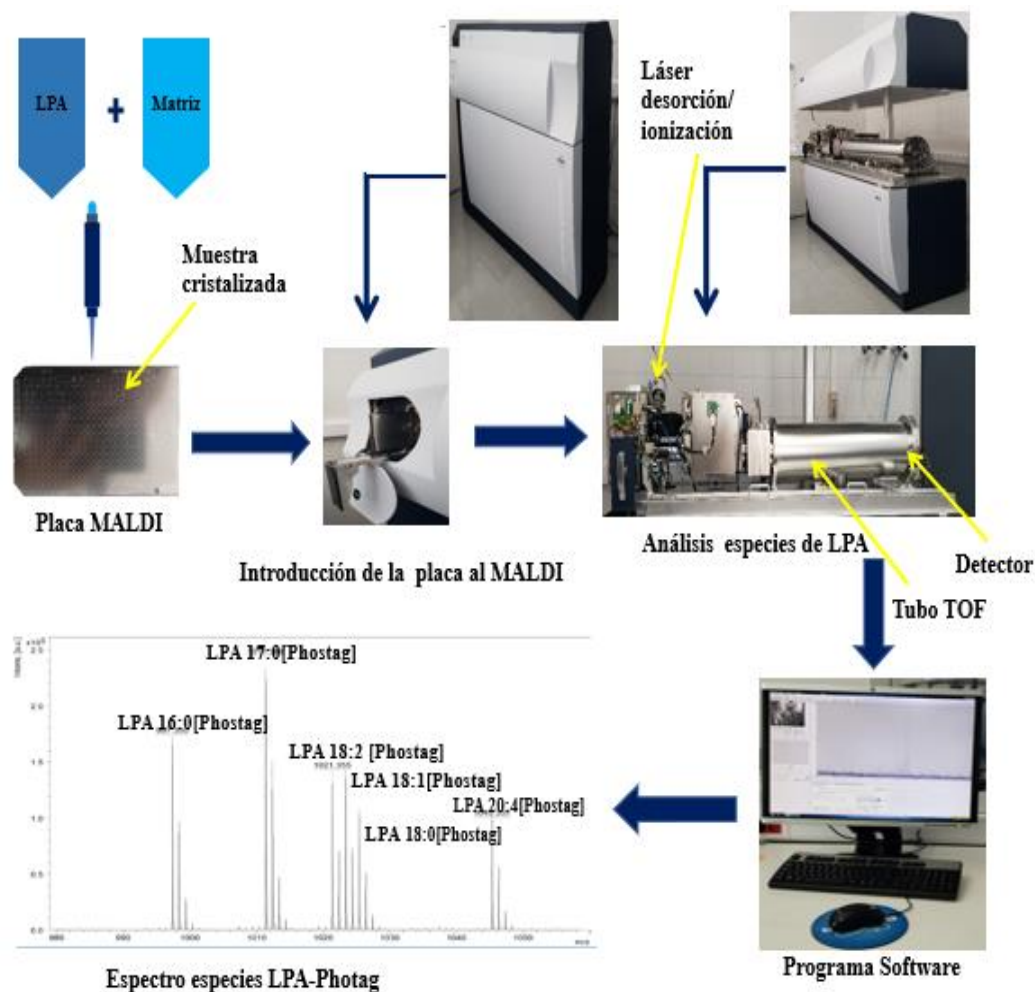


Figura 6: Procedimiento de análisis de las especies de LPA por MALDI-TOF. Se introduce la placa MALDI que contiene las muestras de LPA a analizar en el equipo MALDI-TOF obteniéndose espectros de intensidades de las especies de LPA acopladas a moléculas de Phostag.

3. RESULTADOS

3.1 Obtención de la recta de calibrado

Las rectas de calibrado para cada especie de LPA (figura 7) se obtuvieron a partir de las disoluciones de las intensidades obtenidas de los espectros (figura 8), correspondientes a cada concentración de estándares para la curva de calibrado, en las que se usaron varias muestras de patrones de los estándares de LPA (16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 20:4) a 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 nmol con estándar interno a 0.2 nmol (17:0 LPA). A partir de dicha recta, se obtuvo la concentración de los tejidos analizados en los capítulos IV y V de esta tesis doctoral. Los cálculos realizados se detallan a continuación:

$$Y = aX + b \text{ (recta de calibrado)} \quad [\text{Ec.2}]$$

Donde:

$Y = I \text{ LPA de cada especie} / I \text{ LPA17:0}$; valor obtenido a partir de las intensidades (I) de los espectros.

$X = \text{nmoles LPA de cada especie} / \text{nmoles LPA 17:0}$.

$a =$ pendiente de la recta de calibrado (obtenida de la figura 7 para cada especie de LPA).

$b =$ constante, punto de corte entre el eje X y el eje Y (obtenida de la figura 7 para cada especie de LPA).

$$\frac{I \text{ LPA cada especie}}{I \text{ LPA17:0}} = a \frac{\text{nmoles LPA cada especie}}{\text{nmoles LPA17:0}} + b \quad [\text{Ec.3}]$$

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

$$nmoles\ cada\ especie = \left(\frac{I_{LPA\ cada\ especie}}{I_{LPA17:0}} - b \right) * \frac{nmoles\ LPA17:0}{a} \quad [Ec.4]$$

La cantidad de nmoles de LPA 17:0, que es el patrón interno, es contante porque siempre se ha añadido la misma cantidad a todas las muestras. Por lo tanto, se puede ver en la ecuación cómo la cantidad de muestra es proporcional a su señal.

$$\frac{nmoles\ cada\ especie}{mg} = \frac{\left(\frac{I_{LPA\ cada\ especie}}{I_{LPA17:0}} - b \right) * \frac{nmoles\ LPA17:0}{a}}{masa\ muestra(mg)} \quad [Ec.5]$$

Esta última ecuación refleja la concentración que hay de cada especie de LPA por miligramo de tejido de hipocampo.

Los espectros obtenidos para las especies de LPA en los distintos ensayos realizados, representados en las figuras 8 a la 15, se muestran con mayor detalle en los anexos I al VIII.

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

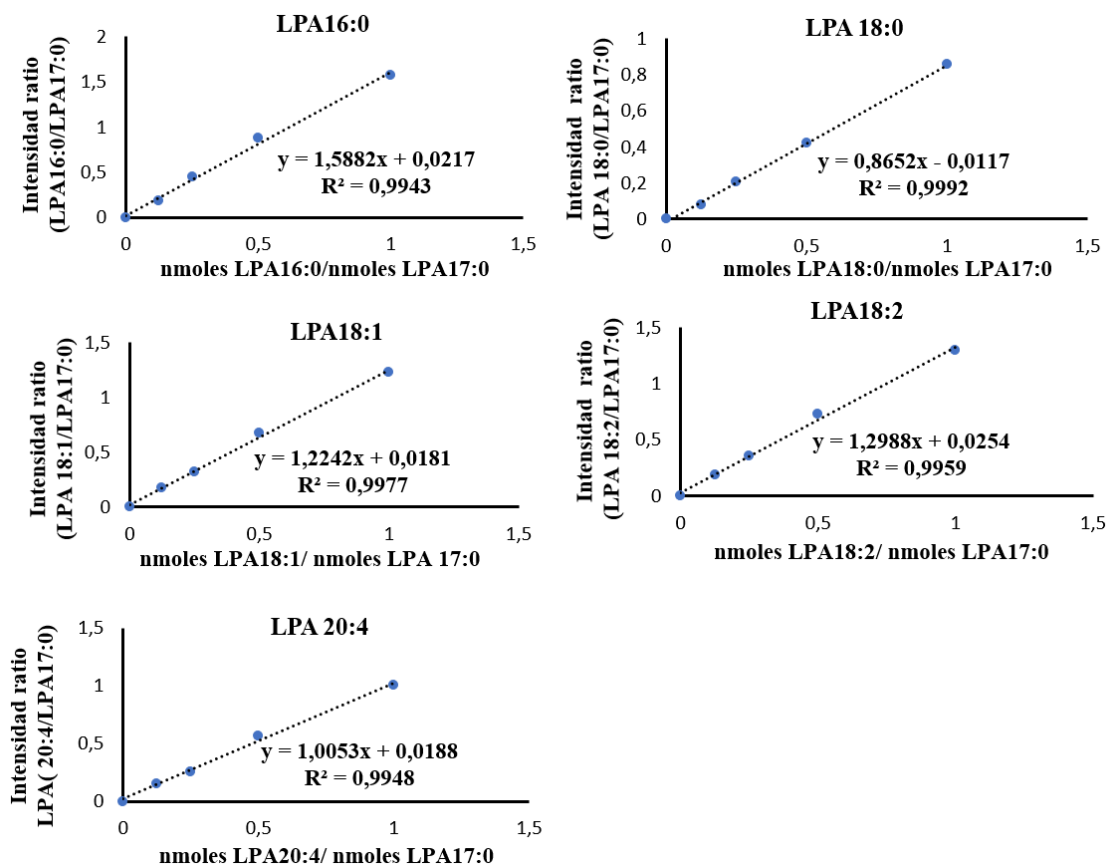


Figura 7: Ejemplo de rectas de calibrado realizadas para cada especie de estándar de LPA.

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

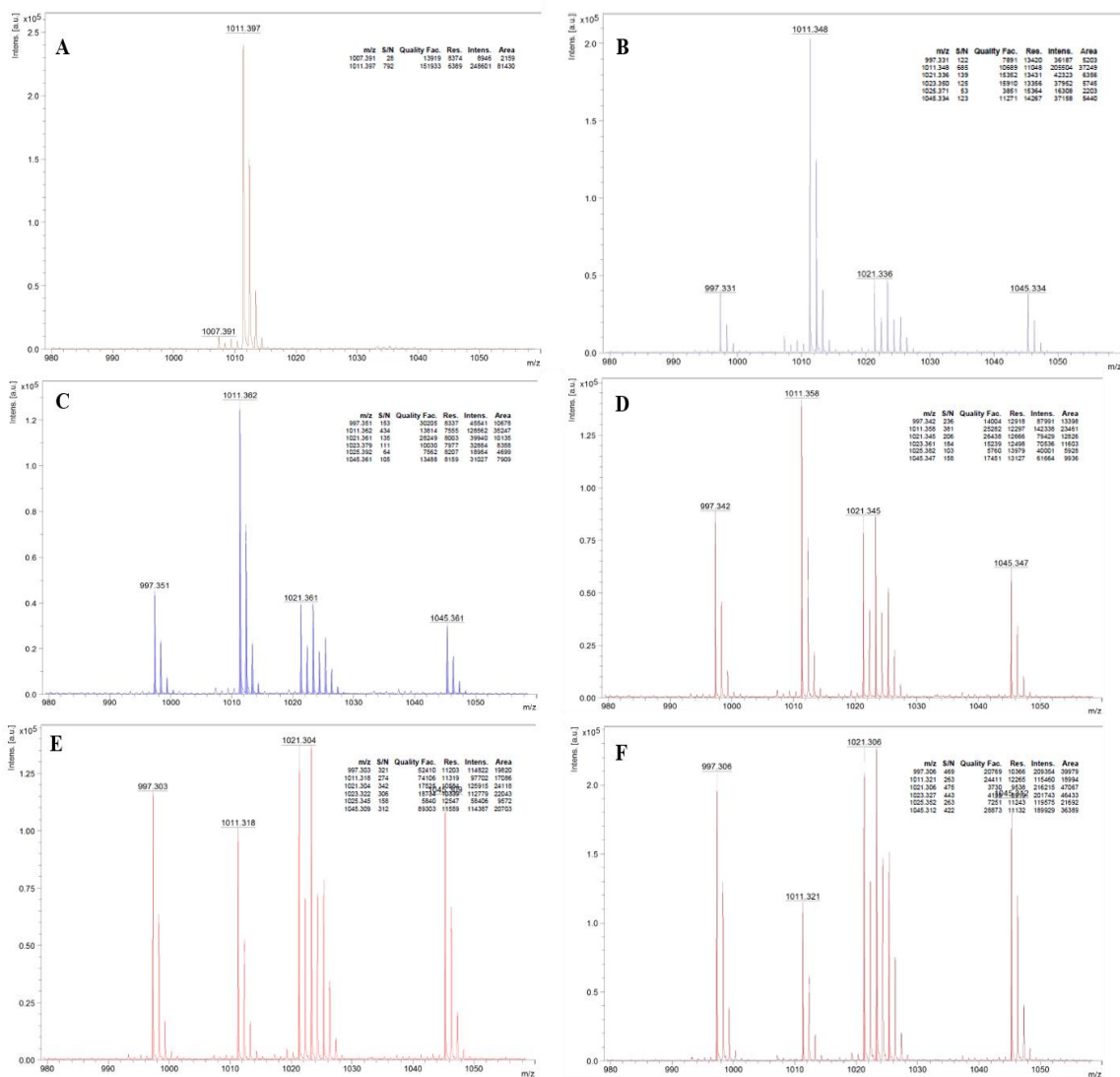


Figura 8: Espectros para los estándares de las especies de LPA para la recta de calibrado. A) Relación molar = 0; B) Relación molar = 0,125; C) Relación molar = 0,25; D) Relación molar = 0,5; E) Relación molar = 1; F) Relación molar = 2. (Anexo I).

Los datos de intensidad se obtuvieron por triplicado y en cada réplica se obtuvieron valores similares al anterior, demostrando la precisión del método. Por otra parte, dada la proximidad de R al valor de la unidad, puede comprobarse que el procedimiento cumple el criterio de linealidad. Además, los valores de las cantidades en tejido están dentro de los valores de referencia porque lo que se podría indicar que el procedimiento es preciso para la determinación de las intensidades.

3.2 Espectros en muestras de tejido

En la cuantificación de las especies de LPA en tejido cerebral, los datos se obtuvieron por triplicado y en cada réplica se obtuvieron valores similares al anterior. Se hicieron pruebas en tejido de hipocampo de ratón (figura 9) y de hámster (figura 10) para cantidades inferiores a 100 mg de tejido, observando que todas las especies de LPA están presentes. Así, a 997 m/z se encuentra la señal de 16:0, a 1025 m/z la de señal 18:0, a 1023 m/z la señal 18:1, 1021 m/z señal de 18:2 y finalmente, a 1045 la señal de la especie 20:4, similar a lo descrito por otros autores (Ma et al., 2013; Morishige et al., 2010; Tanaka et al., 2004). En las pruebas de extracciones de LPA en tejido de cerebro de más 100 mg también se obtuvieron todas las especies de LPA (Figura 11). Por último, se analizaron hipocampos de tejido de ratón (cepa 129X1/SvJ x C57BL/6J) tanto WT (Figura 12A) como maLPA1-nulo (Figura 12B), observándose especies de LPA en ambos genotipos.

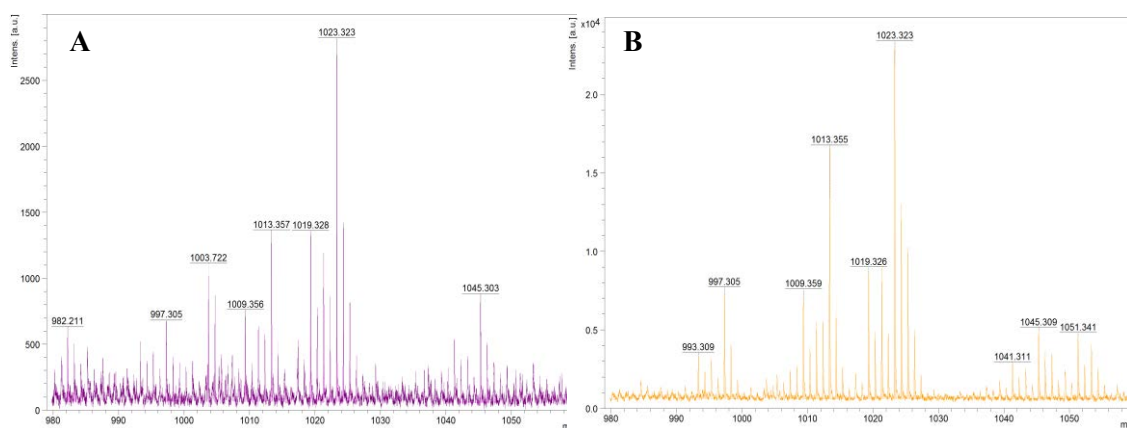


Figura 9: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos de las extracciones de tejidos inferior a 100 mg de hipocampo de ratón. A) Prueba con tejido de 33 mg B) Prueba con tejido de 44 mg. (Anexo II).

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

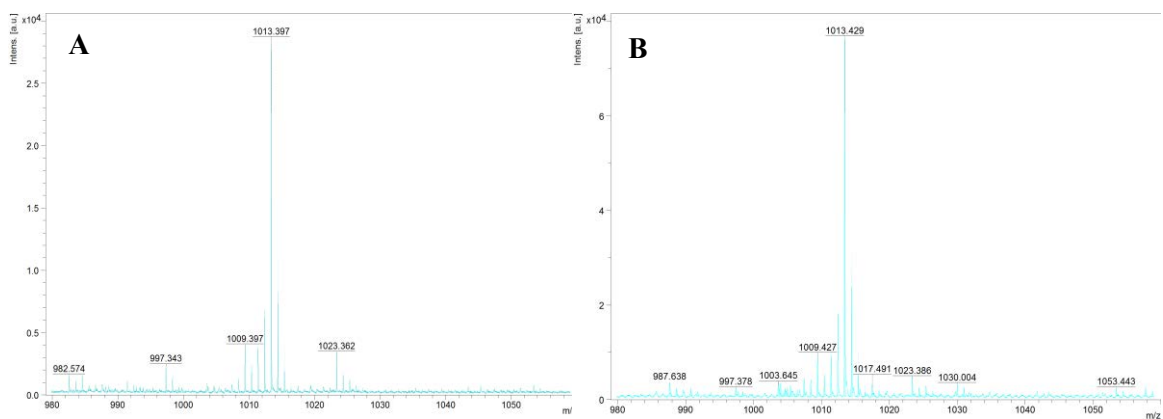


Figura 10: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos de las extracciones de tejidos inferior a 100 mg de cerebro de hámster. A) Prueba con tejido de 20 mg; B) Prueba de 100 mg. (Anexo III).

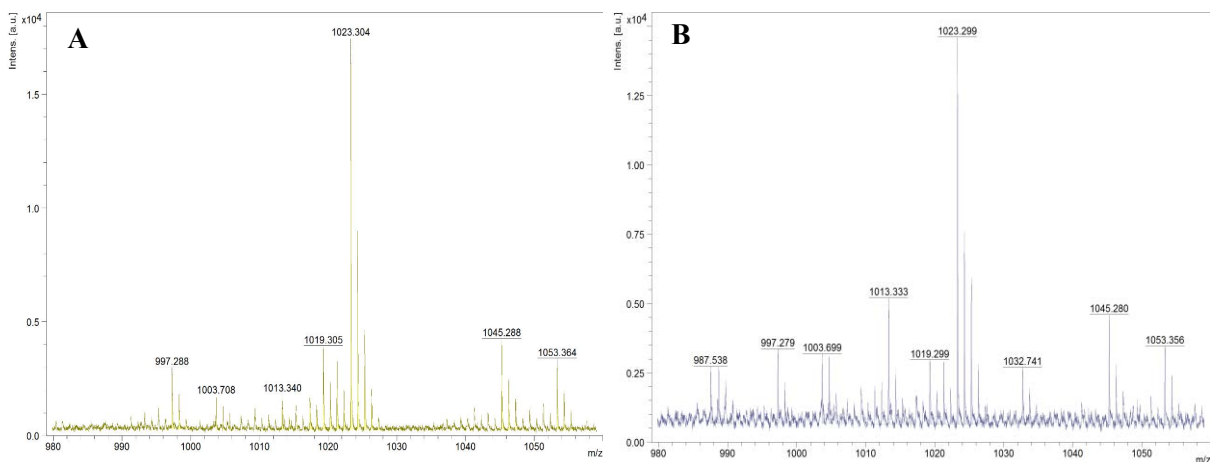


Figura 11: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos de las extracciones de tejidos de cerebro de ratón superior a 100 mg. A) Prueba con tejido de 456 mg; B) Prueba con tejido de 234 mg. (Anexo IV)

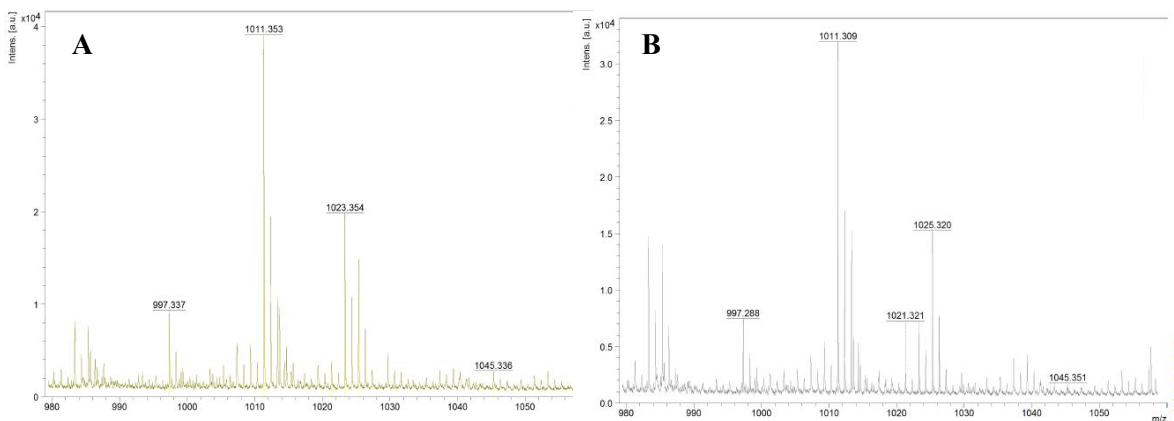


Figura 12: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidas de hipocampo de ratones de la cepa mixta 129X1/SvJ x C57BL/6J. A) WT; B) maLPA₁-nulo. (Anexo V)

3.3 Espectros en muestras en suero

Para las extracciones de las especies de LPA en 25 μ l de suero, en las pruebas realizadas en suero bovino fetal (figura 13) y en suero de conejo (figura 14) se observaron las distintas especies de LPA, en cambio, en la mayoría de las pruebas realizadas en suero de ratón se obtuvieron señales de ruido que no corresponden a las señales de las especies de LPA (figura 15), por lo que no fue factible la determinación de LPA en suero.

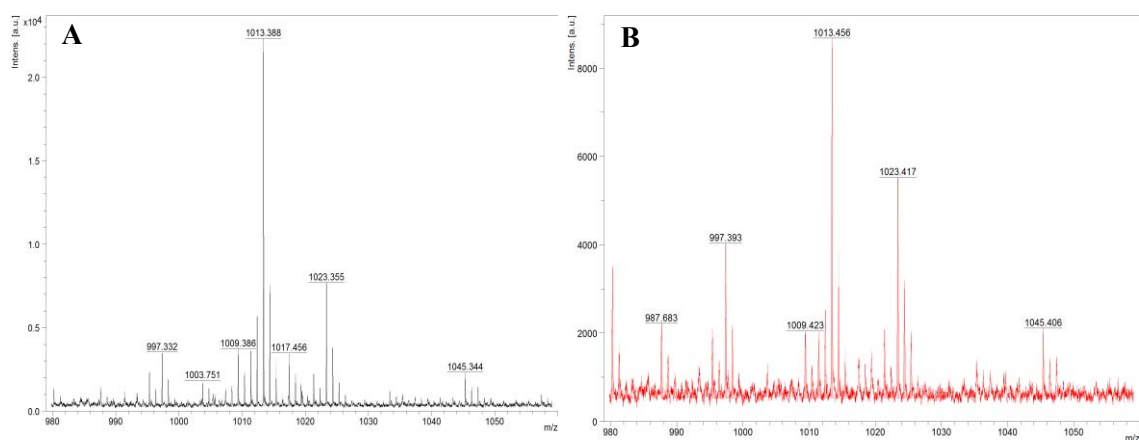


Figura 13: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos en 25 μ l suero bovino fetal. A) Prueba 1; B) Prueba 2. (Anexo VI).

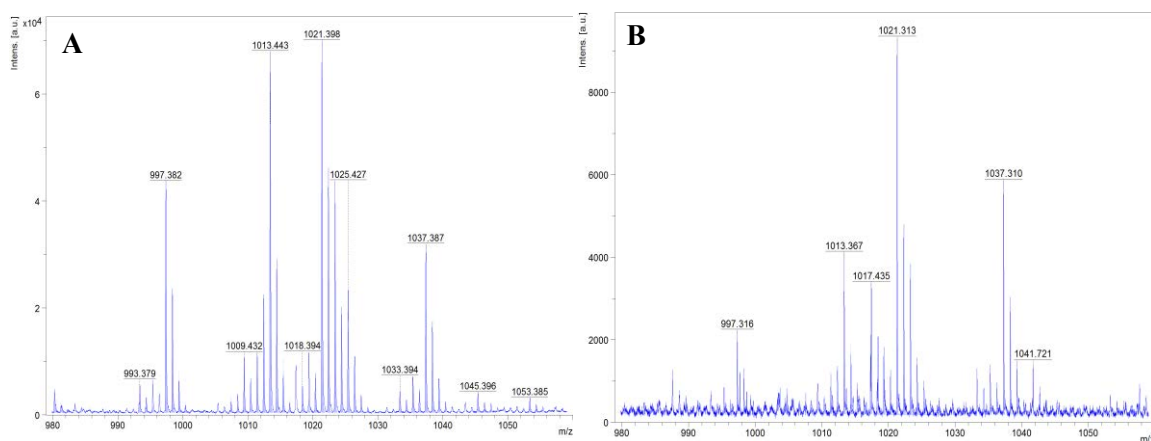


Figura 14: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos en 25 μ l suero de conejo. A) Prueba 1; B) Prueba 2. (Anexo VII).

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

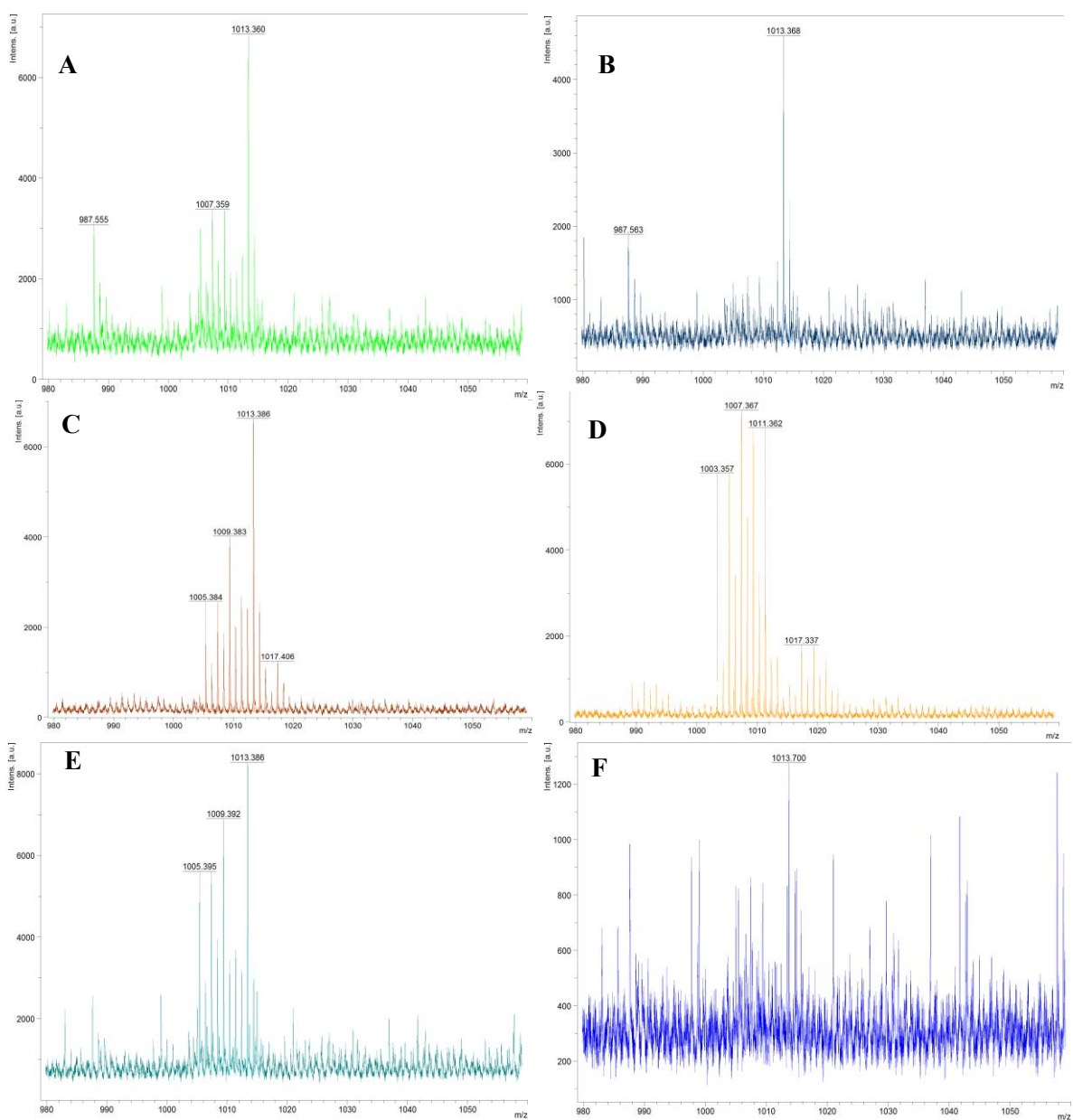


Figura 15: Espectros de las señales ruidos de las especies de LPA obtenidos en muestras de 25 μ l de suero de tres ratones diferentes. Como puede observarse, se obtuvieron señales de ruido para la determinación de las especies de LPA. Ratón 1: A) Prueba 1; B) Prueba 2. Ratón 2: C) Prueba 3; D) Prueba 4. Ratón 3: E) Prueba 5; F) Prueba 6. (Anexo VIII).

4. DISCUSIÓN

Para estudiar el impacto de diferentes estresores y de la ausencia del receptor LPA₁ en las especies de LPA, objetivos 2 y 3 de la presente tesis doctoral, ha sido indispensable poner a punto previamente el procedimiento de determinación de las diferentes especies de LPA, tanto en tejido (hipocampo), como en suero. Los procedimientos llevados a cabo han permitido verificar de forma sistemática, que el método utilizado es confiable y robusto para la determinación de las especies de LPA en tejido cerebral, no siendo así para las determinaciones en suero sanguíneo de ratones con fondo genético mixto 129X1/SvJ x C57BL/6J.

Las extracciones en tejido fueron optimizadas correctamente según la cantidad de masa analizada. Este procedimiento también puede llevarse a cabo para estudios futuros realizados en otras regiones cerebrales diferentes al hipocampo, que tengan una extensión mayor o menor que esta estructura límbica.

En nuestro estudio, a través del uso del MALDI-TOF, las diferentes especies de LPA fueron detectadas y cuantificadas con éxito. Sin embargo, a pesar de usar Phos-tag, que disminuye significativamente el límite de detención comparado con otros métodos que no lo usan (Morisheige et al., 2010; Tanaka et al., 2004), la especie 20:4 se encontró por debajo de los límites de detención, por lo que no se pudo cuantificar. Aunque no existen estudios previos que determinen y cuantifiquen las diferentes especies de LPA en hipocampo, en el caso de la médula espinal, se ha informado que la especie 20:4 también se encuentra por debajo del límite de detención usando el MALDI-TOF, incluso después de inducir daño en el nervio ciático, procedimiento que provoca un aumento del resto de especies de LPA en el asta dorsal de la médula espinal (Ma et al., 2013). Por este motivo,

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

la especie 20:4 ha sido eliminada de los análisis posteriores llevados a cabo para la consecución de los objetivos 2 y 3 de la presente tesis doctoral.

Por otro lado, en suero de ratón, los espectros de masas resultaron con poca señal y se percibió un exceso de ruido, además, estas señales no fueron constantes, no resultando reproducibles los valores obtenidos. En cambio, en las pruebas de suero bovino fetal y conejo, la detección de las distintas especies de LPA sí fue factible. Por tanto, a raíz de los resultados encontrados, podría decirse que, en el caso de las muestras de suero de ratón, la concentración de las especies de LPA está en valores inferiores a los detectables por el MALDI-TOF, mientras que, en las muestras de suero fetal bovino y conejo, las concentraciones están en niveles detectables. Por tanto, puede decirse que no se han detectado especies de LPA en suero de ratón debido posiblemente a los niveles de dichas especies y no al método en sí.

En definitiva, teniendo en cuenta la optimización del método, el procedimiento utilizado es útil para los objetivos perseguidos; en nuestro caso, para la determinación de las concentraciones de las diferentes especies de LPA en hipocampo. Así, tras la obtención de las curvas de calibrado, puede observarse la linealidad del método. Asimismo, tras la réplica del procedimiento, y teniendo en cuenta la poca bibliografía disponible al respecto (Yang & Han, 2016) podemos informar que el método es preciso. Por último, teniendo en cuenta los límites de detención, tal y como previamente se ha descrito (Ma et al., 2013), la especie 20:4 está por debajo de estos límites. Sin embargo, al menos en suero ratón con el fondo genético mixto 129X1/SvJ x C57BL/6J, dada la baja ratio señal-ruido obtenida, posiblemente por la poca disponibilidad de especies de LPA en el suero de ratón en esta cepa, que esté por debajo de los límites de detención

(Armbruster & Pry, 2008), no es posible hacer una determinación adecuada de las especies de LPA atendiendo a los criterios de linealidad, precisión y exactitud.

5. CONCLUSIONES

5.1 El protocolo de extracción y de cuantificación puesto a punto es óptimo para el estudio de las especies de LPA en hipocampo de ratón.

5.2 Las concentraciones de cada una de las especies de LPA en suero de ratón con el fondo genético mixto 129X1/SvJ x C57BL/6J parece estar por debajo de los valores detectables por la técnica MALDI-TOF.

Capítulo III: Puesta a punto de la técnica para la determinación de las especies de LPA en tejido y suero

CAPÍTULO IV: EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO EN LAS ESPECIES DE LPA EN HIPOCAMPO DE RATONES TIPO SILVESTRE Y CARENTES DE RECEPTOR LPA₁



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN

El LPA, en su conjunto, es un fosfolípido simple que participa en diversos procesos y funciones biológicas debido fundamentalmente, a que las diferentes especies que existen de LPA involucran a ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0), e insaturados, tales como el ácido oléico (18:1), linoléico (18:2) y araquidónico (20:4) (Aikawa et al., 2015; Hayashi et al., 2001; Sano et al., 2002; Yoshida et al., 2003), lo que sugiere que participan en múltiples vías sintéticas de producción de LPA (descritas anteriormente en el apartado de introducción).

En el sistema nervioso, el LPA parece funcionar como una molécula reguladora, actuando principalmente a través del receptor LPA₁ (Choi et al., 2010; Chun et al., 2013). La participación de este receptor en la modulación del comportamiento ha sido ampliamente examinada, informando que puede ser considerada como una importante molécula de señalización involucrada en la regulación del comportamiento (Castilla-Ortega et al., 2016, 2014, 2010; Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2018; Mirendil et al., 2015; Moreno-Fernández et al., 2018; Orio et al., 2013; Pedraza et al., 2014; Sánchez-Marín et al., 2018; Santin et al., 2009; Yamada et al., 2015). Aunque no debe ser descartada la participación de las moléculas de LPA sobre otros receptores, y sus vías de señalización, tales como el LPA₂ (Schneider et al., 2018; Trimbuch et al., 2009), LPA₃ (Uchida, Nagai, & Ueda, 2014; Ueda et al., 2018) y LPA₅ (Callaerts-Vegh et al., 2012; Tsukahara et al., 2018a) en la regulación de la conducta.

La distribución cerebral del receptor LPA₁ en las regiones de procesamiento de emociones y el uso de animales carentes del receptor LPA₁, proporcionan información esencial sobre la función de LPA en el cerebro, revelando que la vía LPA-LPA₁ está

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

involucrada en la regulación neurobiológica de los estados afectivos (Castilla-Ortega et al., 2011; Moreno-Fernández et al., 2017, 2018 a,b; Pedraza et al., 2014; Santín et al., 2009). De hecho, los ratones que carecen del receptor LPA₁ exhiben desregulación emocional, deterioro de la extinción de los recuerdos aversivos (Pedraza et al., 2014), un fenotipo ansioso (Castilla-Ortega et al., 2010; Moreno-Fernández et al., 2017; 2018b; Santín et al., 2009), alteraciones cognitivas en tareas dependientes de hipocampo (Castilla-Ortega et al., 2011, 2010; Santín et al., 2009) y un afrontamiento disfuncional en respuesta al estrés crónico (Castilla-Ortega et al., 2014). Así, varios estudios sugieren un papel del receptor LPA₁ en la regulación de los efectos del estrés en el hipocampo, dado que la ausencia de dicho receptor confiere vulnerabilidad al estrés crónico, precipitando la patología hipocampal (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012), agravando los cambios neuroplásticos inducidos por el estrés, como la reducción de la neurogénesis en adulto, el aumento de la apoptosis (Castilla-Ortega et al., 2011) y el aumento de los niveles de estrés oxidativo (García-Fernández et al., 2012).

Otros estudios, con enfoques genéticos y farmacológicos proporcionan evidencias que apoyan la hipótesis de que el receptor LPA₁ desempeña un papel esencial en la regulación de las emociones y el estado de ánimo. En este sentido, la inactivación de este receptor induce conductas similares a la depresión, con un componente de agitación que se ha asociado con cambios funcionales en regiones clave del cerebro involucradas en la respuesta al estrés y la regulación emocional (Pedraza et al., 2014; Moreno-Fernández et al., 2018 a, b).

Los estudios en curso, tanto en modelos animales como en humanos, están comenzando a revelar mecanismos mediante los cuales el receptor LPA₁ regula la emoción y la respuesta al estrés. Sin embargo, se desconoce el impacto que el estrés tiene

sobre las especies de LPA y el papel que juegan estas especies en la regulación de la emoción. Por ello, utilizando un enfoque basado en espectrometría de masas de MALDI-TOF, hemos evaluado el impacto de la deficiencia del receptor LPA₁ en los niveles hipocampales de diferentes especies de LPA (LPA 16:0, LPA 18:0, LPA 18:1 y LPA 18:2). Además, se ha evaluado el efecto de diferentes estresores agudos como: la exposición a la prueba conductual del laberinto elevado en cruz (EPM, que podría ser considerado un estresor leve) (Fodor et al., 2016; Mendes-Gomes et al., 2011), el estrés por inmovilización y la combinación de ambos estresores (inmovilización + EPM), en las concentraciones de las especies de LPA y en el perfil LPA hipocampal, tanto en ratones de tipo silvestre como en ratones maLPA1-nulos. Finalmente, debido a que la corticosterona (CORT) es uno de los principales mediadores del impacto del estrés en el cerebro y en el comportamiento, se midieron los niveles de esta hormona en sangre permitiendo comprobar la eficacia de los estresores.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales

Todos los experimentos que forman parte de este capítulo se realizaron con ratones machos de genotipo silvestre (*wild type*, WT; fondo C57BL/6 x 129X1/SvJ) y la variante Málaga de los ratones nulos para el receptor LPA₁ homocigotos para la delección (maLPA1-nulos, knockout) de aproximadamente tres meses de edad (Centro de Experimentación Animal y Conducta, Universidad de Málaga). La colonia de mutantes maLPA1-nulos, ha sido descrita en Estivill-Torrús et al., 2008. Los primeros mutantes de LPA₁ fueron generados por Contos et al., (2000), sobre un fondo genético mixto

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

(129X1/SvJ x C57BL/6J). El gen *Lpar1* se eliminó sobre células troncales embrionarias de la cepa 129X1/SvJ por delección del exón 3 que codifica los dominios I y VI del receptor (Contos et al., 2000). Los ratones resultantes se cruzaron con la cepa C57BL/6J hasta dar lugar a ratones homocigotos para la mutación. Para la confirmación de la ausencia del receptor LPA₁ se han usado técnicas de genotipado e inmunohistoquímica (Estivill-Torrús et al., 2008).

Durante todo el tiempo que duró el experimento, los ratones se mantuvieron en el Centro de Experimentación Animal y Conducta de la Universidad de Málaga, en condiciones estándar de ventilación, temperatura y disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*, con un ritmo circadiano de 12 horas de períodos luz/oscuridad con efecto amanecer anochecer.

Los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Málaga (CEUMA 2013-0008-A/ CEUMA: 1-2015- A, 08-7- 15-273) y de la Junta de Andalucía (08-7- 15-273), de acuerdo a la normativa legal vigente europea (European Communities Council Directives 2010/63/UE, 90/219/CEE, Regulation (EC) No. 1946/2003) y nacional: 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.

2.2 Diseño experimental

Para el estudio del efecto del estrés agudo, los animales de cada genotipo fueron distribuidos al azar en cuatro condiciones ambientales: 1) grupo control: animales en condiciones basales (N=5 WT; N=5 maLPA₁-nulos); 2) grupo EPM: animales que realizan la prueba conductual del laberinto elevado en cruz (EPM) durante 5 minutos (N=5 WT; N=8 maLPA₁-nulos); 3) grupo estrés agudo por inmovilización: animales

sometidos a estrés por inmovilización durante 1 hora (N=5 WT; N=5 maLPA1-nulos y 4) grupo estrés agudo por inmovilización más EPM: animales que han pasado por estrés por inmovilización durante 1 hora y por el test de conducta EPM (N= 6 WT; N= 8 maLPA1-nulos) (tabla 3). El protocolo experimental seguido se indica en la figura 16.

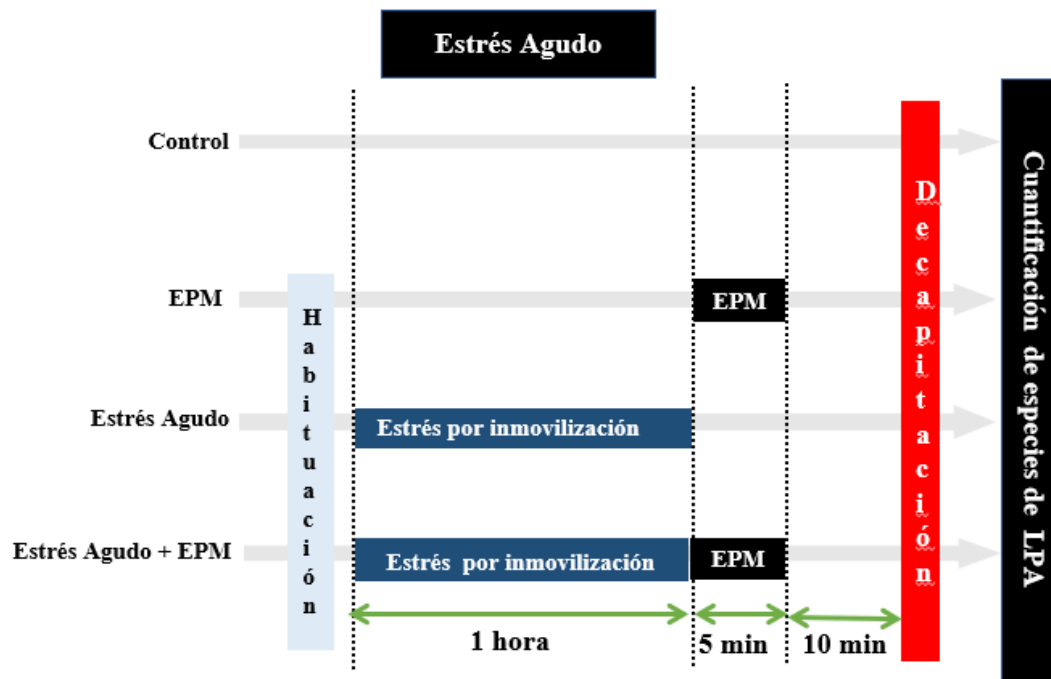


Figura 16: Diseño experimental. Seguido para estudiar los efectos de los tratamientos ambientales (control, estrés inducido por EPM, estrés por inmovilización y combinación de estrés por inmovilización y EPM) en los niveles hipocampales de LPA en ratones WT y maLPA₁-nulo.

Grupo	Test EPM	Estrés por inmovilización
Control		
EPM		
Inmovilización		
Inmovilización + EPM		

Tabla 3: Grupos experimentales. En la tabla se indica con cuadrados sombreados los tratamientos recibidos por cada grupo experimental.

2.3 Estrés Agudo

2.3.1 Laberinto elevado en cruz (EPM)

El laberinto elevado en cruz (EPM, de sus siglas en inglés elevated plus maze) es una prueba de comportamiento ampliamente utilizada, para evaluar las respuestas de ansiedad de los roedores (Pellow et al., 1985; Carobrez & Bertoglio, 2005; Walf & Frye, 2007). Sin embargo, también se puede considerar una prueba aversiva que induce aumentos moderados en los niveles de las hormonas del estrés (Fodor et al., 2016; Mendes-Gomes et al., 2011). Además, las condiciones de luminosidad en las que fue llevado a cabo, en las que existía un gran contraste de luminosidad entre brazos, de 90-100 lux en los brazos abiertos y de 25-30 lux en los brazos cerrados, puede tener efectos ansiogénicos (revisado en Violle et al., 2009).

El EPM consiste en dos brazos abiertos (30 cm de largo × 10 cm de ancho; 90-100 lux) y dos brazos cerrados (30 cm de largo × 10 cm de ancho × 15 cm de alto en las paredes; 25-30 lux) conectados a un área central común (10 cm × 10 cm) y se eleva 57 cm sobre el suelo (figura 17). Para la prueba, el animal se coloca en el área central del

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

aparato durante 5 minutos con el objetivo de que lo explore y sea evaluado (Becerra-García et al., 2007). A los 5 minutos de prueba, el animal se retira del aparato colándose en la jaula de estabulación. Las conductas mostradas por los animales durante la realización de la prueba se graban mediante una cámara digital. Para el análisis de las conductas exhibidas por los animales en el EPM se empleó el sistema de seguimiento de video Ethovision XT (Noldus, Wageningen, Países Bajos), y se evaluaron parámetros espacio-temporales: tiempo total de permanencia en cada brazo y número total de entradas en los brazos. En concreto, los parámetros analizados fueron: tiempo de permanencia en brazos abiertos (seg.), entradas en brazos abiertos (nº), latencia de entrada en uno de los brazos abiertos (seg.), número de entradas (nº) y la latencia de entrada en los extremos de los brazos abiertos (seg), velocidad (cm/seg.), locomoción total (cm.). Además, se calculó un índice de ansiedad utilizando la siguiente ecuación (Cohen et al., 2004; Contreras et al., 2014; da Costa Estrela et al., 2015) (Ecuación 6):

$$\text{Índice de ansiedad} = 1 - \left[\frac{\left(\frac{\text{tiempo brazos abiertos (seg)}}{\text{duración de la prueba (seg)}} \right) + \left(\frac{\text{número de entrada en los brazos abiertos}}{\text{total de número de entradas}} \right)}{2} \right] \quad (\text{Ec. 6})$$

El índice de ansiedad, para el cual los valores varían de 0 a 1, integra varias variables evaluadas en el EPM (Contreras et al., 2014). Una puntuación más cercana a 1 indica una mayor conducta de ansiedad.

La evaluación permite conocer el grado de ansiedad de los animales. Los brazos cerrados son considerados “más seguros” frente a los brazos abiertos que pueden ser considerados por los animales como más “amenazantes” (García et al., 2007). Una mayor exploración de los brazos abiertos indica bajos niveles de ansiedad, y a la inversa,

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

menores tiempos de exploración de estos brazos, junto con una menor frecuencia de entrada y tiempo de permanencia en dichos brazos, revela un aumento de los niveles de ansiedad (Pellow et al., 1985; Pellow & File, 1986).

Junto a los parámetros espacio-temporales evaluados con el sistema de registro de conducta (Ethovision XT, Noldus, Wageningen, Países Bajos), se evaluaron las conductas etológicas que mostraron los animales durante la duración de la prueba. Los parámetros registrados fueron los siguientes: exploración vertical o “rearing” (nº), acicalamiento o “grooming” (nº) (es uno de los comportamientos observados con mayor frecuencia en roedores despiertos y se considera como la presencia de comportamientos repetitivos, autodirigidos y de patrones secuenciales de higiene y cuidado personal), tiempo en el que animal permanece con la cabeza fuera de los límites de los brazos abiertos o “head dipping” (seg.) y conducta de valoración de riesgo (nº). Además, se midió la conducta de “freezing” considerada como el tiempo que pasó el animal completamente inmóvil durante la prueba EPM. La evaluación de riesgo puede definirse como posturas de estiramiento hacia los brazos abiertos de la EPM, posicionado desde los brazos cerrados (Bibancos et al., 2007; Nunes-de-Souza, Canto-de-Souza, & Rodgers, 2002; Sorregotti et al., 2013, 2018). Se consideró como entrada a un brazo cada vez que el animal traspasó la línea del brazo con las 4 patas.

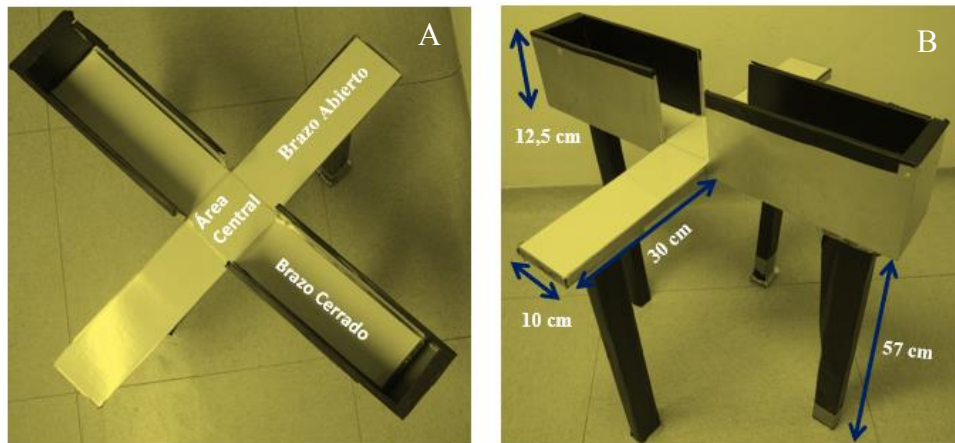


Figura 17: Laberinto elevado en cruz. Vista superior (A) y lateral (B) del aparato empleado en el estudio, mostrando las distintas zonas y dimensiones del laberinto.

2.3.2 Estrés por inmovilización

Los animales asignados a la condición de estrés por inmovilización fueron sometidos a 1 h de inmovilización, mientras que los animales controles permanecieron en sus jaulas en condiciones estándar.

Para la inmovilización se emplearon tubos de plexiglás de 50 ml modificados con agujeros para la cola del animal y para la ventilación (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012; Pedraza et al., 2014a; Zimprich et al., 2014). La adaptación de este protocolo ha mostrado ser eficaz para la inducción de alteraciones hipocampales (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012).

El estrés por inmovilización del animal puede ser considerado como un estresor psicológico (García et al., 2000; Magariños & McEwen, 1995b), que produce la activación del eje HHA (García et al., 2000; Magariños & McEwen, 1995b) y altera la conducta de los animales de laboratorio (Yun et al., 2010).

2.3.3 Estrés por inmovilización + EPM

Un grupo de animales (silvestres y maLPA1-nulos) fueron sometidos al protocolo de estrés por inmovilización durante 1 hora e inmediatamente después pasaron por la prueba de conducta EPM. Este procedimiento podría ser considerado más estresante que la aplicación aislada de los dos estresores.

2.4 Decapitación y extracción del hipocampo

Una vez finalizados los tratamientos experimentales, los animales fueron decapitados y el cerebro fue extraído. La extracción del hipocampo se realizó según los procedimientos descritos en el apartado 2.5 del capítulo 3 de la presente tesis doctoral.

2.5 Determinación de especies de LPA en tejido de hipocampo

Las extracciones de las especies de LPA se realizaron siguiendo el protocolo de extracción para LPA en tejido con una masa inferior a 100 mg, tal como se ha descrito en el capítulo III (figura 5, página 87). En cuanto a la cuantificación de las especies, se realizaron con técnicas de espectroscopía de masas mediante el equipo de MALDI-TOF (figura 6, página 90) tal y como se describe en el capítulo anterior (ver procedimiento en Capítulo III punto 2.7). Se calcularon las concentraciones de cada una de las especies de LPA en el hipocampo, la concentración total de LPA y la abundancia relativa de cada una de las especies.

2.6 Determinación de los niveles de corticosterona

Los ratones se decapitaron 10 minutos después de someterse al estrés agudo (EPM, inmovilización o inmovilización + EPM), recogiendo la sangre del tronco, que se dejó coagular para obtener muestras de suero. Para la medida de los niveles de corticosterona, las muestras de sangre se centrifugaron y el sobrenadante se almacenó a -80°C. Los niveles séricos de corticosterona se midieron utilizando un kit de inmunoensayo enzimático comercial, con una sensibilidad de aprox. 27.0 pg/ml, según las instrucciones del fabricante (Assay Designs / Stressgen, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.).

2.7 Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como medias \pm el error estándar de la media (S.E.M, del inglés standard error mean); $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el uso del paquete estadístico STATISTICA 8 («STATISTICA 8», 2007). Los análisis realizados para cada una de las variables dependientes se detallan a continuación.

2.7.1 Test de EPM

En las pruebas de comportamiento, tras la comprobación de la homogeneidad de la varianza con la prueba de Levene, se analizó la duración y la frecuencia de los comportamientos exhibidos por los animales de ambos genotipos durante la realización del EPM, la velocidad y el índice de ansiedad mediante ANOVA factorial en condiciones basales y de estrés agudo, seguido por el análisis LSD, cuando resultó necesario.

2.7.2 Cuantificación de LPA

Para la cuantificación de especies LPA, primero se evaluó el impacto de la deficiencia del receptor de LPA₁ en el perfil de LPA. Para ello, en condiciones de igualdad de la varianza, se usó la prueba t de Student para examinar las diferencias en las concentraciones totales de LPA y las concentraciones de cada especie de LPA entre los dos genotipos. Posteriormente, se procedió a determinar el efecto del estrés agudo, de diferente intensidad, en animales normales. El análisis estadístico de estos datos se llevó a cabo mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de mínimas diferencias significativas de Fisher (LSD). Finalmente, se examinaron los efectos de la interacción entre la deficiencia del receptor de LPA₁ y el estrés por inmovilización utilizando un ANOVA factorial con dos factores: genotipo (ratones WT o maLPA1-nulos) y tratamiento ambiental (control, EPM, estrés por inmovilización o estrés por inmovilización+EPM) seguido de análisis LSD cuando resultó necesario.

Estos análisis se realizaron tanto para la concentración como para el porcentaje de abundancia relativa.

2.7.3 Análisis de corticosterona

Las diferencias en los niveles de CORT entre los genotipos y los tratamientos ambientales (control, EPM y estrés de inmovilización) se analizaron mediante un análisis de ANOVA factorial seguido por el análisis LSD, cuando resultó necesario.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis conductual del EPM en ratones silvestres y carentes del receptor LPA₁

Los animales fueron evaluados en la prueba conductual EPM. En este estudio la prueba se usó con un doble propósito. Por un lado, se empleó como prueba conductual para medir parámetros de ansiedad y por otro, como un procedimiento de inducción de estrés. Por esta razón, cuando se hace referencia a las conductas mostradas por los animales en la prueba EPM, se indica un grupo control (animales que no han pasado previamente por ningún procedimiento) y grupo estrés (animales sometidos al procedimiento de estrés por inmovilización previo a la prueba EPM).

El comportamiento mostrado en la prueba por animales WT y maLPA1 fue diferente. En este sentido, en comparación con los WT, los ratones carentes de receptor LPA₁ mostraron un fenotipo ansioso, consistente con los estudios anteriores (Santín et al., 2009; Castilla-Ortega et al., 2010; Moreno-Fernández et al., 2017; 2018) (Figura 18). Los ratones maLPA₁-nulos pasaron significativamente menos tiempo en los brazos abiertos ($F(1, 23) = 4,79; p \leq 0,05$) (Figura 18B y C), mostrando además, un menor número de entradas a los brazos abiertos ($F(1, 23) = 10,13; p \leq 0,01$). De hecho, se observó un índice de ansiedad significativamente mayor en ratones que carecen del receptor LPA₁ ($F(1, 23) = 4,51; p \leq 0,05$) ($LSD \leq 0,05$) (Figura 18D). El análisis del número de entradas y la latencia de primera entrada en los extremos de los brazos abiertos, región considerada como la más aversiva del laberinto, revela diferencias entre los grupos ($F(1, 23) = 10,13; p \leq 0,005$ y $F(1, 16) = 5,23; p \leq 0,05$ respectivamente) (Figura 18 E y F). En este sentido, los animales controles del genotipo maLPA₁ presentaron un menor número de entradas

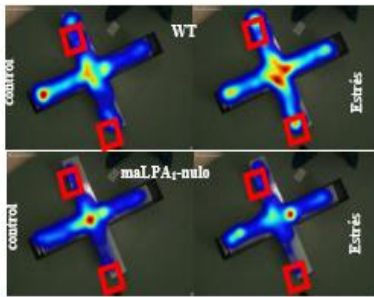
Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

y la latencia de la primera entrada fue significativamente mayor que la de los animales WT controles ($LSD \leq 0,05$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los animales de ambos genotipos sometidos al protocolo de estrés por inmovilización en el número de entradas y tiempo en los brazos abiertos, así como en el índice de ansiedad. En cambio, en animales maLPA1 nulos, el estrés aumentó significativamente el número de entradas y redujo la latencia para acceder a los extremos del laberinto ($LSD: p \leq 0,05$). Por otra parte, la distancia recorrida ($F(1, 23) = 15,51; p \leq 0,001$) y la velocidad promedio en la prueba de EPM fue menor también en los ratones carentes del receptor LPA₁ ($F(1, 23) = 16,50; p \leq 0,001$) ($LSD: p \leq 0,05$) (18G y H respectivamente), lo que indica, menos actividad exploratoria en estos animales. Sin embargo, el tiempo transcurrido en los brazos abiertos y cerrados no correlacionó con la distancia recorrida por los animales de los dos genotipos en condiciones basales ($r = -0,55; p > 0,5$ y $r = 0,41; p > 0,05$ para los brazos abiertos y cerrados, respectivamente, en ratones WT y $r = -0,15; p > 0,05$ y $r = 0,21; p > 0,5$ para brazos abiertos y cerrados, respectivamente, en ratones maLPA1-nulos).

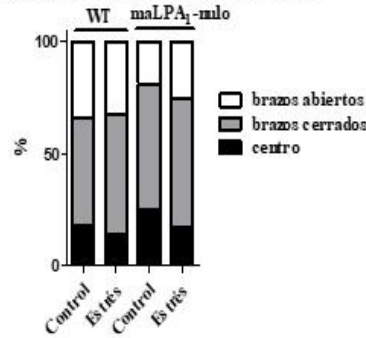
Con respecto a los parámetros etológicos, la ausencia del receptor LPA₁ indujo un aumento significativo en el comportamiento de evaluación del riesgo ($F(1, 23) = 7,03; p \leq 0,05$) ($LSD: p \leq 0,05$) y una disminución en el “head dipping” ($F(1, 23) = 15,25; p \leq 0,001$) ($LSD: p \leq 0,05$) (Figura 18N) y en el “rearing” ($F(1, 23) = 17,37; p \leq 0,001$) ($LSD: p \leq 0,05$) (Figura 18K). Por último, los ratones maLPA₁-nulos están más tiempo en estado “freezing” ($F(1,23) = 5,19; p \leq 0,05$) ($LSD: p \leq 0,05$) que los animales del genotipo WT (Figura 18J).

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA_1

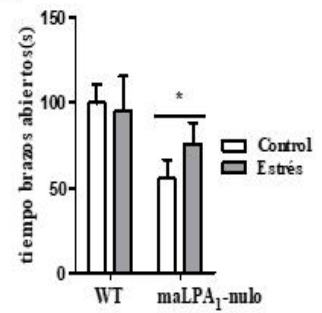
A) Exploración del aparato



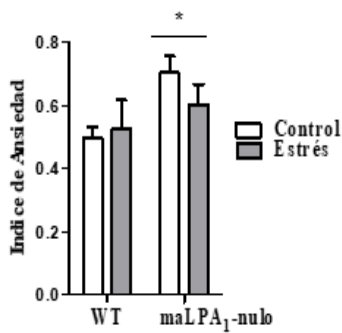
B) Tiempo en las secciones de EPM



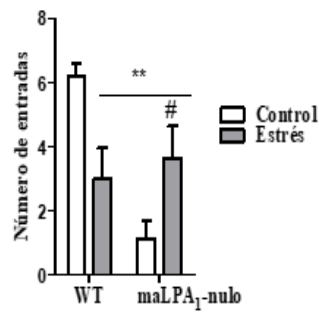
C)



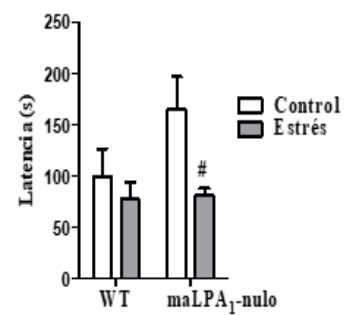
D)



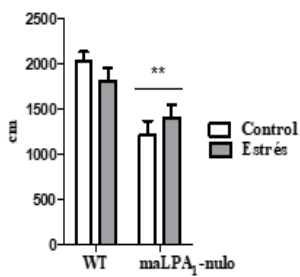
E) Extremos



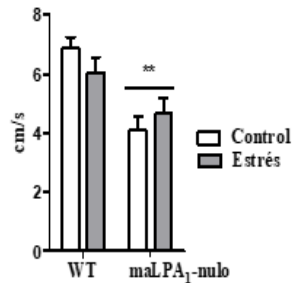
F) Extremos



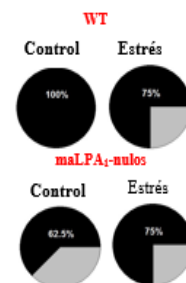
G) Distancia



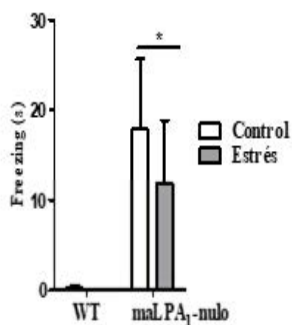
H) Velocidad



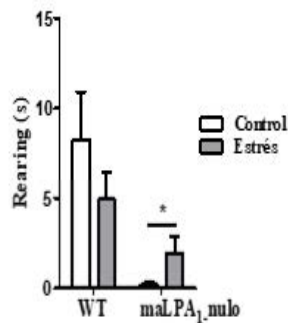
I) % de ratones que entran en los extremos de los brazos abiertos



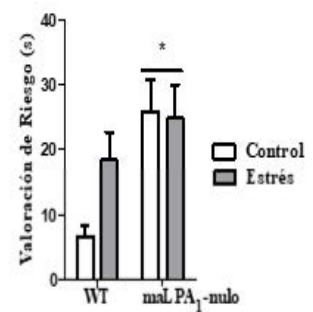
J)



K)



L)



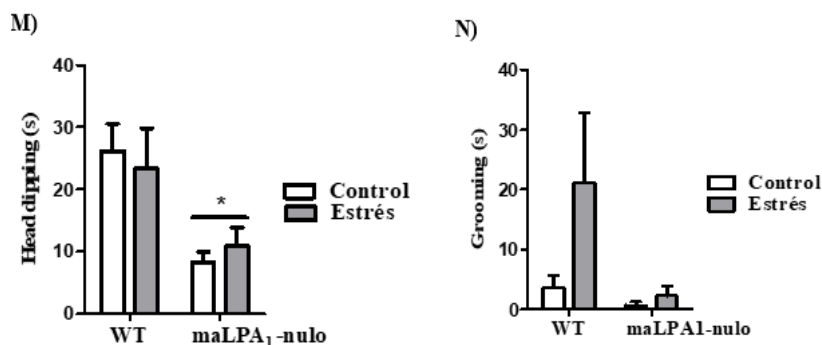


Figura 18: Conductas analizadas durante la prueba de EPM. Las gráficas muestran la valoración de cada conducta en laberinto elevado en cruz, para cada genotipo en condiciones basales o sometidos a estrés, expresadas como medias \pm SEM. A) Mapa compuesto de todos los trayectos recorridos durante la prueba EPM por cada genotipo. Los mapas se presentan como "mapas de calor", indicando los tiempos medios de permanencia según el código de color; los colores más cálidos indican tiempos de permanencia elevados en los diferentes compartimentos del EPM y los colores más fríos tiempos de permanencia bajos. B) Porcentaje de tiempo pasado en el EPM dividido por el porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos, brazos cerrados y centro. C) Tiempo de permanencia en el brazo abierto. D) Índice de ansiedad. E) Número de entradas en los extremos distales. (F) Latencia en los extremos. G) Distancia recorrida en el laberinto. H) Velocidad I) Porcentaje de tiempo en los extremos distales en relación con el tiempo total en los brazos abiertos. Parámetros etológicos: J) freezing, K) rearing, L) valoración de riesgo M) grooming, (K) head dipping. Se muestran los análisis *post hoc* LSD: diferencias entre genotipos WT y maLPA₁-nulo (* $p < 0,05$; ** $p < 0.01$) y diferencias entre tratamiento control y estrés en WT (# $p < 0,05$).

3.2 Determinación de especies de LPA en condiciones basales en ratones silvestres y carentes del receptor LPA₁

La ausencia del receptor LPA₁ no provocó cambios en las concentraciones totales de LPA ($t(8) = -0,12$, $p > 0,05$) (Figura 19A), ni en las concentraciones de ninguna de las especies de LPA examinadas en el hipocampo ($t(8) = 0,76$ $p > 0,05$; $t(8) = -0,7$, $p > 0,05$; $t(8) = 1,7$, $p > 0,05$; $t(8) = -0,96$, $p > 0,05$ para LPA 16:0 ; 18:0; 18:1 y 18:2, respectivamente) (Figura 19B).

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

Con respecto al porcentaje de abundancia relativa, en el hipocampo de los ratones carentes del receptor LPA₁ sólo se observaron cambios en la expresión de la especie LPA 18:0 ($t(8) = -3.51$, $p = 0,007$), sin cambios significativos en el porcentaje de la abundancia relativa del resto de especies evaluadas ($t(8) = 0.20$ $p > 0.05$; $t(8) = 0.5$, $p > 0.05$; $t(8) = 0.12$, $p > 0.05$; $t(8) = 0.36$, $p > 0.05$ para LPA 16:0; 18:0; 18:1 y 18:2, respectivamente) (Figura 19C). Tanto en los animales WT como en los maLPA₁-nulos, la especie LPA 18:0 fue la más abundante en el hipocampo, seguida de la especie 18:1. En cambio, la especie LPA 20:4 fue menos abundante en el hipocampo de ambos genotipos, lo que provocó un error de detección, por lo que fue eliminada de los análisis estadísticos llevados a cabo. En conjunto, estos datos sugieren que la ausencia del receptor LPA₁ no se asocia con cambios importantes en el perfil de lisofosfolípidos en el hipocampo.

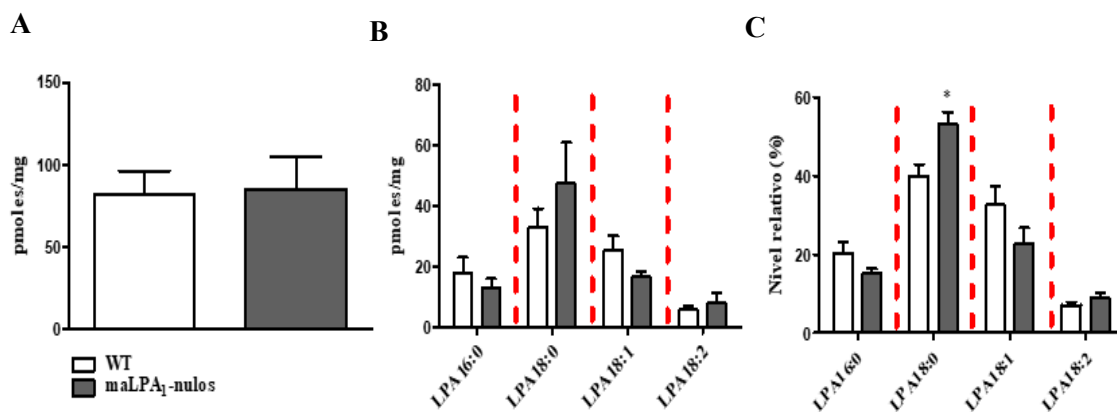


Figura 19: LPA en hipocampo de ratones en condiciones basales. A) Concentración total de LPA por genotipo. B) Concentraciones de las diferentes especies de LPA en WT y maLPA₁-nulos. C) Niveles relativos de especies de LPA según genotipo. La deficiencia del receptor de LPA₁ no se asocia con cambios importantes en el perfil de lisofosfolípidos en el hipocampo. Se muestran los análisis *post hoc* LSD: diferencias con el grupo WT (* $p < 0,05$ WT versus maLPA₁-nulos).

3.3 Determinación de las especies de LPA en condiciones de estrés agudo

Tras la exposición al estrés, se observó una gran alteración en las concentraciones de todas las especies de LPA y de LPA total en el hipocampo de los animales WT (Figura 20A y B). El ANOVA de una vía reveló los efectos del estrés sobre la concentración total de LPA ($F(3,17) = 5.70$; $p \leq 0.01$) y las concentraciones de todas las especies de LPA examinadas ($F(3,17) = 11.52$; $p \leq 0.001$ para LPA 16:0; $F(3,17) = 4.23$; $p \leq 0.02$ para LPA 18:0; $F(3,16) = 9.28$; $p \leq 0.001$ para LPA 18:1 $F(3,17) = 9.87$; $p \leq 0.001$ para LPA 18:2). El análisis post hoc mostró un aumento en las concentraciones totales de LPA después del estrés por inmovilización (LSD: $p \leq 0.05$), e inmovilización + EPM (LSD: $p \leq 0.06$). En relación a las diferentes especies analizadas, el LSD reveló que el estrés por inmovilización aumentó las concentraciones de todas las especies examinadas (LSD: $p \leq 0.001$ control versus animales estresados para cada una de las especies) y un aumento de las especies LPA 18:0 (LSD; $p \leq 0.001$) y LPA 18:2 (LSD: $p \leq 0.001$) en animales sometidos a estrés por inmovilización + EPM. En cambio, las concentraciones de las especies LPA 16:0 y LPA 18:1 se redujeron en animales sometidos a estrés por inmovilización + EPM, en comparación con los animales que sólo habían sido inmovilizados (LSD: $p \leq 0.001$). Sin embargo, el estrés provocado por la conducta EPM solo afectó a la concentración de la especie LPA 18:2 (LSD: $p = 0.02$).

Con respecto a los efectos del estrés en el porcentaje de abundancia relativa, se observó una reducción de la especie LPA 18:1 ($F(3, 16) = 5.79$; $p \leq 0.01$) en animales que fueron sometidos a EPM (LSD; $p \leq 0.05$) e inmovilización + EPM (LSD: $p \leq 0.01$), en relación al grupo control. En cambio, el porcentaje de abundancia relativa de la especie LPA18:2 aumentó tras la exposición a EPM ($F(3, 17) = 7.97$; $p \leq 0.01$). En este sentido,

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

el estrés EPM (LSD: $p \leq 0.01$) y el estrés por inmovilización + EPM, aunque sin alcanzar las diferencias estadísticamente significativas (LSD; $p=0.08$), aumentaron sus valores en relación al grupo control. Sin embargo, el estrés por inmovilización no modificó los niveles de abundancia relativa de las especies de LPA del hipocampo (LSD: $p > 0.05$) (Figura 20 C).

Teniendo en cuenta todos los datos, se puede decir que el estrés por inmovilización fue el tratamiento que mayor cambio produjo en las concentraciones de LPA en hipocampo (Figura 20 A y B), en cambio el estrés por exposición al EPM tuvo una mayor incidencia en las proporciones de las especies relativas (Figura 20 C).

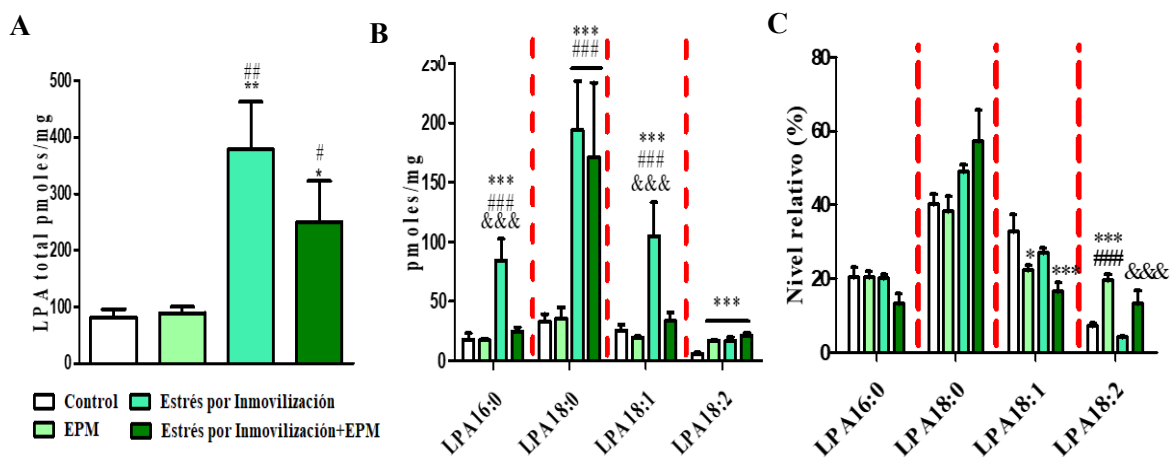


Figura 20: LPA en condiciones de estrés en ratones WT. A) Concentración total de LPA por condición experimental. B) Concentraciones de las especies de LPA por condición experimental. C) Niveles relativos de las especies de LPA. El estrés por inmovilización con y sin EPM produjo cambios importantes en las concentraciones de LPA del hipocampo. Sin embargo, el estrés EPM tuvo una mayor incidencia en las proporciones relativas de las especies. Se muestran los análisis *post hoc* LSD: (* $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; diferencias respecto al control) (# $p < 0,05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; diferencias respecto al estrés inducido por EPM) y (& $p < 0,05$; && $p < 0.01$; &&& $p < 0.001$; diferencias respecto al estrés inducido por inmovilización).

3.4 Efectos de la ausencia del receptor LPA₁ y de diferentes estresores agudos en el perfil de LPA hipocampal

Debido a que el animal maLPA₁-nulo exhibe una mayor vulnerabilidad al estrés (Castilla-Ortega et al., 2011), se examinaron los efectos del estrés y la deficiencia del receptor LPA₁ en el perfil de LPA del hipocampo (Figura 21). Se observó un efecto de estrés x genotipo sobre la concentración total de LPA ($F(3,39) = 3.98$; $p \leq 0.01$) y en la concentración de la especie LPA 18:0 ($F(3,37) = 3.34$; $p \leq 0.05$). Los análisis a posteriori revelaron una concentración mayor de LPA total en el hipocampo en los animales del genotipo WT sometidos a estrés por inmovilización seguido o no de EPM en comparación con los animales maLPA₁-nulos sometidos al mismo protocolo de estrés (LSD; $p \leq 0.001$ o $p \leq 0.01$, estrés por inmovilización o estrés por inmovilización + EPM, respectivamente). El estrés EPM no afectó a las concentraciones totales de LPA hipocampal. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el genotipo maLPA₁-nulo en ninguna de las condiciones de estrés (LSD: $p > 0.05$) (Figura 21A).

En cuanto a las concentraciones de las especies de LPA (Figura 21B), se observaron diferencias en los tratamientos en la especie 16:0 ($F(3, 39) = 9,16$; $p \leq 0.001$). En este sentido, el estrés por inmovilización provocó un aumento en las concentraciones de la especie LPA 16:0 en ambos genotipos (LSD: $p \leq 0.001$). Con respecto a la especie 18:0 los análisis revelaron diferencias entre tratamientos ($F(3,37) = 4,82$; $p \leq 0.01$) y en la interacción genotipo x tratamiento ($F(3,37) = 3,34$; $p \leq 0.05$). El análisis post hoc puso de manifiesto que el estrés por inmovilización, independientemente de si los animales pasaron o no por la prueba EPM, aumentó la concentración de dicha especie, pero sólo en los animales WT (LSD: $p \leq 0.01$). La prueba EPM no provocó ningún cambio en las concentraciones de esta especie en ninguno de los genotipos (LSD: $p > 0.05$), aunque el

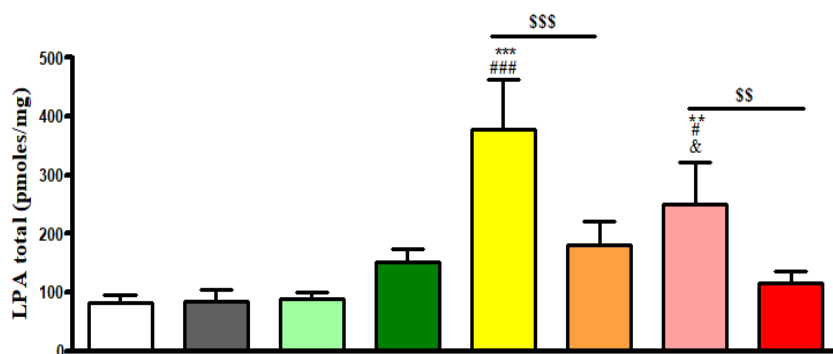
Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

estrés por inmovilización + EPM aumento la concentración de dicha especie en WT en comparación con el genotipo maLPA₁-nulo (LSD: $p \leq 0.05$). En relación a la especie 18:1, se observó un efecto del estrés en la concentración ($F(3, 37) = 16.89$; $p \leq 0.001$), observándose, tanto en WT como en maLPA₁-nulos un aumento en la concentración de dicha especie tras el estrés por inmovilización (LSD $p \leq 0.0001$ para WT y $p \leq 0.001$ para maLPA₁-nulo versus su control). Asimismo, los datos revelaron diferencias entre los grupos debido al estrés en las concentraciones de la especie LPA 18:2 ($F(3, 39) = 3.35$; $p \leq 0.05$). Estas diferencias fueron observadas en los grupos que habían pasado por EPM (con o sin inmovilización), aunque sólo se alcanzó la significación estadística en el caso de los animales maLPA₁-nulos (LSD: $p \leq 0,05$ para maLPA₁-nulo y WT con LSD; $p = 0.075$).

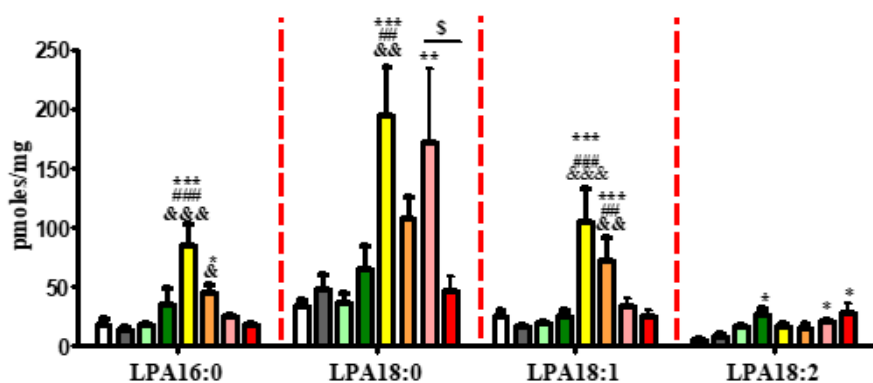
Tras la normalización de las concentraciones de lípidos, no se observaron efectos de interacción (genotipo x estrés) en ninguna de las especies examinadas, aunque sí un efecto del estrés. Así, el estrés afectó a los niveles relativos de las especies 18:1 ($F(3, 37) = 4.75$; $p \leq 0.01$) y 18:2 de LPA ($F(3,39) = 6.11$; $p \leq 0.01$) (Figura 21C y D). Los análisis LSD pusieron de manifiesto estas diferencias entre los grupos con estrés EPM y el grupo control (LSD: $p \leq 0.05$ tanto para WT como para maLPA₁-nulos). Para el caso de la especie 18:2 se observó un aumento del porcentaje de abundancia relativa en el grupo maLPA₁-nulo con estrés por inmovilización + EPM respecto al grupo control del mismo genotipo (LSD: $p \leq 0.01$).

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

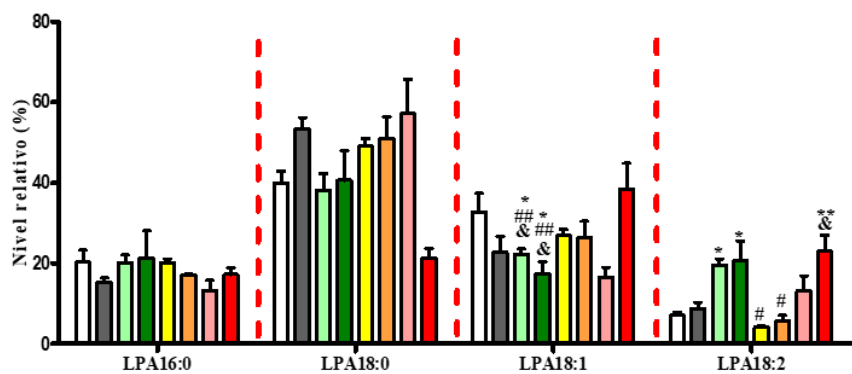
A



B



C



Control (WT)
 EPM (WT)
 Estrés por Inmovilización (WT)
 Estrés por Inmovilización+EPM (WT)

Control (maLPA₁-nulo)
 EPM (maLPA₁-nulo)
 Estrés por Inmovilización (maLPA₁-nulo)
 Estrés por Inmovilización+EPM (maLPA₁-nulo)

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

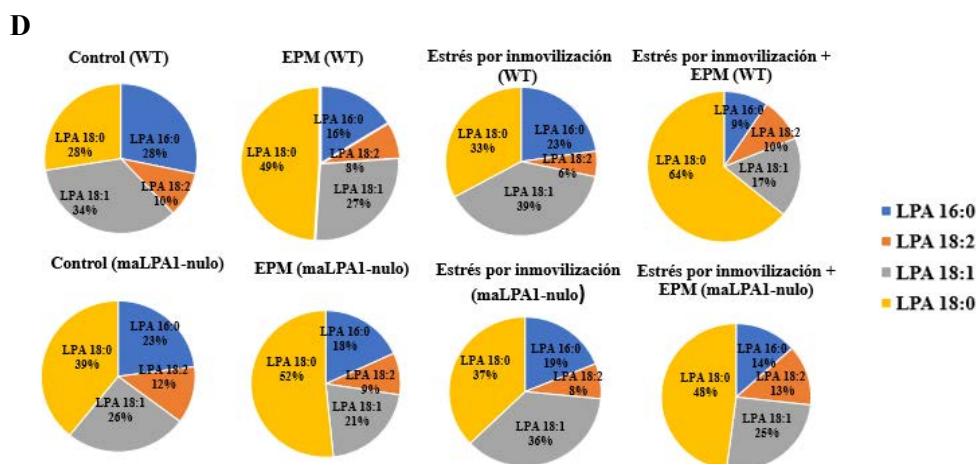


Figura 21: Efectos de la ausencia del receptor LPA₁ y de diferentes estresores agudos en las concentraciones y el perfil de LPA en el hipocampo. A) Concentración de LPA total. B) Concentraciones de las especies de LPA. C) Niveles relativos de las especies de LPA. D) Porcentaje de las especies de LPA. Se muestran los análisis *post hoc* LSD: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; diferencias respecto al control de cada genotipo (WT o maLPA₁-nulo), (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; diferencias respecto al estrés inducido por EPM), (& $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$; diferencias respecto al estrés inducido por inmovilización) y ($^{\$}p < 0,05$; $^{\$\$}p < 0,01$; $^{\$ \$ \$}p < 0,001$; diferencias entre genotipos).

3.5 Determinación de los niveles de corticosterona

El análisis de los niveles de corticosterona (CORT) en sangre no reveló diferencias significativas entre genotipos en la situación basal, ni después de ninguna de las condiciones de estrés ($F(1,39) = 0.39$; $p > 0.05$). Sin embargo, en ratones WT y maLPA₁-nulo, el estrés por inmovilización aumentó significativamente los niveles de CORT ($F(1,39) = 12.92$; $p \leq 0.001$;) en comparación con sus respectivos controles y con los niveles de los animales que habían pasado por la prueba EPM (LSD: $p \leq 0.01$).

Sorprendentemente, también se observaron diferencias en los niveles de CORT entre estrés por inmovilización y combinación del estrés por inmovilización y la prueba de EPM, que resultó significativamente menor que en la situación de estrés por inmovilización (LSD; $p \leq 0.01$). Asimismo, los animales del genotipo maLPA₁-nulos que

pasaron por el estrés EPM y estrés por inmovilización + EPM presentaron unos niveles significativamente más elevados de CORT con respecto a su grupo control, ((LSD; $p \leq 0.05$) (Figura 22).

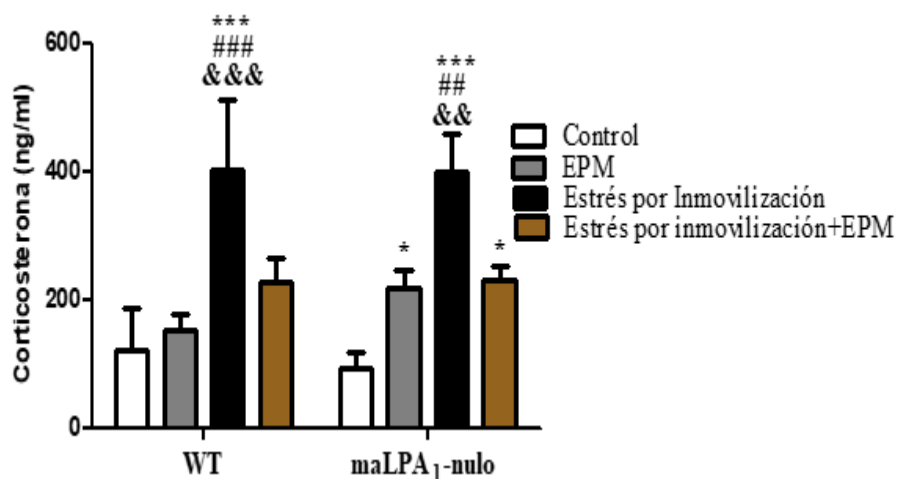


Figura 22: Concentración de corticosterona en suero. El estrés por inmovilización produjo un aumento en los niveles de corticosterona en sangre en ambos genotipos, en comparación con el grupo control y con el resto de grupos experimentales. Diferencias respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$); diferencias respecto al estrés inducido por EPM (# $p < 0,05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$) y diferencias respecto al estrés inducido por inmovilización + EPM (& $p < 0,05$; && $p < 0.01$; &&& $p < 0.001$).

4. DISCUSIÓN

Se han caracterizado los efectos de la manipulación genética y la exposición a diferentes estresores ambientales de carácter agudo, como la exposición al test EPM, la inmovilización o la combinación de inmovilización y EPM, en los niveles de especies de LPA en el hipocampo.

Como se ha comentado, el LPA es una importante molécula de señalización en el cerebro que participa en múltiples acciones fisiológicas y condiciones fisiopatológicas

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

(Aoki, 2004; Fukushima et al., 2001; Ishii et al., 2004; Tigyi & Parrill, 2003). Las funciones biológicas de las especies de LPA están asociadas a receptores específicos acoplados a proteínas G denominados LPA₁₋₆ (Choi & Chun, 2013). Estos receptores se expresan en el cerebro y pueden estar involucrados en la regulación de la conducta emocional, especialmente los receptores LPA₁ (Castilla-Ortega et al., 2011; Moreno-Fernández et al., 2017, 2018; Pedraza, et al., 2014; Santin et al., 2009); LPA₂ (Schneider et al., 2018), LPA₃ (Uchida et al., 2014; Ueda et al., 2018) y LPA₅ (Callaerts-Vegh et al., 2012; Tsukahara et al., 2018). Las especies de LPA que contienen ácidos grasos de cadena larga tanto saturados como insaturados (por ejemplo, C16 y C18) pueden activar los receptores de LPA₁ (Bandoh et al., 2000). Sin embargo, tal como muestran los resultados obtenidos, la deficiencia del receptor de LPA₁ no indujo alteraciones graves en las concentraciones totales de LPA, ni de sus diferentes especies en el hipocampo. En otros animales que carecen de receptores para el LPA, en concreto el receptor 3, sí se han observado cambios en la producción de LPA inducida por LPC (Ma et al., 2009). Sin embargo, en contra de lo esperado, la ausencia del receptor LPA₁ no afectó a la producción de dicho lípido. De hecho, los niveles de LPA en el hipocampo de ratones carentes de LPA₁ fueron similares a los observados en animales WT. Así, estos datos, junto con las evidencias acumuladas con animales que carecen de receptores para LPA podría afirmarse que el receptor LPA₃ es un determinante importante de la síntesis de LPA (Ma et al., 2009). El receptor LPA₂, aunque en menor medida, también podría contribuir a la producción de LPA (Zhao et al., 2009). Sin embargo, al menos en el hipocampo, el receptor LPA₁ no parece desempeñar un papel crucial en la síntesis de LPA. Sin embargo, dado que el patrón de LPA del hipocampo se modifica ligeramente en los ratones maLPA₁-nulos, con un aumento significativo de los niveles relativos de la

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

especie LPA 18:0 saturada, una hipótesis razonable sería que la deficiencia del receptor de LPA₁ puede modificar la actividad catalítica de la fosfolipasa A1 (PLA1) y fosfolipasa A2 (PLA2), enzimas responsables de producir especies de LPA (Aoki et al., 2008). Sin embargo, otras vías no pueden ser excluidas. Entre estas otras vías puede situarse la mediada por ATX. En este sentido, aunque con excepciones, estudios recientes sugieren que ATX puede producir diferentes grupos de especies de LPA (Nikitopoulou et al., 2013). Además, diferentes especies de LPA pueden activar ATX/lisoPLD para dar lugar a diferentes especies de lisofosfatidilcolina (LPC) que darían lugar a diferentes cadenas de precursores de LPA (Salgado-Polo et al., 2018). Sin embargo, estas hipótesis deben interpretarse con cautela y es necesario realizar más estudios para determinar qué está provocando estas diferencias en el perfil de las diferentes especies de LPA en el hipocampo en ausencia del receptor LPA₁ (Aoki et al., 2008).

Por otro lado, el estrés, particularmente el protocolo de estrés por inmovilización, sólo o combinado con EPM, provocó un aumento en la concentración total de LPA en el hipocampo y produjo cambios en las concentraciones de diferentes especies de LPA. Aunque sorprendentemente, los cambios fueron menores en los animales sometidos a estrés por inmovilización + EPM. Diferentes hipótesis pueden ser propuestas para explicar estos efectos, pero quizás la más razonable es que en ambos grupos se observa un efecto de la inmovilización, en cambio el procedimiento de exposición al EPM apenas produce cambios en las concentraciones de LPA. En los animales sometidos a inmovilización + EPM transcurre mayor tiempo entre la finalización del estresor y la extracción de los cerebros, por lo que un cambio menor en las concentraciones de LPA podría ser debido al efecto del paso del tiempo. Sin embargo, esta hipótesis hay que tomarla con cautela y más estudios son necesarios para comprobar estas diferencias entre

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

los dos grupos en las concentraciones de LPA. Sin embargo, estos datos revelan que el sistema LPA del hipocampo resulta afectado tras el estrés y las concentraciones de LPA y de todas sus especies aparecen especialmente afectadas tras el estrés por inmovilización. Así, aunque el EPM aumentó la concentración de la especie LPA 18:2, el estrés por inmovilización afectó sustancialmente a todas las especies de LPA examinadas. Los cambios en la concentración de LPA 18:2, en el grupo EPM e inmovilización + EPM podría explicar el aumento en la abundancia relativa de la especie LPA 18:2, lo que a su vez provoca un cambio en el perfil LPA.

En resumen, el estrés por inmovilización provocó un aumento significativo en las concentraciones de LPA y de todas las especies examinadas en el hipocampo. En cambio, el EPM modificó el perfil de las especies de LPA en el hipocampo, al inducir un aumento de la especie LPA18:2 y reducir las concentraciones de la especie 18:1. El estrés por inmovilización + EPM, también afectó el perfil de LPA hipocampal al aumentar los niveles relativos de la especie 18:2. Aunque estos efectos se observaron tanto en animales WT como maLPA₁, fueron menos drásticos en ausencia del receptor LPA₁.

La exposición al estrés aumenta la liberación de GC, que induce una gran cantidad de efectos patológicos, especialmente cuando se prolonga en el tiempo (Joëls, 2018). Los GC pueden modificar la composición de lípidos en hipocampo. En este sentido, un estudio reciente puso de manifiesto un aumento de glicerofosfolípidos, tales como PC, PCE, PE y PC en el hipocampo ventral, mientras que los niveles de PA se redujeron tras la administración de glucocorticoides (Miranda et al., 2019). Curiosamente, nuestros datos revelan que el estrés por inmovilización aumenta las concentraciones de las especies de LPA procedentes varias vías sintéticas en la que los principales precursores son el LPC

y el PA entre otros. Sobre las especies LPC actúa específicamente la autotaxina (ATX). El aumento en las concentraciones de LPA observado en nuestro estudio, podría deberse, al menos en parte, a un aumento en la expresión y/o actividad de la ATX. En este sentido, se ha observado una fuerte correlación entre las concentraciones de LPA y los niveles de esta enzima (Nakamura et al., 2008; Watanabe et al., 2007).

En nuestro estudio, dado que el estrés altera la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHA) y aumenta los niveles de CORT (Boettcher et al., 2017; Kofman, 2002; McEwen et al., 1999; Sapolsky, Meaney, & McEwen, 1985), se determinaron las concentraciones de esta hormona. En ambos genotipos, después del estrés por inmovilización, se observó un aumento significativo en los niveles de CORT. En los animales maLPA1 nulos, tanto el estrés EPM como la inmovilización + EPM provocó un aumento en los niveles de CORT con respecto a su control, pero sorprendentemente, no se observaron diferencias entre los genotipos después de la exposición al estrés agudo, como anteriormente se ha descrito (Pedraza et al., 2014). Las diferencias en el procedimiento experimental probablemente expliquen las diferencias entre los estudios (es decir, en el estudio inicial se usó un periodo de inmovilización de 30 min, en cambio en nuestro estudio el periodo fue de 60 min). Además, el tiempo transcurrido desde la aplicación del estresor, hasta la extracción de sangre fue diferente (0 min, frente a 10 min usado en el presente estudio). Dado que los niveles de CORT en plasma disminuyen progresivamente con el tiempo después del estrés de inmovilización (Shafiei et al., 2012; Uchida et al., 2010), el tiempo transcurrido entre la aplicación del estresor y la extracción de sangre podría explicar las diferencias entre estudios. Sin embargo, este aumento en los niveles de CORT podría revelar la causa del aumento en las concentraciones de LPA hipocampal. Así, se ha observado que la administración de dexametasona, un análogo sintético

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

de la CORT, en cultivos celulares, aumenta los niveles de ARNm y proteína ATX, y la secreción de la misma (Honjo et al., 2018), pudiéndose concluir que un aumento en los niveles de CORT aumentaría los niveles de ATX y su actividad enzimática. Además, después del estrés leve (EPM), se modificó el perfil de LPA del hipocampo, pero no los niveles de LPA. Aunque ATX puede estar involucrada en el mecanismo subyacente a las diferencias observadas, no se observaron cambios en los niveles de CORT en animales sometidos a un estrés por EPM y, por lo tanto, también podrían estar involucradas vías adicionales (Tanaka et al., 2006; Meeteren et al., 2006) lo que podría explicar el aumento limitado en los niveles de LPA en ratones WT en comparación con los cambios inducidos por el estrés por inmovilización. Se necesitan estudios adicionales para aclarar los mecanismos subyacentes responsables del aumento en las concentraciones de LPA después del estrés ocasionado por la inmovilización, los cambios en el perfil de LPA provocados por el EPM y los efectos de la combinación de ambos estresores. Pero sin lugar a dudas, las alteraciones metabólicas que se producen en las especies de LPA en el hipocampo después de un estrés agudo, conducen a una cascada de eventos moleculares dentro de esta región del cerebro, que sería responsable, al menos en parte, de los efectos negativos del estrés en el hipocampo (Sood, Chaudhari & Vaidya, 2018).

Por otro lado, como se esperaba, la deficiencia de receptor LPA₁ provocó un fenotipo ansioso en el EPM (Castilla-Ortega et al., 2010; Moreno-Fernández et al., 2017,2018; Santín et al., 2009). Como se ha observado en estudios anteriores, los animales maLPA₁ mostraron un alto índice de ansiedad y una baja actividad exploratoria del laberinto (Castilla-Ortega et al., 2010; Santín et al., 2009), junto con un menor porcentaje de entradas en los extremos de los brazos abiertos (62% frente a 100% de WT) y un menor tiempo de permanencia en los mismos, lo que indicarían que estos animales

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

exhiben una conducta con un perfil ansioso en el laberinto. En la misma línea, los ratones maLPA₁-nulos exhiben una mayor conducta de “freezing”, de evaluación del riesgo, menor tiempo de exploración vertical y menor número de “head dipping”, que avalan el perfil ansioso de estos animales y que podría ser indicativo de una hiperreactividad emocional en ausencia del receptor LPA₁ (Moreno-Fernández et al., 2017, 2018; Pedraza et al., 2014).

Por otro lado, aunque la participación del receptor LPA₁ en la regulación de la emoción y en la aparición de ansiedad es un hecho establecido, no se ha determinado aún la participación del sistema LPA endógeno en la emoción. Además, no se conoce si existe relación entre los niveles de las especies de LPA en el hipocampo con los diferentes parámetros emocionales registrados en pruebas de comportamiento, como por ejemplo el EPM. Los únicos datos disponibles se han obtenido administrando LPA o un agonista de los receptores para el LPA y observado sus efectos en pruebas que miden diferentes parámetros emocionales (Castilla-Ortega et al., 2014; Kim et al., 2017). Aunque las evidencias no son concluyentes, la administración de LPA provoca cambios en la conducta emocional. Asimismo, un estudio reciente de nuestro grupo de investigación examina conductas relacionada con la depresión en animales estresados que han recibido una administración continuada de LPA (Moreno-Fernández et al., 2019 (en revisión)). Los datos revelan que, en situaciones de estrés, una administración continuada de LPA produce un efecto depresivo. Nuestro estudio realiza una aproximación diferente, expone al animal al estrés o a una prueba de conducta y se determinan las concentraciones de LPA total, de cada una de sus especies y se analiza su perfil en el hipocampo. Sería interesante poder relacionar estos cambios lipídicos con el perfil conductual de los animales para conocer más en profundidad qué implicaciones tiene este sistema

neuromodulatorio en la regulación de las emociones.

En conjunto, y según nuestro conocimiento, nuestro estudio constituye la primera aproximación para identificar y determinar el perfil de las especies de LPA en el hipocampo, tanto de ratones WT como en animales nulos para el receptor LPA₁. Además, se ha explorado, por primera vez, el efecto del estrés agudo en las concentraciones hipocampales de las especies de LPA. Los resultados ponen de manifiesto que la ausencia del receptor LPA₁ no alteró los niveles de las especies de LPA, pero modificó ligeramente el perfil. En cambio, el estrés, particularmente el procedimiento de estrés por inmovilización, alteró significativamente los niveles de LPA en el hipocampo. Estos datos revelan que el LPA hipocampal puede ser uno de los sistemas afectados por el estrés agudo y podría constituir una diana terapéutica para paliar los efectos negativos inducidos por el estrés.

5. CONCLUSIONES

- 5.1 En condiciones fisiológicas, la especie de LPA más abundante en el hipocampo de ratón es la 18:0, seguida de la 18:1, tanto en WT como en maLPA₁-nulos.
- 5.2 La ausencia del receptor LPA₁ no causa cambio en las concentraciones de LPA, aunque sí modificó ligeramente el perfil de LPA hipocampal.
- 5.3 El estrés por inmovilización, fundamentalmente si no es aplicado junto a EPM, produjo cambios significativos en las concentraciones de LPA en

Capítulo IV: Efecto del estrés agudo en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre y carentes de receptor LPA₁

hipocampo, en cambio el estrés inducido por EPM afectó las proporciones relativas de este sistema lipídico.

5.4 El efecto del estrés agudo fue mayor en los animales WT que en ausencia del receptor LPA₁.

CAPÍTULO V: EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO Y LA ADMINISTRACIÓN DE LPA EN LAS ESPECIES DE LPA EN HIPOCAMPO DE RATONES TIPO SILVESTRE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN

Es conocido que el estrés crónico provoca modificaciones a nivel neuroquímico, fisiológico, inmune, molecular y celular, (Conrad, 2010; Lin et al., 2018), siendo especialmente vulnerables algunas estructuras cerebrales (Admon et al., 2009; McEwen, Nasca, & Gray, 2016). Una de las estructuras más sensibles a los efectos negativos del estrés crónico es el hipocampo, constituyendo una región crucial en el estudio de la respuesta al estrés y los mecanismos neuronales que subyacen a la depresión (Lin et al., 2018).

Los efectos del estrés sobre el hipocampo conllevan numerosas alteraciones. En este sentido, el estrés crónico ocasiona hipocortisolemia, debido a una desregulación del eje HHA (Castilla-Ortega et al., 2011) y afecta a la neurogénesis hipocampal, además de inducir estrés oxidativo (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012; Sato et al., 2010). Todas estas alteraciones del hipocampo pueden tener repercusiones a nivel cognitivo, fundamentalmente afectan a la memoria espacial y a nivel emocional. De hecho, su desregulación, especialmente inducida por estrés, es clave en la aparición de la sintomatología depresiva (Boucher et al., 2011).

Aunque numerosos mecanismos neurobiológicos pueden ser los responsables de estos efectos, actualmente, se está empezando a descubrir la importancia de los lípidos en la respuesta al estrés. Los lípidos, debido a sus propiedades fisicoquímicas, son cruciales para la formación y el mantenimiento de la estructura celular, así como para la regulación de numerosas vías de señalización (Miranda & Oliveira, 2015). En este sentido, se ha observado que, en varias regiones clave que controlan la emoción, como

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

la corteza prefrontal y el hipocampo, la exposición a estrés crónico o la administración continuada de corticosterona, altera significativamente el metabolismo de los esfingolípidos y los fosfolípidos (Oliveira et al., 2016). Asimismo, la exposición a estrés crónico e impredecible induce cambios en los niveles celulares relativos de numerosos lípidos, produciendo un aumento de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) y una disminución de fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y cardiolipina (CL) (Faria et al., 2015). Además, estudios del lipidoma han identificado a los lípidos como factores clave en la aparición de depresión.

Como se ha comentado en el capítulo 1 de la presente tesis, se ha informado que la ausencia de la vía de señalización mediada por el receptor LPA_1 confiere vulnerabilidad al estrés crónico. De hecho, en los animales que no expresan dicho receptor, el estrés produce una reducción mayor en la neurogénesis y un aumento de la apoptosis (Castilla-Ortega et al., 2011) y mayor estrés oxidativo (García-Fernández et al., 2013) que en animales normales (Castilla-Ortega et al., 2011), dando como resultado un fenotipo con baja resiliencia (Moreno-Fernández et al., 2018b) y con patología hipocampal (Castilla-Ortega et al., 2011). Asimismo, se ha observado que la administración crónica de LPA en situaciones de estrés, potencia algunos de sus efectos negativos (Moreno-Fernández et al., 2019, en revisión).

La implicación del sistema de señalización mediado por el receptor LPA_1 en la respuesta al estrés ha sido confirmada en humanos. En este sentido, se ha observado que determinados polimorfismos para el receptor LPA_1 se relacionan con un aumento del riesgo de hipertensión esencial. Dado que la exposición al estrés aumenta la susceptibilidad de los pacientes con alelos de riesgo (Xu et al., 2015), las variantes genéticas de este receptor podrían aumentar la vulnerabilidad al estrés, lo que sería una

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

evidencia indirecta de la implicación de este receptor en el estrés. De hecho, se ha observado una reducción de la expresión del receptor LPA₁ después de la exposición a estrés crónico impredecible, que pudo revertirse mediante el tratamiento con un antidepresivo (Sibille et al., 2009).

A pesar de todas las evidencias que implican al sistema de señalización LPA-LPA₁ en la respuesta al estrés, tanto en modelos animales como en humanos, no se conoce en detalle cómo el estrés crónico afecta al sistema LPA. En el segundo bloque experimental de tesis se ha estudiado el impacto del estrés agudo en las concentraciones y el perfil hipocampal de LPA. Los cambios que se producen tras un estresor agudo constituyen la primera respuesta neurobiológica al estrés, sin embargo, se desconoce qué ocurre en el sistema LPA hipocampal tras la aplicación de un estresor de forma continuada. Se ha observado una potenciación de los efectos negativos del estrés, tanto a nivel conductual, como endocrino y molecular, tras la administración crónica de LPA, en animales estresados (Moreno-Fernández et al., 2019, en revisión), lo que sugiere que este sistema lipídico puede estar mediando la respuesta neurobiológica al estrés.

Por todo lo expuesto, en este bloque experimental se planteó estudiar qué ocurre en el perfil de LPA hipocampal tras la exposición a un estresor crónico, usando para ello la metodología MALDI-TOF puesta a punto. Asimismo, se ha estudiado qué ocurre tras la administración continuada de LPA 18:1 en situación basal.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales

Todos los experimentos que forman parte de este capítulo se realizaron con ratones macho de fondo genético mixto 129X1/SvJ x C57BL/6J con 3 meses de edad. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándar de ventilación, temperatura y disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*, con un ritmo circadiano de 12 horas de períodos luz/oscuridad con efecto amanecer/anochece. Durante todo el experimento, los animales estuvieron estabulados en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga.

La experimentación animal se ha realizado según el comité ético de la Universidad de Málaga (CEUMA 2013-0008-A/ CEUMA: 1-2015- A, 08-7- 15-273) y de la Junta de Andalucía (08-7- 15-273), de acuerdo a la normativa legal vigente europea (European Communities Council Directives 2010/63/UE, 90/219/CEE, Regulation (EC) No. 1946/2003) y nacional (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).

2.2 Diseño experimental

Para llevar a cabo los objetivos planteados, se emplearon tres grupos experimentales: control, administración crónica de LPA y estrés crónico. Antes de comenzar la aplicación de los tratamientos experimentales, los animales fueron manipulados 10 minutos al día, durante 5 días para que se habituaran al experimentador. Los animales recibieron una administración diaria de vehículo o LPA, dependiendo del grupo, durante 6 días, seguida de dos días de descanso, más otro periodo de 6 días de

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

administración diaria. El tratamiento ambiental aplicado fue estabulación estándar durante el tiempo que duró los procedimientos o estrés por inmovilización, durante 12 días, que se distribuyó de la siguiente forma: 6 días de estrés + 2 días de descanso + 6 días de estrés. Los animales fueron distribuidos al azar en cada uno de los tres grupos experimentales: 1) grupo control, al que se le administró vehículo y permaneció estabulado de forma estándar (N= 4), 2) grupo LPA, al que se le administró LPA y fue estabulado de forma estándar (N= 6) y 3) grupo estrés crónico, que recibió vehículo y fue sometido al protocolo de estrés por inmovilización (N= 5). Antes de ser perfundidos, todos los grupos fueron sometidos a la prueba conductual de natación forzada (FST, en inglés forced swimming test) (ver diseño experimental figura 23; tabla 4).

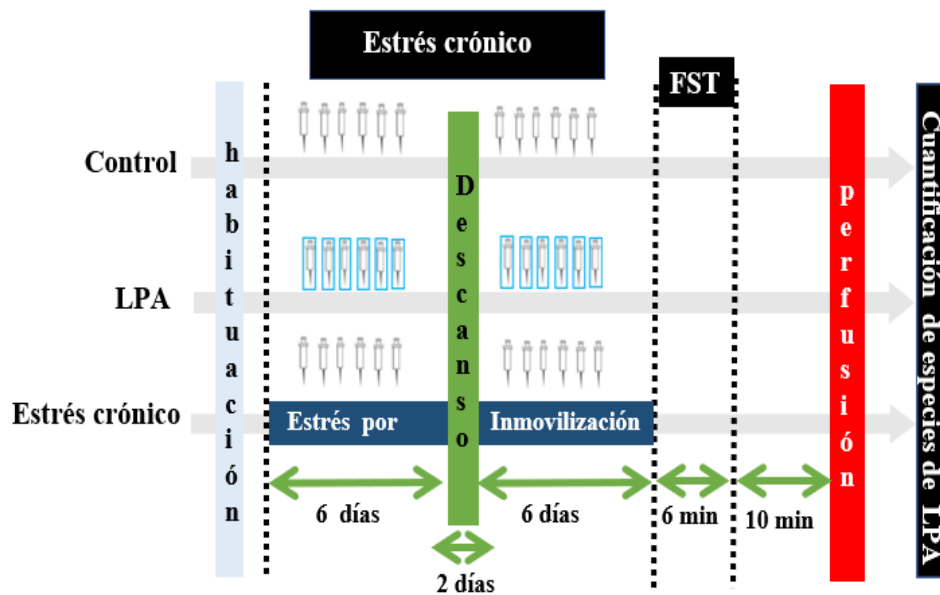


Figura 23: Procedimiento experimental. Diseño propuesto para estudiar los efectos de la administración continuada de LPA o de estrés crónico por inmovilización en los niveles de LPA en el hipocampo de ratones WT.

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

Grupo	vehículo	LPA	Inmovilización (6 horas)	Test FST
Control				
LPA				
Estrés crónico				

Tabla 4. Grupos experimentales. Tratamientos administrados. 1) Grupo control, 2) grupo con administración de LPA 18:1 y 3) grupo estresado por inmovilización de forma crónica.

2.3 Administración intracerebroventricular

Como solución vehículo se ha empleado albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos al 3% (Sigma, St. Louis, EE. UU.) en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

El LPA exógeno empleado fue el oleil-LPA (LPA 18:1, 1-O-9-(Z)-octadecenil-sn-glicero-3-fosfato, en su forma de sal amónica) suministrado de Avanti® Polar Lipids Inc.; Alabaster, Alabama; Estados Unidos, que es la especie agonista del receptor LPA₁ más usada en la mayor parte de los trabajos publicados hasta la fecha (Castilla-Ortega et al., 2014; Ladrón de Guevara et al., 2018; Moreno-Fernández et al., 2019 (en revisión)). Este agonista posee una gran afinidad por el receptor LPA₁ (Bandoh et al., 2000; Chun, Hla, Lynch, Spiegel y Moolenaar, 2010; Ma, Nagai, Chun y Ueda, 2013; Uchida, Nagai y Ueda, 2014), presentando una concentración de eficacia media (CE₅₀) de 11,7 nM (Heise et al., 2001) y de 1-10 nM (Choi et al., 2010) con una eficacia máxima (E_{max}) de 100 nM. El compuesto de LPA se disolvió en la solución vehículo a una concentración 200 nM.

Tras ser anestesiados mediante inhalación de sevoflurano, los ratones se colocaron en un aparato de cirugía estereotáxica (Kopf, Tujunga, California, Estados Unidos). A continuación, usando una jeringa Hamilton (21G/ref 304432 BD microlance TM3 40mm) se administró en el ventrículo lateral derecho, un volumen de 2 μ L de vehículo o LPA, según el tratamiento del grupo asignado.

2.5 Modelo de estrés por inmovilización

Los animales asignados al grupo de estrés se sometieron a un protocolo de estrés por inmovilización de manera repetida. El procedimiento consistió en la inmovilización del animal durante un periodo de 6 horas consecutivas, durante 6 días, seguido de dos días de descanso, y de la repetición del procedimiento. El horario de aplicación del estrés era diferente entre días para aumentar la impredecibilidad del procedimiento. En total, los animales recibieron 12 días de inmovilización.

Para la inmovilización, se emplearon tubos de plexiglás de 50 ml modificados con agujeros para la cola del animal y para la ventilación (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012; Pedraza, et al., 2014a; Zimprich et al., 2014). Este protocolo fue usado, dada la eficacia mostrada para la inducción de estrés y de alteraciones hipocampales (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012). En este sentido, se ha observado que el estrés intermitente e impredecible simula la exposición al estrés que los humanos sufren en la vida normal y que conlleva al desarrollo de varias alteraciones psicopatológicas (Lee et al., 2006). Junto con la aplicación del estresor repetido, todos los grupos experimentales se sometieron al test de natación forzada (FST). Esta prueba conductual, que permite el análisis del comportamiento de afrontamiento pasivo y activo empleada en los estudios sobre trastorno de depresión (Porsolt, 1979;

Porsolt et al., 1977), resulta estresante (Yankelevitch-Yahav et al., 2015) y puede ser usada como un procedimiento de inducción de estrés agudo.

Para este experimento, se utilizó el protocolo modificado de Cryan, Markou, & Lucki, 2002). Para ello, los animales se colocaron individualmente en un cilindro de plexiglás (Málaga, España) con dimensiones de 30 cm de alto × 10 cm de diámetro, lleno de agua a temperatura de 23 ± 1 °C, hasta una profundidad de 25 cm, durante 6 minutos.

2.6 Perfusión intracardiaca y extracción de hipocampo

Una vez finalizados los tratamientos experimentales, los animales fueron anestesiados con una dosis eutanásica de del anestésico pentobarbital sódico, vía intraperitoneal (200 mg/kg; Dolethal, Vétoquinol, Especialidades Veterinarias, S.A., Madrid, España). Tras la comprobación de la ausencia de reflejos en las extremidades, los animales se colocaron en posición de cúbito supino y se practicó una incisión en el torso, cortando el diafragma, para exponer de forma accesible el corazón. Posteriormente, se insertó una cánula en el ventrículo izquierdo conectada a una bomba de perfusión (modelo D-25V, DINTER SA–DINKO Instruments, Barcelona) y se realizó una incisión en la aurícula derecha con el objetivo de permitir la extravasación sanguínea. Posteriormente, en el ventrículo izquierdo se administró una solución de lavado (tampón fosfato salino a 0,1 M y pH 7,4 (PBS)) durante aproximadamente 10 minutos. Tras la perfusión, el animal se decapitó y se procedió a la extracción del cerebro, para la extracción del hipocampo. Esta extracción se hizo según el procedimiento descrito en el capítulo 3, apartado 2.5 de la presente tesis.

2.7 Determinación de las especies de LPA

Las determinaciones de las especies de LPA se han realizado según el protocolo descrito en el capítulo de puesta a punto de la técnica basado en espectroscopía de MALDI-TOF (ver capítulo 3, 2.6.1).

2.8 Análisis Estadístico

Todos los resultados se presentan como medias \pm S.E.M; un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el uso del paquete estadístico STATISTICA 8 («STATISTICA 8», 2007).

Primero se estudió el efecto del estrés crónico sobre las especies de LPA. Posteriormente, se determinó el efecto de la administración repetida de LPA sobre las especies y el perfil de LPA en el hipocampo. Para ello, se empleó una t-student para comparar el LPA total y cada una de las especies hipocampales de LPA, en animales controles y en animales que habían recibido el protocolo de estrés por inmovilización o entre animales controles y animales que habían recibido una administración continuada de LPA.

3. RESULTADOS

3.1 Determinación de las especies de LPA en condiciones de estrés crónico

En el estudio realizado se observa que el estrés crónico no alteró la concentración total de LPA ($t(7) = 1.45$; $p > 0.5$) (Figura 24 A). Al igual que sucede con estrés agudo, el estrés crónico aumentó la concentración de las especies de LPA 18:0 en comparación con el control ($t(7) = 2.28$; $p \leq 0.01$) pero, a diferencia de lo observado con el estrés agudo, no alteró las concentraciones de las especies LPA 16:0 ($t(7) = 0.06$; $p > 0.05$), 18:1 ($t(7) = 0.26$; $p > 0.05$) ni 18:2 ($t(7) = -0.36$; $p > 0.05$) (Figura 24 B). El estrés crónico sólo afectó la abundancia relativa de la especie LPA 18:0 ($t(7) = 0.056$), no induciendo cambios en el resto de las especies examinadas ($p > 0.05$) (Figura 24 C).

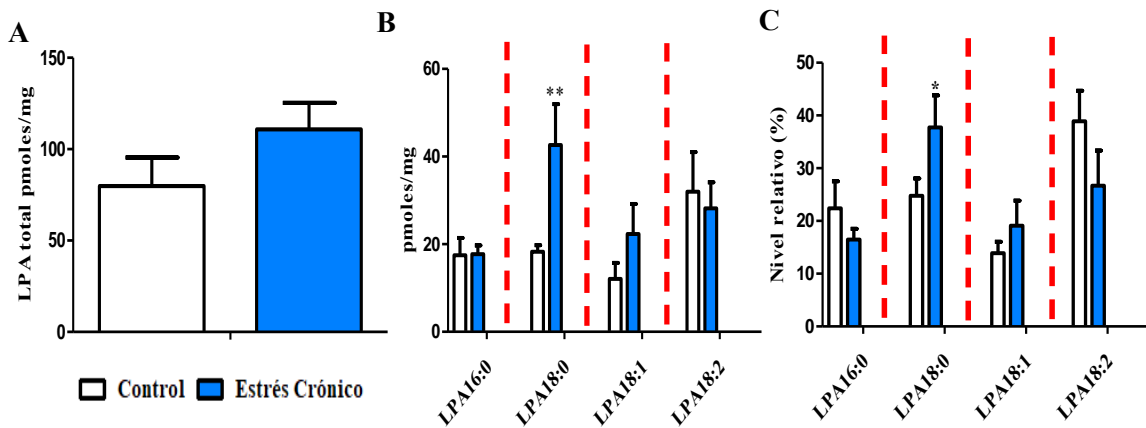


Figura 24: Efectos del estrés crónico en el LPA hipocampal. A) Concentración de LPA total en hipocampo de animales controles y animales sometidos a estrés crónico. B) Concentraciones de las especies de LPA en hipocampo de animales controles y animales sometidos a estrés crónico. C) Niveles relativos de las especies de LPA en situación control y en estrés crónico. El estrés crónico incrementó la concentración de la especie de LPA 18:0, manteniendo inalteradas las demás especies. Se muestran las diferencias estadísticas respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0.01$).

3.2 Efectos de la administración continuada de LPA en las especies hipocampales de LPA

Los resultados obtenidos revelan que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en la concentración total de LPA ($t(8) = 0,75$; $p > 0,05$) (Figura 25 A).

En cuanto a las concentraciones de las diferentes especies de LPA, la administración continuada de este lípido provocó un aumento de la especie 18:1, aunque sin alcanzar la significación estadística ($t(8) = -1,89$; $p = 0,09$), no afectando al resto de las especies ($t(8) = 1,67$ para LPA 16:0; $t(8) = 1,49$ para LPA 18:0 y $t(8) = 1,84$ para 18:2, $p > 0,05$) (Figura 25B).

En relación a los niveles relativos de las especies de LPA estudiadas, la administración continuada de LPA provocó un aumento de los niveles relativos de la especie 18:1 ($t(8) = -5,19$, $p < 0,001$) y 18:2 ($t(8) = 2,26$; $p < 0,05$), sin afectar al resto de las especies ($t(8) = 1,22$ para LPA 16:0 y $t(8) = 0,89$ para LPA 18:0, en donde $p > 0,05$).

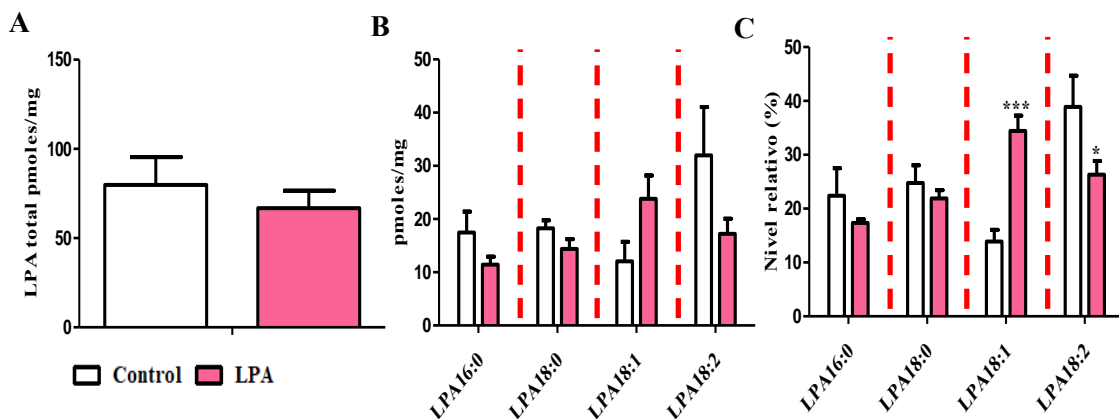


Figura 25: Efectos de la administración continuada de LPA 18:1 en el LPA hipocampal. A) Concentración de LPA total tras la administración repetida de LPA. B) Concentraciones de las especies de LPA. C) Niveles relativos de las especies de LPA. Se muestran las diferencias respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4. DISCUSIÓN

En este capítulo, se ha analizado el efecto de un estresor crónico e impredecible en el sistema LPA hipocampal. Asimismo, se ha estudiado qué efectos tiene la administración continuada de la especie 18:1 sobre este sistema LPA.

Se conoce que el estrés crónico provoca un aumento de la respuesta del eje HHA (Oliveira et al., 2015), que conlleva numerosas alteraciones neurobiológicas (Conrad, 2010; Lin et al., 2018). El hipocampo, que contiene una alta densidad de receptores para glucocorticoides, constituye una estructura diana de los efectos negativos del estrés (Orlovsky et al., 2014). Entre estas alteraciones neurobiológicas provocadas por el estrés en el hipocampo, se ha observado un aumento de estrés oxidativo (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012; Sato et al., 2010), una reducción de la neurogénesis (Castilla-Ortega et al., 2011) y un aumento de la neuroinflamación (Grosse et al., 2015; Sorrells et al., 2009). Estas alteraciones a nivel hipocampal podrían explicar, al menos en parte, la aparición de las alteraciones conductuales debidas al estrés (Pizzagalli, 2014).

Numerosos mecanismos han sido propuestos en la mediación de los efectos negativos del estrés (Herbet et al., 2017), pero hasta relativamente hace poco tiempo, no se ha prestado atención al papel que pueden jugar los lípidos en este proceso (Miranda & Oliveira, 2015; Oliveira et al., 2016). Uno de estos lípidos puede ser el LPA. Nuestro grupo ha puesto de manifiesto que la vía de señalización LPA-LPA₁ podría estar mediando en los efectos negativos del estrés crónico en el hipocampo. Así, como anteriormente se ha comentado, la ausencia de la vía de señalización mediada por el receptor LPA₁ aumenta la vulnerabilidad a los efectos negativos del estrés (Castilla-

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

Ortega et al., 2011). Además, incrementa el impacto del estrés en la alteración del eje HHA, en la reducción de la neurogénesis hipocampal (Castilla-Ortega et al., 2011) y en el aumento del estrés oxidativo (García-Fernández et al., 2012). Sin embargo, no se conocía que ocurre con el sistema LPA hipocampal ante la exposición al estrés crónico.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral revelan que el estrés crónico aumenta las concentraciones totales de LPA, aunque sin alcanzar la significación estadística, y además, provoca un aumento significativo de la concentración de la especie 18:0.

Una desregulación en las concentraciones de lípidos ha sido observada de forma consistente tras la exposición al estrés, particularmente al estrés crónico (Kargan et al., 1999; Chaung et al., 2010; Faria et al., 2015; Miranda et al., 2019). Por un lado, a nivel plasmático, se ha observado, en veteranos de la guerra de Vietnam con trastorno de estrés postraumático, un aumento en los niveles de lípidos, en particular en los niveles de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (Kargan et al., 1999). En animales, usando el modelo de estrés social por derrota, que es un modelo de estrés crónico, se ha registrado una desregulación lipídica, por alteración en el metabolismo de los lípidos que conlleva un aumento en los niveles de los mismos, fundamentalmente debido a un aumento en la actividad transcripcional de genes implicados en la síntesis de lípidos (Chaung et al., 2010). Más recientemente, las mejoras en las técnicas analíticas han permitido estudiar el efecto del estrés en la composición de lípidos cerebrales. Gracias a ello, se ha observado que la exposición al estrés crónico e impredecible induce cambios en los niveles celulares relativos de los lípidos de señalización en el cerebro, en concreto, se ha advertido un aumento de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) y la disminución de fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y cardiolipina (CL)

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

(Faria et al., 2015), posibles precursores de la síntesis de LPA. Recientemente, se ha estudiado los efectos de la administración de GC en los lípidos hipocampales. Distinguiendo entre hipocampo dorsal y ventral, se detectó que en el hipocampo dorsal los niveles de LPC se redujeron y en cambio en el ventral aumentaron las concentraciones de glicerofosfolípidos, tales como PC, PCe, PE y PC, (Miranda et al., 2019). Desconocemos qué puede estar provocando esta especificidad entre divisiones hipocampales, pero posiblemente pueda ser debido a las diferencias funcionales entre ambas regiones. Así, el hipocampo dorsal está implicado fundamentalmente en el control de funciones cognitivas, en cambio el hipocampo ventral está relacionado con el estrés, la emoción y el afecto (Fanselow & Dong, 2010). Un aumento en los niveles de lípidos en esta región, clave para la regulación emocional, podría inducir numerosos problemas. En este sentido, un aumento en las concentraciones de lípidos a nivel cerebral se ha asociado con modelos animales de psicopatologías, fundamentalmente depresión. Niveles elevados de ceramidas provoca una reducción de la neurogénesis (Gulbins et al., 2015; 2016), autofagia (Gulbins et al., 2018) y desregulación del eje HHA (Grassmé et al., 2015); todo ello podría explicar, al menos en parte, la aparición de conductas relacionadas con la depresión (Brunkhorts-Kanaan, 2019). Este aumento de los niveles de ceramidas, que resultaría clave en la aparición de las alteraciones neurobiológicas que derivan en la aparición de síntomas depresivos, se revierte con el tratamiento con antidepresivos (Grassmé et al., 2015). Asimismo, una acumulación de fosfolípidos (en concreto del ácido araquidónico) (Riederer et al., 2010), fundamentalmente en el hipocampo (Oliveira et al., 2016) se ha encontrado en un modelo animal de depresión (Green et al., 2005; 2009). Dadas las implicaciones funcionales de LPA (Anliker & Chun, 2004; Birgbauer & Chun, 2006; Choi et al., 2010; Chun et al., 2010; Ishii et al., 2004;

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

Noguchi et al., 2009; Rivera & Chun, 2006), y su papel en la regulación emocional y en el afrontamiento al estrés (Castilla-Ortega et al., 2011; Pedraza et al., 2014), un cambio en el patrón hipocampal del sistema LPA podría estar implicado en los efectos y en la aparición de las alteraciones del estado de ánimo debidos al estrés. Más estudios son necesarios para poder avalar esta posible implicación de los cambios en el sistema LPA.

En nuestro estudio, de todas las especies evaluadas, sólo hemos observado un aumento de la especie LPA 18:0. Este hallazgo difiere de lo que ocurre con el estrés agudo, procedimiento que provocó un aumento de todas las especies de LPA examinadas. Varias hipótesis pueden ser propuestas para explicar este efecto. Por un lado, el estrés continuado podría estar afectando específicamente a una de las rutas sintéticas de LPA. Las especies LPA con cadenas insaturadas (16:1, 18:1, 18:2, 20:4) que se producen mayormente por las isoenzimas PLA1, mientras que las especies saturadas (16:0, 18:0) son producidas por isoenzimas PLA2 (Aoki, 2004). Dado que la única especie alterada por el estrés crónico es la especie 18:0, y que no se ha encontrado un aumento de los niveles de transcritos de la enzima PLA2 tras la exposición a estrés crónico (Oliveira et al., 2016), una hipótesis razonable sería que, en esta situación, la actividad catalítica predominante sería la de la fosfolipasa A2 (Aoki et al., 2008). Un aumento de la actividad de esta isoenzima, que puede producirse por un aumento de los GC (Oliveira et al., 2016), ya ha sido propuesto tras la exposición a un modelo de estrés crónico e impredecible (Dennis et al., 2011; Oliveira et al., 2016). Otra posibilidad, puede ser debida a cambios en la expresión de receptores para LPA provocados por el estrés crónico e impredecible. Así, las especies de LPA con cadena saturadas e insaturadas presentan diferencias en las actividades biológicas, lo que implica que son reconocidas por diferentes receptores de LPA (revisado en Aikawa et al., 2015). Datos preliminares de nuestro grupo revelan que,

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

aunque el estrés crónico no afecta los niveles de ARNm de los receptores para LPA en el hipocampo, sí que se ve afectada la expresión de la proteína para el receptor LPA₁, observándose una reducción con respecto a la situación control (datos no publicados). Cambios en la expresión de receptores, podría explicar la especificidad en el aumento de las concentraciones de la especie LPA 18:0.

Por otro lado, es un hecho ampliamente constatado que el estrés, particularmente el estrés crónico, provoca un aumento del estrés oxidativo (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012; Sato et al., 2010). Niveles elevados de radicales libres o de especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés, reactive oxygen species) pueden provocar daño directo en los lípidos (Moldovan & Moldovan, 2004). Estos niveles elevados de radicales libres pueden atacar a lípidos que contienen enlace doble carbono-carbono. Este fenómeno, denominado peroxidación lipídica, afecta fundamentalmente a ácidos grasos insaturados (Pradenas et al., 2012; Ayala et al., 2014). Un aumento en la peroxidación lipídica podría explicar las diferencias encontradas en los niveles de especies insaturadas entre estrés agudo y crónico. Así, tal y como se indicó en el primer bloque experimental, un aumento de GC aumenta la expresión y actividad catalítica de la ATX (Honjo et al., 2018). Aunque esto ocurriese tras el estrés crónico, un aumento de la peroxidación lipídica, podría conllevar una reducción en las concentraciones de las especies insaturadas, aunque su síntesis esté incrementada, y podría explicar el aumento específico de la especie 18:0, que no sufriría una reducción en sus niveles por el aumento del estrés oxidativo, en cambio sí que se verían afectadas otras especies de LPA.

Las hipótesis planteadas para explicar estos resultados no son mutuamente excluyentes y podrían darse conjuntamente en el caso del estrés crónico. Sin embargo,

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

son especulativas, basadas en nuestros datos y en la bibliografía disponible, por lo que hay que formularlas con cautela. Estudios futuros resultan necesarios para poder determinar qué está provocando el aumento selectivo de la especie 18:0, sin afectar a las otras especies de LPA.

Por otra parte, dado los efectos contradictorios observados tras la administración continuada de la especie LPA 18:1, estudiamos qué ocurre con el perfil LPA tras su administración. En este sentido, los datos encontrados en la bibliografía muestran que, tras la administración de esta especie, vía i.c.v., se produce un aumento de la neurogénesis hipocampal (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2018; Walker et al., 2016; Rosell del Valle, tesis doctoral 2014). Asimismo, su administración reduce las conductas similares a depresión en animales de investigación (Rosell del Valle, tesis doctoral 2014). A nivel cognitivo, la administración de LPA en ratas *Long-Evans* mejora la memoria espacial medida en el laberinto acuático de Morris (Dash et al., 2004). En cambio, su administración en ratas Wistar provoca un aumento de la ansiedad y una activación mayor de la sustancia gris periacueductal (Castilla-Ortega et al., 2014), región clave en la integración del procesamiento emocional de estímulos aversivos, como el miedo, las respuestas de pánico y la nocicepción (Brandão et al., 2003; Graeff, 2003). Por otra parte, un estudio reciente llevado a cabo por nuestro grupo, revela que la administración de la especie LPA 18:1 tiene efectos contrapuestos dependiendo si se administra en animales controles o en animales sometidos a un protocolo de estrés por inmovilización crónico. Así, en animales controles produce un aumento de la conducta hedónica y amortigua los efectos negativos del estrés agudo en la respuesta del eje HHA. En cambio, en animales sometidos a un protocolo de estrés, potencia los efectos negativos del estrés en la conducta hedónica medida con el test de preferencia por la sacarina, y en el afrontamiento

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

conductual medido a través del test de natación forzada, así como una mayor activación del eje HHA y un aumento del balance excitatorio en el hipocampo ventral (Moreno-Fernández et al., 2019, en revisión). En conjunto estos datos indican que, en condiciones controles, a excepción del estudio de Castilla-Ortega et al., 2014, la administración de LPA 18:1 produce mejoras conductuales y neurobiológicas, en cambio en situación de estrés potencia los efectos negativos de éste.

En nuestro estudio, la administración de este lípido, en situación control, no provocó ningún cambio en las concentraciones de las diferentes especies de LPA, aunque modificó su perfil al aumentar los valores relativos de la especie LPA 18:1. En un estudio piloto llevado a cabo (VER ANEXO IX), la administración de este lípido revirtió el aumento en la especie 18:0 provocada por el estrés. Teniendo en cuenta estos datos, en principio, los efectos neurobiológicos debidos a la administración de LPA no podrían ser explicados por cambios significativos en las concentraciones de las diferentes especies de LPA. Sin embargo, sí que este tratamiento provoca cambios sutiles en la concentración de los mismos, que queda reflejado en los valores relativos. Un pequeño cambio en la composición de lípidos, puede tener un gran impacto en los niveles de otros lípidos homólogos (Hannun & Obeid, 2008) que puede tener repercusión a nivel conductual (Miranda & Oliveira, 2015; Oliveira et al., 2016). Este aumento en los niveles relativos de la especie 18:1, podría ser uno de los mecanismos implicados en los efectos neurobiológicos de LPA. Por otro lado, los efectos negativos observados tras la administración de LPA en situaciones de estrés crónico no pueden ser explicados por cambios en las concentraciones de las diferentes especies de LPA ni en el perfil de las mismas a nivel hipocampal, puesto que no se observan diferencias con respecto al grupo

con el tratamiento ambiental control. Otros mecanismos explicarían los efectos contrapuestos inducidos por LPA en situación basal o tras la exposición a un estresor.

En definitiva, el estrés crónico, afecta el perfil de LPA en el hipocampo, aumentando las concentraciones y valores relativos de la especie 18:0. Cambios en el sistema LPA hipocampal pueden ser uno de los mecanismos neurobiológicos implicados en los efectos negativos del estrés, y en consecuencia en la aparición de trastornos psicopatológicos, y puede constituir una de las dianas terapéuticas para el tratamiento de los mismos. Sin embargo, más estudios son necesarios para determinar qué efecto tiene sobre la conducta y otros sistemas neurobiológicos el aumento específico de la especie LPA 18:0, así como conocer por qué el estrés crónico, a diferencia del agudo, produce un aumento de las concentraciones y niveles relativos de la especie 18:0 en el hipocampo, sin afectar al resto de las especies. Además, sería necesario ampliar el estudio piloto iniciado para comprobar de forma consistente si la administración continuada de LPA es capaz de revertir los efectos negativos del estrés sobre el sistema LPA hipocampal y determinar si existe relación entre estos cambios y la ejecución conductual.

5. CONCLUSIONES

5.1 El estrés crónico aumentó la concentración de la especie LPA 18:0 sin alterar el resto de especies de LPA en el hipocampo.

5.2 La administración continuada de LPA 18:1 provocó un aumento en los niveles relativos de la especie 18:1 en el hipocampo.

Capítulo V: Efecto del estrés crónico y administración de LPA en las especies de LPA en hipocampo de ratones tipo silvestre

CONCLUSIONES GENERALES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusiones generales

A continuación, se indican las conclusiones extraídas del presente trabajo de Tesis Doctoral.

1. El protocolo de extracción y de cuantificación puesto a punto es óptimo para el estudio de las especies de LPA en hipocampo de ratón.
2. Las concentraciones de cada una de las especies de LPA en suero de ratón con el fondo genético mixto 129X1/SvJ x C57BL/6J parece estar por debajo de los valores detectables por la técnica MALDI-TOF.
3. En condiciones fisiológicas, la especie de LPA más abundante en el hipocampo de ratón es la 18:0, seguida de la 18:1, tanto en WT como en maLPA₁-nulos.
4. La ausencia del receptor LPA₁ no causó cambio en las concentraciones de LPA, aunque modificó ligeramente el perfil de LPA hipocampal.
5. El estrés por inmovilización, fundamentalmente si no es aplicado junto a EPM, produjo cambios significativos en las concentraciones de LPA en hipocampo, en cambio el estrés inducido por EPM afectó las proporciones relativas de este sistema lipídico.
6. El efecto del estrés agudo fue mayor en los animales WT que en ausencia del receptor LPA₁.
7. El estrés crónico aumentó la concentración de la especie LPA 18:0 sin alterar el resto de especies de LPA en el hipocampo.
8. La administración continuada de LPA 18:1 provocó un aumento en los niveles relativos de la especie 18:1 en el hipocampo.

SUMMARY





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCTION

Thanks to the advances in lipidomic technology, which provided the profile and the possibility of large-scale quantification of lipid molecules, it is possible to carry out exhaustive studies of their pathways and a physiological interpretation based on analytical chemistry and statistical analysis (Watson, 2006; Wenk, 2005). Therefore, analytical techniques, especially based on mass spectrometry, allow a complete lipid profile study of different systems, (cells, tissues and even entire organisms) (Lydic & Goo, 2018), facilitating the understanding of the role of lipids in physiology and pathologies (Miranda & Olivera, 2015; Wenk, 2010). For this reason, and with the aim of finding out how stress impacts different species of LPA (Lysophosphatidic acid), we have perfected the techniques of extraction of LPA species in tissue and serum using MALDI-TOF equipment to quantify these species and obtain their lipid profile under different experimental conditions.

Lysophosphatidic acid (LPA) is a simple endogenous bioactive phospholipid that participates in various biological processes and functions (Aikawa et al., 2015; Hayashi et al., 2001; Yoshida et al., 2003). There are different species of LPA include both saturated fatty acids (such as palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0)) and unsaturated fatty acids (such as oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) and arachidonic acid (20:4)) (Sano et al., 2002) that may mediate different biological functions.

Recent studies support that LPA is an important signalling molecule that is involved in behavioural processes, mainly via the LPA₁ receptor (Castilla-Ortega et al., 2016, 2014, 2010; Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2018; Mirendil et al., 2015;

Summary

Moreno-Fernández et al., 2018; Orio et al., 2013; Pedraza et al., 2014; Sánchez-Marín et al., 2018; Santín et al., 2009; Yamada et al., 2015). However, the involvement of LPA molecules on other receptors such as LPA₂ (Schneider et al., 2018; Trimbuch et al., 2009), LPA₃ (H. Uchida, Nagai, & Ueda, 2014; Ueda et al., 2018) and LPA₅ receptors (Callaerts-Vegh et al., 2012; Tsukahara et al., 2018a) on behaviour regulation cannot be ruled out. LPA appears to function as a regulatory molecule acting mainly through the LPA₁ receptor (Choi et al., 2010; Chun et al., 2013). In fact, animals lacking the LPA₁ receptor exhibited emotional deregulation, deterioration of the extinction of aversive memories (Pedraza et al., 2014), an anxious phenotype (Castilla-Ortega et al., 2010; Moreno-Fernández et al., 2017; 2018b; Santín et al., 2009), cognitive alterations in hippocampal dependent tasks (Castilla-Ortega et al., 2011, 2010; Santín et al., 2009) and dysfunctional coping in response to chronic stress (Castilla-Ortega et al., 2014). Moreover, the absence of this receptor confers vulnerability to chronic stress, precipitates the hippocampal pathology (Castilla-Ortega et al., 2014, 2011; García-Fernández et al., 2012), aggravates stress-induced neuroplastic changes, such as reduced neurogenesis in adults, increases apoptosis (Castilla-Ortega et al., 2011) and levels of oxidative stress (García-Fernández et al., 2012). Together, these data suggest a role for the LPA₁ receptor in regulating the effects of stress in the hippocampus. Other studies, with pharmacological approaches, provide evidence that support the hypothesis that the LPA₁ receptor plays an essential role in the regulation of emotions and mood. In this sense, inactivation of this receptor induces depression-like behaviours with a component of agitation that has been associated with functional changes in key brain regions involved in stress response and emotional regulation (Pedraza et al., 2014; Moreno-Fernandez et al., 2017; 2018 a, b).

Summary

One of the most sensitive structures to the negative effects of chronic stress is the hippocampus, which constitutes a crucial structure in the study of the response to stress and the neuronal mechanisms underlying depression (Lin et al., 2018). The effects of stress on the hippocampus entail numerous alterations. In this sense, chronic stress causes hypocortyolemia, due to deregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA axis) (Castilla-Ortega et al., 2011) and affects the hippocampal neurogenesis inducing oxidative stress (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012; Sato et al., 2010). All these alterations of the hippocampus can have repercussions at a cognitive level, fundamentally affecting spatial memory and at an emotional level. In fact, its deregulation is key in the appearance of depressive symptomatology (Boucher et al., 2011). Although numerous neurobiological mechanisms may be responsible for such effects, lipids may now also be involved in stress response. Thus, lipids, due to their physicochemical properties, are crucial for the formation and maintenance of cell structure, as well as for the regulation of numerous signalling pathways (Miranda & Oliveira, 2015). In this sense, it has been observed that, in several key regions that control emotion, such as the prefrontal cortex and hippocampus, exposure to chronic stress or continued administration of exogenous corticosterone, significantly alters the metabolism of sphingolipids and phospholipids (Oliveira et al., 2016). Furthermore, exposure to chronic and unpredictable stress induces changes in the relative cell levels of numerous lipids, including an increase in phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) and a decrease in phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA) and cardiolipine (CL) (Faria et al., 2015). In addition, lipidome studies have identified lipids as key factors in the onset of depression. In this sense, chronic

Summary

administration of LPA in stressful situations potentiates some of its negative effects (Moreno-Fernandez et al., 2019, in review).

The implication of the LPA₁ receptor-mediated signalling system in the stress response has been confirmed in humans. In this regard, certain polymorphisms for the LPA₁ receptor are associated with an increased risk of essential hypertension. Given that exposure to stress increases the susceptibility of patients with risk alleles (Xu et al., 2015), genetic variants of this receptor could increase vulnerability to stress, which would be indirect evidence of the involvement of this receptor in stress. In fact, the reduction of the LPA₁ receptor was observed after unpredictable chronic stress, which could be reversed by antidepressant treatment (Sibille et al., 2009).

Despite all the studies in both animal and human models involving the LPA-LPA₁ signalling system in the stress response, it is not known in detail how chronic stress affects the LPA system. Therefore, using an approach based on mass spectrometry of MALDI-TOF, we have evaluated the impact of a lack of the LPA₁ receptor in the hippocampal levels of specific LPA species (LPA 16:0, LPA 18:0, LPA 18:1 and LPA 18:2). In addition, we also evaluated the effect of the acute stress (exposure to the elevated plus maze test (EPM), restraint stress or the combination of both stressors (restraint stress+EPM)) on the concentrations of LPA species and their hippocampal profile in wildtype and maLPA₁-null mice (second experimental block). Furthermore, corticosterone (CORT), which is one of the main mediators of the impact of stress on the brain and behaviour, were measured blood levels. Neurobiological and behavioural changes after an acute stressor are the first response of the system; however, it would be interesting to know what happens after the application of a chronic stressor in the

hippocampal LPA system. Likewise, a potentiation of the negative effects of stress have been observed at behavioural, endocrine and molecular levels, after the chronic administration of LPA, in stressed animals (Moreno-Fernández et al., 2019, in review), which suggests that this lipidic system may be mediating the neurobiological response to stress. Therefore, in the third experimental block of this doctoral thesis we consider studying what happens in the profile of the hippocampal LPA after exposure to chronic stress. It has also been studied after the effects of continuous administration of LPA on the hippocampal LPA profile.

2. HIPOTESIS AND AIMS

LPA is a bioactive lipid that is involved in intracellular signalling through the six G-protein-coupled receptors (LPA₁₋₆). Among these receptors, LPA₁ is a strong candidate for mediating the central effects of LPA on emotion and can participate in regulation of normal emotional behaviours. Changes in the expression or functionality of this receptor may increase vulnerability to the negative effects of stress and predispose an individual to the development of psychopathological disorders. In fact, mice lacking the LPA₁ receptor exhibit emotional deregulation and increased vulnerability to negative effects of stress (Pedraza et al., 2014; Castilla-Ortega et al., 2011). Based on the accumulated data from studies carried out with animals with genetic deletion of the LPA₁ receptor and taking into account the validity criteria, our group proposed that maLPA₁-null mice represent a good animal model of anxious depression (Moreno-Fernandez et al., 2017; 2018). However, despite the role of the LPA-LPA₁ pathway in emotional

Summary

regulation and functional coping with stress, it is not known in detail, which are the mechanisms that underlie emotion regulation. Due to the activation of the LPA₁ receptor requires LPA, the absence of this receptor is likely to affect hippocampal LPA levels. In addition, LPA species differ in affinities for different LPA receptors (Bandoh et al., 2000; Cerutiset al., 2014) so the profile of different LPA species is likely to be affected in the hippocampus. Since this receptor has a high affinity for both saturated and unsaturated LPA molecules (Bandoh et al., 2000), the absence of LPA₁ is likely to affect the concentrations of different LPA species rather than their profile.

On the other hand, it is a widely confirmed fact that stress alters the metabolism of lipid numbers in key structures for the control of emotions (Faria et al., 2015; Oliveira et al., 2016), but it is unknown how stress regulates the different species of LPA in the hippocampus.

Therefore, the following hypotheses are considered:

1. The activation of the LPA₁ receptor requires LPA, thus the absence of the LPA₁ receptor will cause a reduction in the levels of the different species of LPA and will alter the profile of LPA in the hippocampus.
2. Stress will alter levels and the LPA profile in the hippocampus, which will depend on the mode of stress and the duration of stress.
3. Chronic administration of LPA will cause changes in LPA levels and modify the LPA profile in the hippocampus.

Taking into account all the aforementioned, the main aim of this doctoral thesis has been to study the impacts of stress on the hippocampal LPA system. This main aim

has been divided into 3 specific objectives that has been addressed in three experimental blocks: 1) Development of the MALDI-TOF technique for the determination of concentrations of hippocampal LPA species; 2) Study the lysophospholipidic profile in the hippocampus in situations of acute stress, in the absence of the LPA₁ receptor and after the combination of both factors. 3) Study the impact of chronic stress or continued administration of LPA on the hippocampal phospholipid profile after exposure to chronic stress and continued administration of LPA.

1. FIRST EXPERIMENTAL BLOCK

- a) Determination of LPA species in hippocampus tissue by MALDITOF
- b) Determination of serum LPA species by MALDITOF

2. SECOND EXPERIMENTAL BLOCK

- a) Determination of the concentrations and profile of the hippocampal LPA species in basal conditions.
- b) Determination of the effect of the absence of the LPA₁ receptor on the concentrations and profile of the hippocampal LPA species.
- c) Determination of the concentrations and hippocampal profile of the LPA species in different conditions of acute stress.
- d) Determination of the effect of the combination of absence of the LPA₁ receptor and exposure to different acute stressors on the concentrations and profile of hippocampal LPA species.

3. THIRD EXPERIMENTAL BLOCK

- a) Determination of the concentrations and the hippocampal profile of the LPA species in chronic stress situations.
- b) Determination of the concentrations and hippocampal profile of LPA species after exogenous administration of LPA under baseline conditions or after exposure to chronic stress.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1 Animals

In this doctoral thesis, all experiments were performed using mice with a mixed C57BL/6 *129X1/SvJ background. For the three experimental blocks male aged 3 months wild-type mice were used. For the first and second block, also mice lacking the LPA₁ receptor (maLPA₁-null mice; the Malaga variant of LPA₁-null mice) were employed. The trials were conducted on age-matched male wild-type and maLPA₁-null homozygous littermates that were approximately 3 months old. The maLPA₁-null mouse (termed maLPA₁-Málaga variant of the LPA₁ null-mouse) was spontaneously derived during the original colony (Contos et al., 2000) expansion by crossing heterozygous foundational parents (maintained in the original hybrid C57BL/6J6x1291/SvJ background). MaLPA₁-null mice arising from the colony Malaga variant of LPA₁-null mice were developed in our laboratory and have been described in previous studies (Matas-Rico et al., 2008; Estivill-Torrus et al., 2008). Animals were collectively housed in same genotype groups and same experimental groups (Animal Resource Centre at the University of Malaga) in a room with a temperature of 21 ± 2 °C and $55 \pm 5\%$ relative humidity with a 12 h light/dark cycle and had free access to a standard laboratory diet and tap water.

Summary

Procedures were approved by the Ethics Committee of Malaga University (CEUMA 2013-0008-A/CEUMA: 1-2015- A, 08-7- 15-273) and Junta of Andalucia (08-7-15-273) and were performed in compliance with European animal research laws [European Communities Council Directives 2010/63/UE,90/219/CEE, Regulation (EC) No. 1946/2003] and Spanish National and Regional Guidelines for Animal Experimentation and Use of Genetically Modified Organisms (Real Decreto 53/2013, Ley 32/2007, and Ley 9/2003, Real Decreto 178/2004, and Decreto 320/2010).

Although three experimental block have been carried out, this summary will detail the materials and methods together.

In the first experimental block, hamsters and mice brain tissues were used to set up the LPA species determination method. In order to fine-tune the determinations of the different species of LPA in serum, samples of fetal bovine rabbit and mouse serum, (129X1/SvJ x C57BL/6J; WT and maLPA1-null) were used.

For the second experimental block, the animals were randomized in four environmental conditions: 1) Control group: animals in basal conditions (N = 5 WT; N = 5 maLPA1-nulls); 2) EPM group: animals that performed the elevated plus maze for 5 minute (EPM) (N = 5 WT; N = 8 maLPA1-nulls); 3) Stress group: subjected to restraint stress for 1 hour (N = 5 WT; N = 5 maLPA1-null) and finally, 4) Combination restraint stress with EPM group: animals that have undergone restraint stress for 1 hour followed by EPM test for 5 minute (N = 6 WT; N = 8 maLPA1-null), (the experimental protocol followed is indicated in Figure 1).

Summary

For the third experimental block, the animals were distributed randomly into three groups: 1) Control group: animal were administered by vehicle (N = 4 (WT)); 2) LPA group that was administered by LPA (N = 6); 3) Chronic stress group, which received vehicle and was subjected to restraint stress for 6 hours (N = 5). Pharmacological treatments were administered in the right lateral ventricle. The animals received a daily administration (vehicle or LPA, depending on the group) for 6 days, followed by 2 days off and a daily administration for 6 days again. The environmental conditions applied was standard housing during the time that the procedures or restraint stress lasted, for 12 days, followed by 2 days of rest after day 6. All groups before being perfused have undergone the forced swimming test (FST). (See experimental procedure in Figure 2).

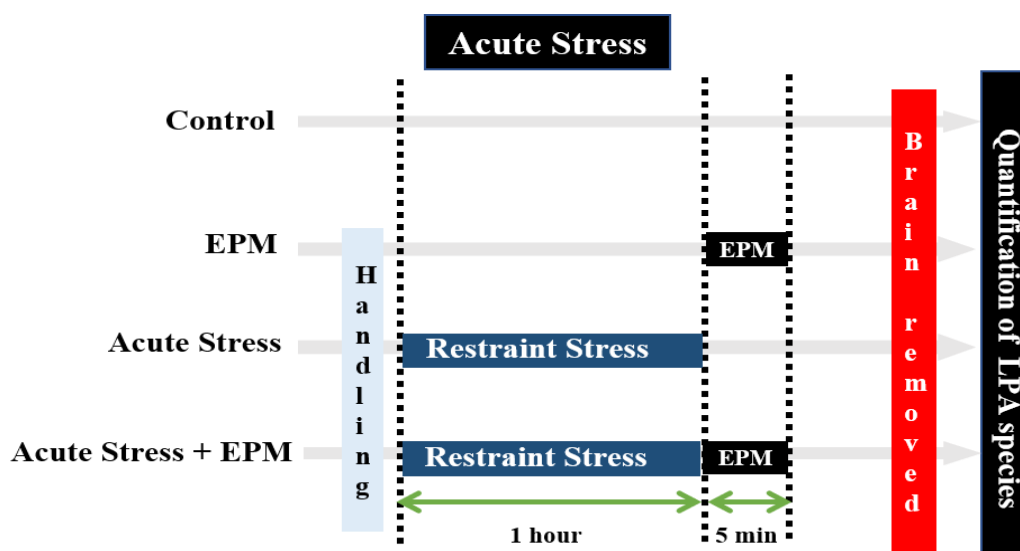


Figure 1: Experimental procedure of the second experimental block. Effects of the four environmental conditions (control, stress induced by EPM, restraint stress and combination of stress restraint and EPM) on hippocampal LPA levels in WT and maLPA1-null mice.

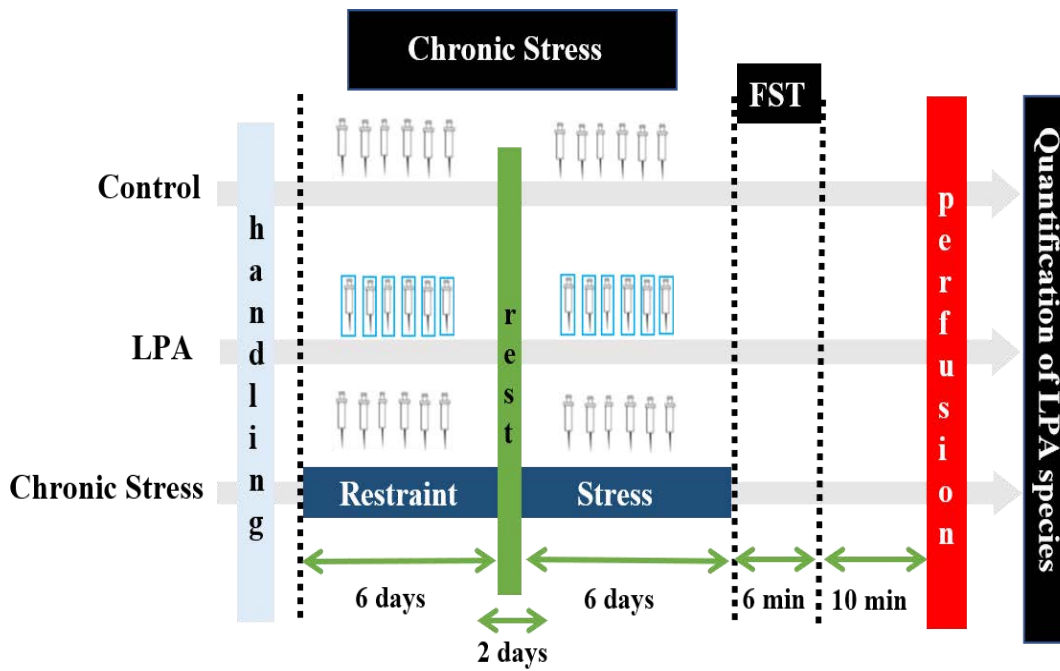


Figure 2: Experimental procedure for the third experimental block. Effects of the three conditions (control, administration of LPA or chronic stress) on LPA levels in the hippocampus of WT mice.

3.2 Intracerebroventricular administration

For the third experimental repeated LPA or vehicle solution was used.

Serum albumin free of 3% fatty acids (Sigma, St. Louis, USA) in phosphate buffered saline (PBS) has been used as a vehicle solution.

The exogenous LPA, oleyl-LPA (LPA 18:1, 1-O-9-(Z)-octadecenyl-sn-glicero-3-phosphate, in ammonium salt form) supplied by Avanti® Polar Lipids Inc.; Alabaster, Alabama; United States, which is the LPA₁ receptor agonist most widely used in most published papers to date (Castilla-Ortega et al, 2014; Ladrón de Guevara et al., 2018; Moreno-Fernández et al., 2019 (under review). This agonist has a high affinity for the LPA₁ receptor (Bandoh et al., 2000; Chun, Hla, Lynch, Spiegel and Moolenaar, 2010; Ma, Nagai, Chun and Ueda, 2013; Uchida, Nagai and Ueda, 2014), with a mean efficacy concentration (EC₅₀) of 11.7 nM (Heise et al., 2001) and 1-10 nM (Choi et al., 2010), and

a maximum efficacy (E_{max}) of 100 nM (Choi et al., 2010). The LPA compound was dissolved in the vehicle solution at a concentration of 200 nM.

The mice, after being anesthetized by inhalation of sevoflurane, were placed in a stereotactic surgical device (Kopf, Tujunga, California, United States). Then, using a Hamilton syringe (21 G/ref 304432 BD microlance TM3 40mm) ~~and~~ was administered in the right lateral ventricle, a volume of 2 μ L vehicle or LPA, depending on the assigned group.

3.3 Stress procedure

The different stress protocols carried out in the second and third experimental blocks are explained below:

Second experimental block

3.3.1 The elevated plus maze (EPM)

The elevated plus maze (EPM), a moderate acute stress model and widely used behavioural test for rodents, was employed (Carobrez and Bertoglio, 2005). The EPM is a simple method for assessing the anxiety responses of rodents (Pellow et al., 1985; Walf and Frye, 2007). However, it may be considered an aversive test that induces moderate increases in stress hormone levels (Mendes-Gomes et al., 2011; Fodor et al., 2016). Based on these findings and taking into account that the luminosity conditions used in our study (90–100 lux) may have anxiogenic properties (reviewed in Violle et al., 2009), the test was used as a mild source of acute stress (Filgueiras et al., 2014) and to assess the possible relationship between the levels of various LPA species and behavioural performance. The EPM consists of two open arms (30 cm long - 5 cm wide; 90– 100 lux) and two enclosed arms (30 cm long x 5 cm wide x15 cm high walls; 25–30 lux) connected to a

common central platform (5 cm x 5 cm) and is elevated 38.5 cm above the floor. For the test, animals were removed from the cage and placed at the junction of the open and closed arms, facing the open arm. At the end of the 5 minutes test, animals were removed from the EPM and placed in the home cage. Using a video tracking system (Ethovision XT, Noldus, Wageningen, Netherlands), the total time spent in each arm and the number of total arm entries were assessed. Additionally, an anxiety index was calculated using the following equation (Cohen et al., 2004; Contreras et al., 2014; da Costa Estrela et al., 2015) (Equation 1):

$$Anxiety\ index = 1 - \left[\frac{\left(\frac{open\ arms\ time(s)}{test\ duration(s)} \right) + \left(\frac{number\ of\ open\ arms\ entries}{total\ numbers\ of\ entries} \right)}{2} \right] \quad (Eq.1)$$

This index, for which the values range from 0 to 1, integrates several variables evaluated in the EPM (Contreras et al., 2014). A score closer to 1 indicates greater anxiety-like behaviours. The extremes of the open arms (distal ends) are the most anxiogenic region of the test, the time in seconds, the number of entries, the latency to the first distal end entry and the percentage of time that animals remain in the distal ends relative to the total time spent in the open arms were evaluated. Locomotion [distance traveled (cm)] and velocity (cm /s) were also recorded. Moreover, ethological patterns exhibited by the animals (freezing behaviour, rearing, grooming, risk assessment, and head dipping) were scored by two researchers blind to animal identity, with an inter-rater reliability measures over 80%. Freezing was measured as time spent by the animal completely immobile during the EPM test. Grooming is one of the most frequently observed behaviours in awake rodents and it was assessed as repetitive, self-directed and sequentially patterned behaviours of hygiene and self-care. Risk assessment was defined as stretch-attend postures toward the open arms of the EPM. Head dipping time was measured as the seconds the

mice spent protruding the head over the edge of the open arms (Nunes-de-Souza et al., 2002; Bibancos et al., 2007; Schneider et al., 2011, Sorregotti et al., 2013).

3.3.2 Restraint Stress

3.3.2.1. Acute restraint stress

Animals were submitted to an acute stress procedure by restraint. Acute restraint is an uncontrollable stress condition that induces several emotional and autonomic responses (Reis et al., 2011). For this purpose, animals were placed in a 50 ml clear polystyrene conical centrifuge tube modified with air holes for ventilation (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012; Zimprich et al., 2014) for 1 h, and in case of chronic stress was 6 hours for 12 days with 2 days off every 6 days. After restraint procedure, mice were placed back into their transport cages. Control mice belong second experimental block were remained undisturbed in their home cage.

Third experimental block

3.3.2.2. Chronic restraint stress

For the third experimental block, the animals were submitted to a restraint during 6 hour per day, for 12 days with 2 days off every 6 days.

3.3.3 Swimming Forced Test (FST)

Along the application of repeated stress, all experimental groups were submitted to the forced swimming test (FST). This behavioural test that allows the analysis of passive and active coping behaviour used in studies of depression disorder (Porsolt, 1979; Porsolt et al., 1977), is stressful (Yankelevitch-Yahav et al., 2015), and can be used as an acute stress induction procedure. The modified protocol of Cryan, Markou, & Lucki, (2002) was used, in which the animals were individually placed in a Plexiglas cylinder

(Malaga, Spain) with dimensions of 30 cm high \times 10 cm in diameter filled with water at a temperature of 23 ± 1 ° C up to a depth of 25 cm for 6 minutes.

3.4 LPA extraction from hippocampal tissues

After perfecting the procedure of the LPA extraction from the hippocampal tissues (first experimental block), for the second objective (acute stress), ten minutes after completing the stress procedure or the behavioural test, all animals were decapitated. In the case of the third experimental block, animals were perfused after completing the procedure of FST.

Brains were removed and the hippocampus was macrodissected, collected in a tube, drop-frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80°C until further analyses of LPA species. The average wet weight of the isolated unilateral hippocampus from each mouse was approximately 10 mg of tissue weight.

Lysophosphatidic acid was extracted from the hippocampal tissues using a modified version of previously described methods (Tanaka et al., 2004; Morishige et al., 2010; Ma et al., 2013).

First, the isolated hippocampus was resuspended in 200 μl of O-vanadate [100 mM] and EDTA [1 mM] and homogenized. Subsequently, 1 ml of acetone with 0.5 nmol of internal standard (17:0 LPA) was added. The resulting pellet was washed twice with 0.5 ml of acetone and dried under a nitrogen stream. Then, 380 μl of CHCl_3 , MeOH, and H_2O (1:2:0.8) were added and centrifuged for 5 min for two repetitions. A solution of 0.4 ml of CHCl_3 , 0.4 ml of KCl, and 2 ml of ammonia (28%) was added to the supernatant. The mixture was centrifuged at $1300 \times g$ for 5 min and the CHCl_3 phase was removed. The aqueous phase was washed 4 times with a solution composed of 0.8 ml of CHCl_3 and MeOH (17:3). Afterward, 50 ml of Phos-tag [1 mM] (Monoisotopic $^{68}\text{Zn}^{2}\text{C}$ -Phos-tag (Phos-tagR) obtained from the NARD Institute Ltd. (Hyogo, Japan) and 0.8 ml of a

Summary

CHCl₃ and MeOH solution (17:3) were added. The mixture was centrifuged at 1300 x g for 5 min and the CHCl₃ phase was collected. The aqueous phase was washed twice with 0.8 ml of the CHCl₃ and MeOH solution (17:3). The CHCl₃ phase was collected and dried under a nitrogen stream. Finally, the LPA product was dissolved in 100 ml of MeOH/NH₄OH (0.1%).

For the third experimental block, the procedure was the same. The brain were removed after completing experimental procedures (Chronic stress or chronic LPA administration and 10 min after FST; please see figure 2).

3.5 LPA extraction from serum

For the determination of serum LPA species, a modified version of the method described by Morishige et al., 2010 has been used. For this purpose, we have used quantities of 25 µl of serum. A quantity of 0.5 nmol of internal standard (LPA 17:0 in 400 µl MeOH) was added directly to the serum sample. Then, it was stirred in an ice bath for 10 min and centrifuged at 8000G for 5 minutes. The MeOH phase was recovered and washed by precipitating with 100 µl MeOH, recovering the MeOH phase again. Subsequently, half the volume of H₂O was added to the entire MeOH phase and then half the total volume of the CHCl₃ and MeOH dissolution was added (in relation to 17:3). The resulting aqueous phase was washed four times with CHCl₃ and MeOH (relative to 17:3), maintaining the CHCl₃ phase and drying with nitrogen. 50 µL MeOH/NH₄OH (0.1%) was added to the final product.

3.6 LPA Analysis using MALDI -TOFMS

Tissue phospholipids were analyzed using an ultraflex MALDI-TOF mass spectrometer (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). To this end, 1 µl was removed from 100 µl of LPA in a MeOH/NH₄OH (0.1%) solution and mixed with

Summary

1 μl of a THAP solution (10 mg/ml) in acetonitrile. The mixture was spotted on an MALDI plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). After drying, the sample was washed with water and dried again. Mass spectrometry was performed in the positive mode using an acceleration voltage of 25 kV. The laser energy was 30–70% (3.0–7.0 mJ) with a repetition rate of 10 Hz. The mass spectra were calibrated externally using a peptide calibration standard (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Each spectrum was produced by accumulating data from 3000 or 6000 consecutive laser shots.

For calibration curves, LPA standards [16:0, 18:0, 18:1, 18:2, and 20:4, which were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL)] and an internal standard (17:0 LPA, purchased from Avanti Polar Lipids) were mixed at different molar ratios and dissolved MeOH/NH₄OH (0.1%). Then, 50 μL of Phos-tag [1 mM] were added. The resulting mixture was analyzed using the aforementioned procedure for determining tissue phospholipid levels. The concentrations in hippocampal tissues were determined based on the ratio of the intensity of Phos-tag-linked LPA to the internal standard 17:0 LPA linked to Phos-tag using the equations for calibrations curves for all LPA standards. Since the level of 20:4 LPA in the hippocampus was below the detection limit, this species was not subjected to further analysis. Total LPA concentrations, which represent the sum of all LPA species determined, except for 20:4 LPA, were also calculated. Concentrations of LPA and LPA species are reported as pmol/mg of hippocampal tissue. Additionally, lipid concentrations of each species were normalized to the concentration of all LPA species detected in the hippocampus (Oliveira et al., 2016) and the data were presented as the mean percentages (see equation 2). These values may be interpreted as reflecting the relative abundances of LPA species analyzed in the hippocampus to total LPA species.

$$\% \text{ LPA species} = 100 * \frac{[\text{LPA species}]}{([\text{LPA 16:0}] + [\text{LPA 18:0}] + [\text{LPA 18:1}] + [\text{LPA 18:2}])} \quad (\text{Eq.2})$$

3.7 Corticosterone experiment

For the second experimental block, mice were decapitated 10 min after completing the behavioural test or the 1 h restraint procedure, and trunk blood was collected and allowed to clot to obtain serum samples. For the measurement of corticosterone levels, blood samples were centrifuged and the supernatant stored at -80°C . Serum corticosterone levels were measured using a commercially available enzyme immunoassay kit, with a sensitivity of 27.0 pg/ml, according to the manufacturer's instructions (Assay Designs/Stressgen, Ann Arbor, MI, United States).

3.8 Statistical analysis

All results are presented as mean \pm s.e.m.; $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses were carried out using the statistical package STATISTICA 8 ("STATISTICA 8", 2007).

3.8.1 EPM Test

In the behavioural tests, after checking the supposed homogeneity of the variance with the Levene test, the duration of the behaviours exhibited by the animals of both genotypes during the performance of the EPM was analysed by means of factorial ANOVA under baseline and acute stress conditions.

3.8.2 LPA quantification in the second experimental block

For the quantification of LPA species, the impact of the LPA₁ receptor deficiency on the LPA profile was first evaluated. To do this under conditions of equal variance, Student's t-test was used to examine the differences in total LPA concentrations and

concentrations of each LPA species between the two genotypes. Subsequently, the effect of acute stress, of different intensity, in wildtype mice were determined. Statistical analysis of these data was carried out using a one-way ANOVA followed by the Fisher Significant Minimal Difference (LSD) test. Finally, the effects of the interaction between LPA₁ receptor deficiency and restraint stress were examined using a factorial ANOVA with two factors: genotype (WT or maLPA₁-null mice) and environmental treatment (Control, EPM, restraint stress or restraint stress+EPM) followed by LSD analysis when were necessary. These analyses were performed for both concentration and relative abundance percentage.

3.8.3 Corticosterone analysis

Differences in CORT levels between genotypes and environmental treatments (Control, EPM, and restraint stress) were analyzed by factorial ANOVA analysis followed by LSD analysis.

3.8.4 LPA quantification in the third experimental block

The effect of chronic stress on LPA species was first studied. Subsequently, the effect of repeated administration of LPA on species and LPA profile in the hippocampus were determined, using a t-student to compare total LPA and each LPA species.

4. RESULTS

4.1 Results achieved in the first experimental block

4.1.1 Calibration curve

The calibration lines for each species of LPA (Figure 3) were obtained from the dilutions of the intensities obtained from the spectra (Figure 4), corresponding to each concentration of standards for the calibration curve in which several samples of standards of LPA standards (16:0, 18:0, 18:1, 18:2 and 20:4) were used to 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 nmol with internal standard at 0.2 nmol (17:0 LPA).

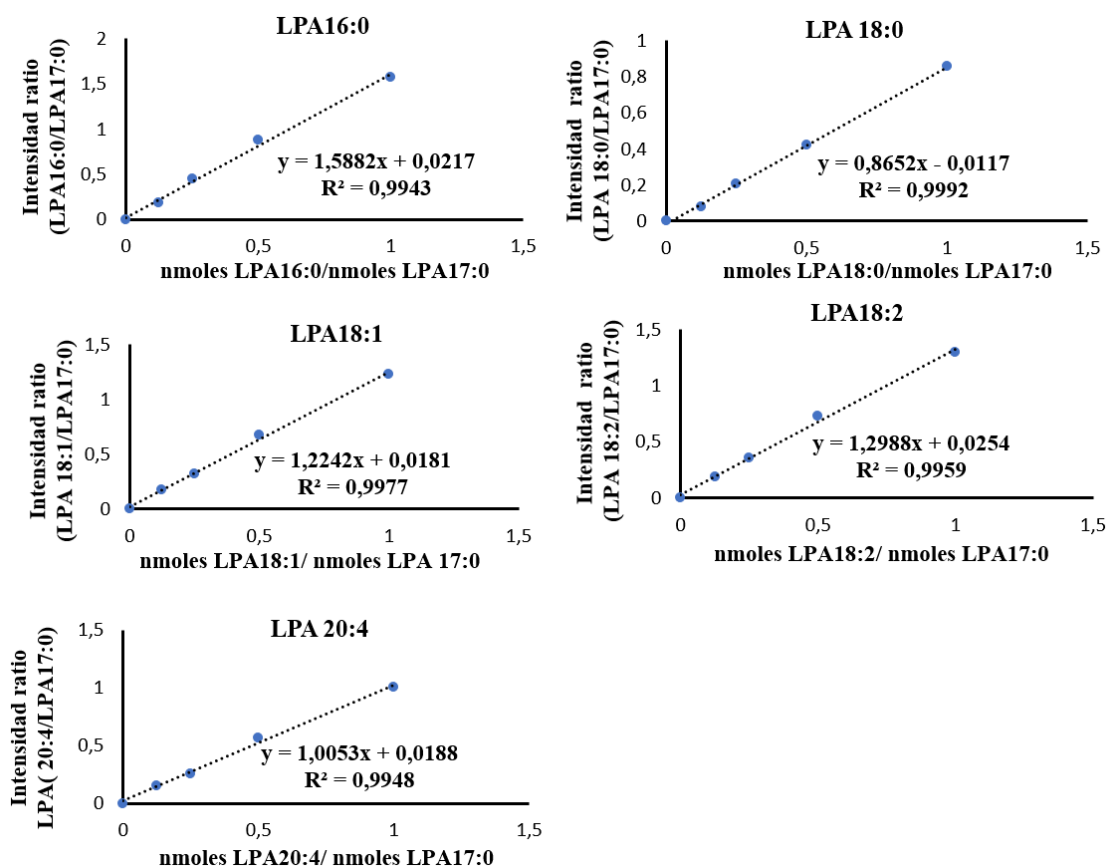


Figure 3: Example of calibration lines made for each species of LPA standard.

Summary

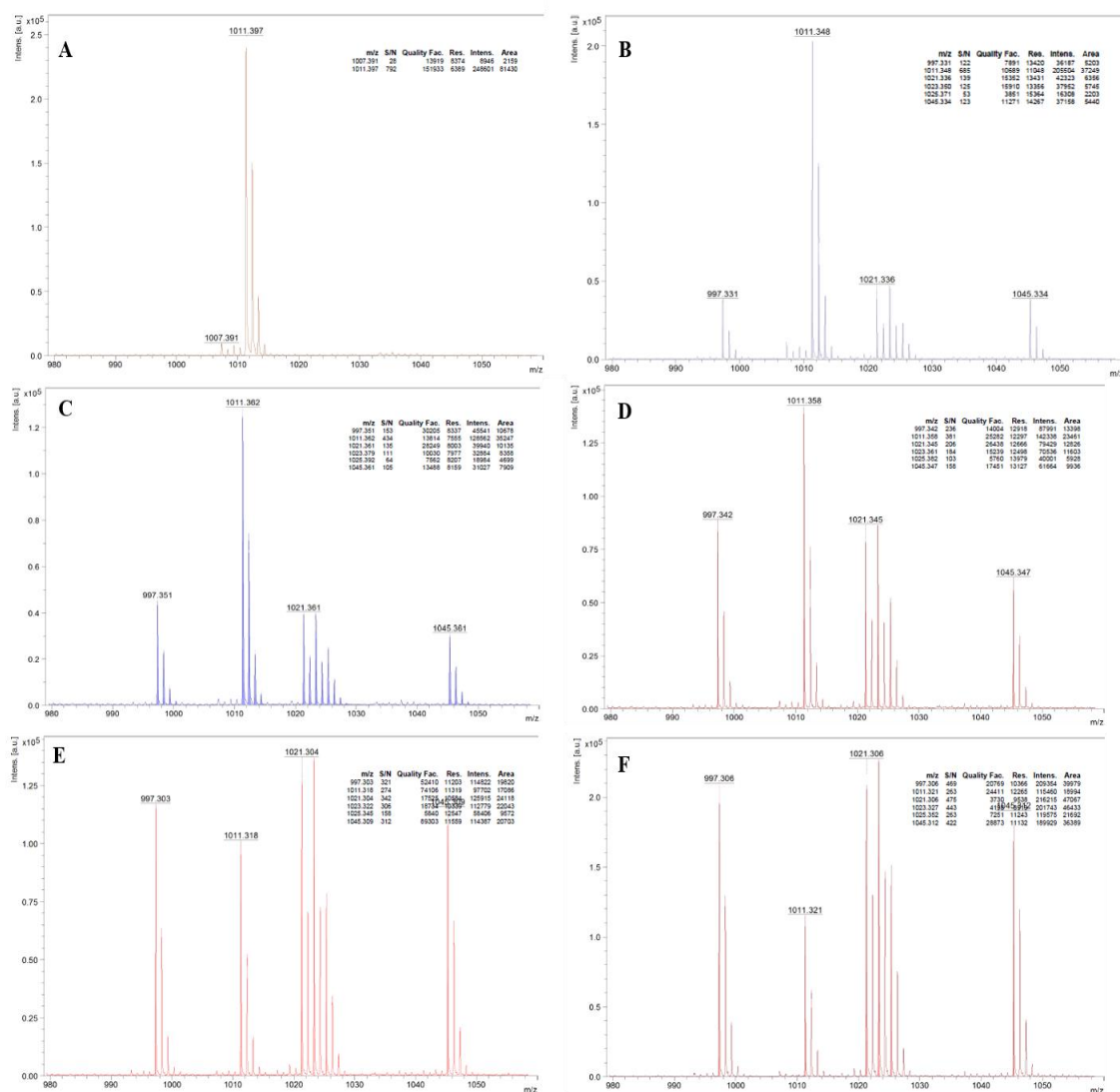


Figure 4: Spectra for LPA species standards for the calibration line. A) Molar ratio = 0; B) Molar ratio = 0.125; C) Molar ratio = 0.25; D) Molar ratio = 0.5; E) Molar ratio = 1; F) Molar ratio = 2. (Annex I).

The intensity data were obtained in triplicate and in each replicate, similar values were obtained to the previous one, demonstrating that the method is precise. On the other hand, given the proximity of R to the value of the unit, it can be verified that the procedure meets the linearity criterion. In addition, the values of the quantities of LPA in tissue are within the reference values which may indicate that the procedure is appropriate for the determination of the intensities.

4.1.2 Spectra in tissue sample

In the quantification of LPA species in brain tissue, data were obtained in triplicate and in each replicate similar values to the previous one were obtained. Tests were performed on mouse hippocampus tissue (Figure 5) and hamster brain (Figure 6) for amounts less than 100 mg of tissue. It is observed that all species of LPA are present. Thus, at 997 m/z the signal of 16:0 is found, at 1025 m/z the signal of 18:0, at 1023 m/z the signal of 18:1, at 1021 m/z the signal of 18:2 and finally, at 1045 the signal of the specie 20:4, similar to that described by other authors (Ma et al., 2013; Morishige et al., 2010; Tanaka et al., 2004). In tests of LPA extractions in brain tissue of more than 100 mg, all species of LPA were also obtained (Figure 7). Finally, mouse tissue hippocampus (strain 129X1/SvJ x C57BL/6J) were analyzed for both WT (8A) and maLPA₁-null (8B) where LPA species are observed in both genotypes.

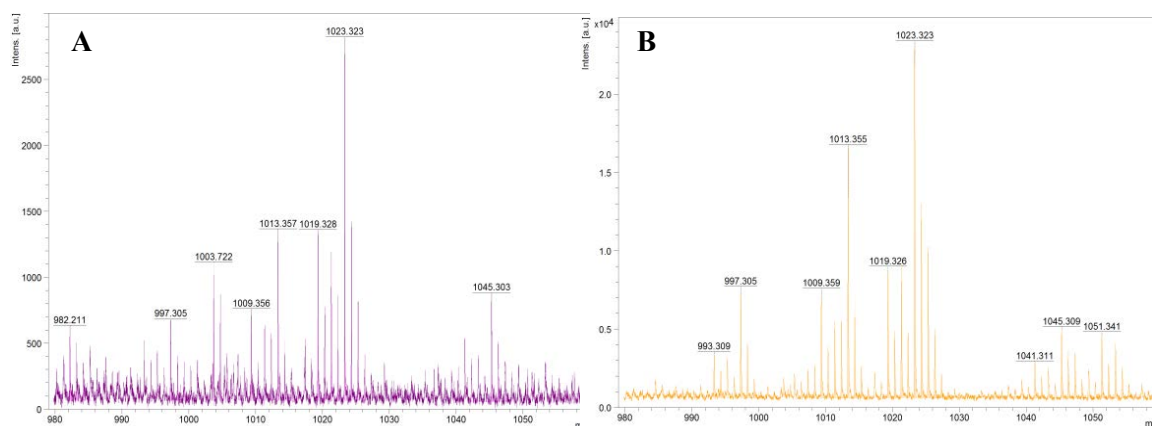


Figure 5: Spectra of LPA species signals obtained from tissue extractions less than 100 mg of mouse hippocampus. A) 33 mg tissue test B) 44 mg tissue test. (Annex II)

Summary

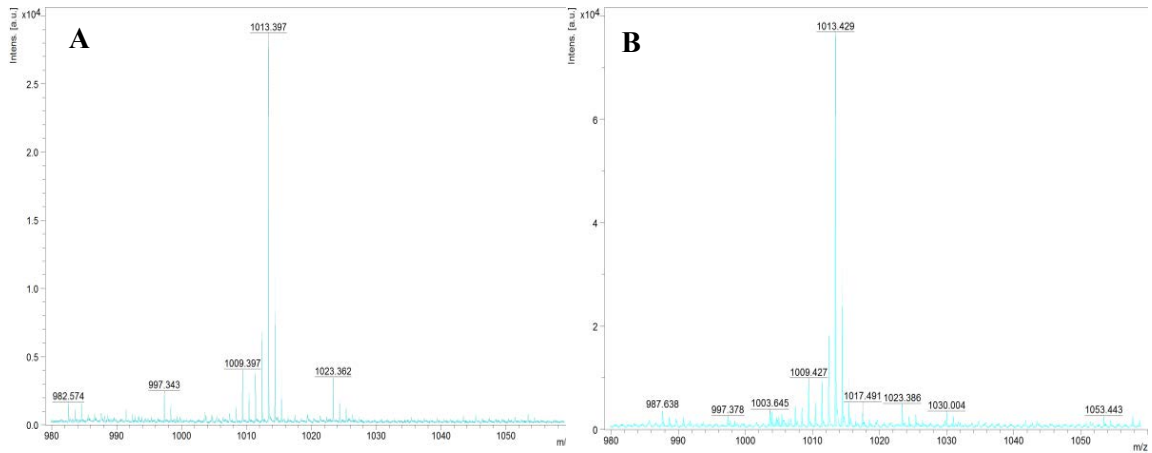


Figure 6: Spectra of signals from LPA species obtained from tissue extractions less than 100 mg of hamster brain. A) 20 mg tissue test; B) 100 mg test. (Annex III)

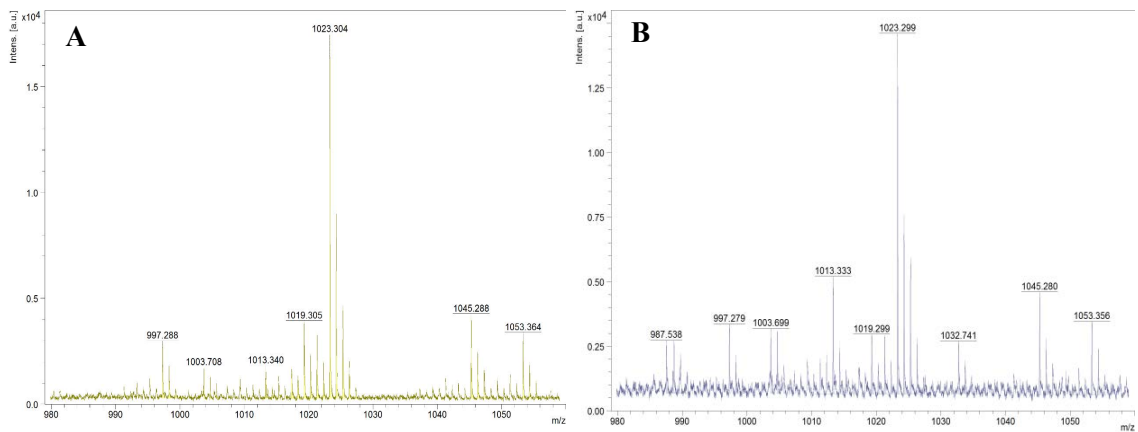


Figure 7: Spectra of LPA species signals obtained from mouse brain tissue extractions greater than 100 mg. A) 456 mg tissue test B) 234 mg tissue test. (Annex IV)

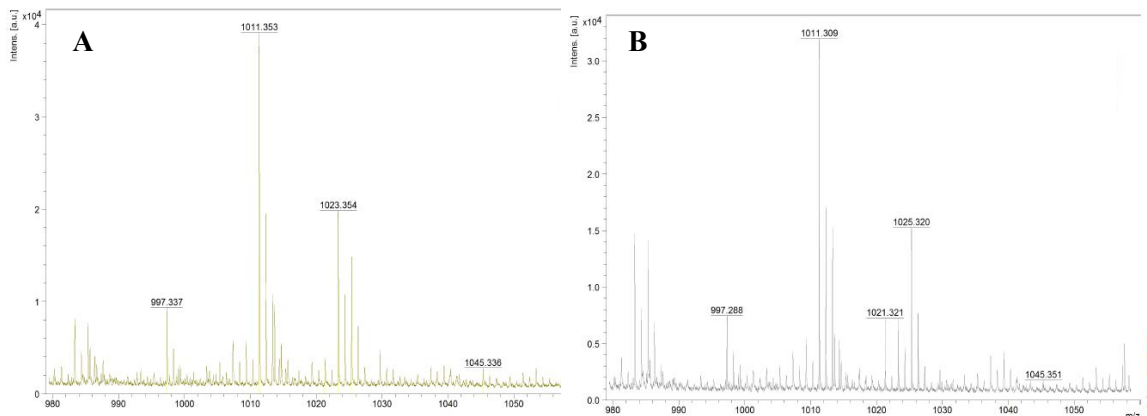


Figure 8: Spectra of LPA species signals obtained from hippocampus of mice of the mixed strain 129X1/SvJ x C57BL/6J. A) WT; B) maLPA1-null. (Annex V)

4.1.3 Spectra in serum sample

In 25 μ l of fetal bovine serum (Figure 9) and rabbit serum (Figure 10) the different LPA species were observed. However, in most tests performed on mouse serum noise signals were obtained that did not correspond to the signals of the LPA species (Figure 11), so the determination of LPA in serum of mice with mixed genetic background 129X1/SvJ x C57BL/6J was not feasible.

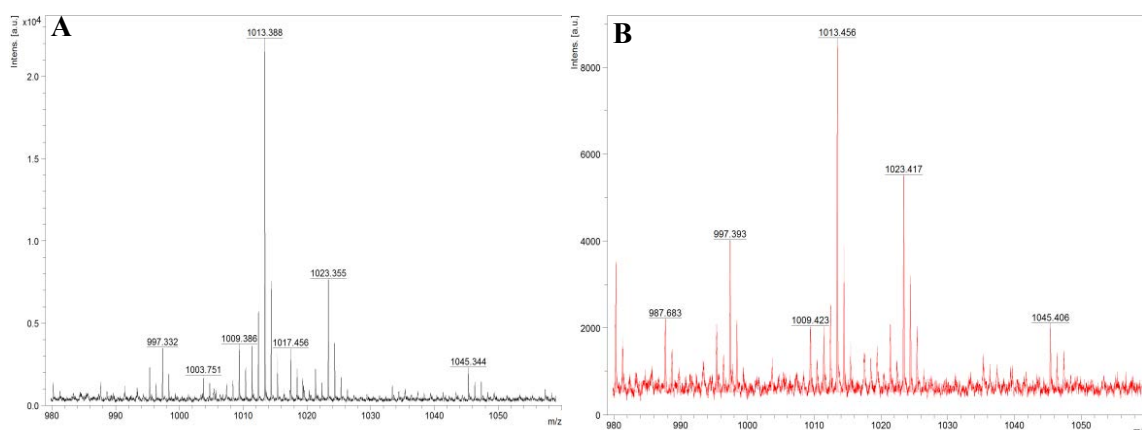


Figure 9: Spectra of LPA species signals obtained in 25 μ l fetal bovine serum. A) Sample 1; B) Sample 2. (Annex VI).

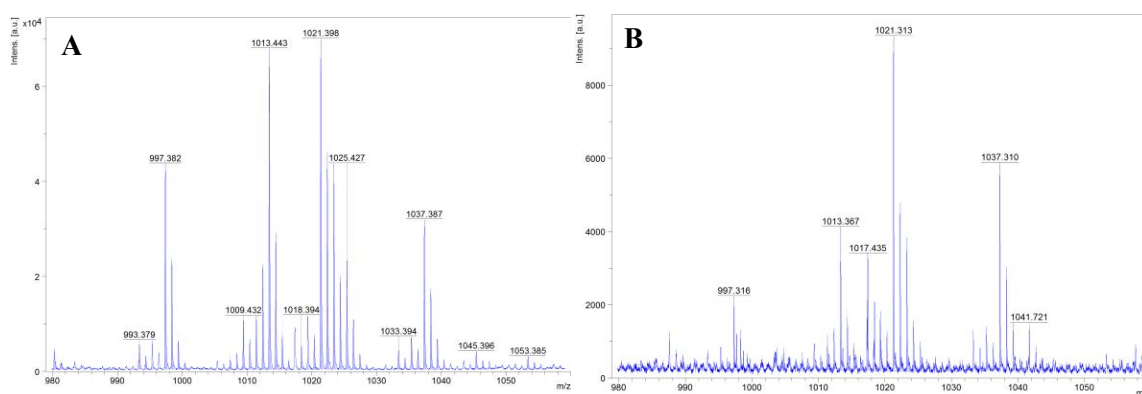


Figure 10: Spectra of LPA species signals obtained in 25 μ l rabbit serum. A) Sample 1; B) Sample 2. (Annex VII)

Summary

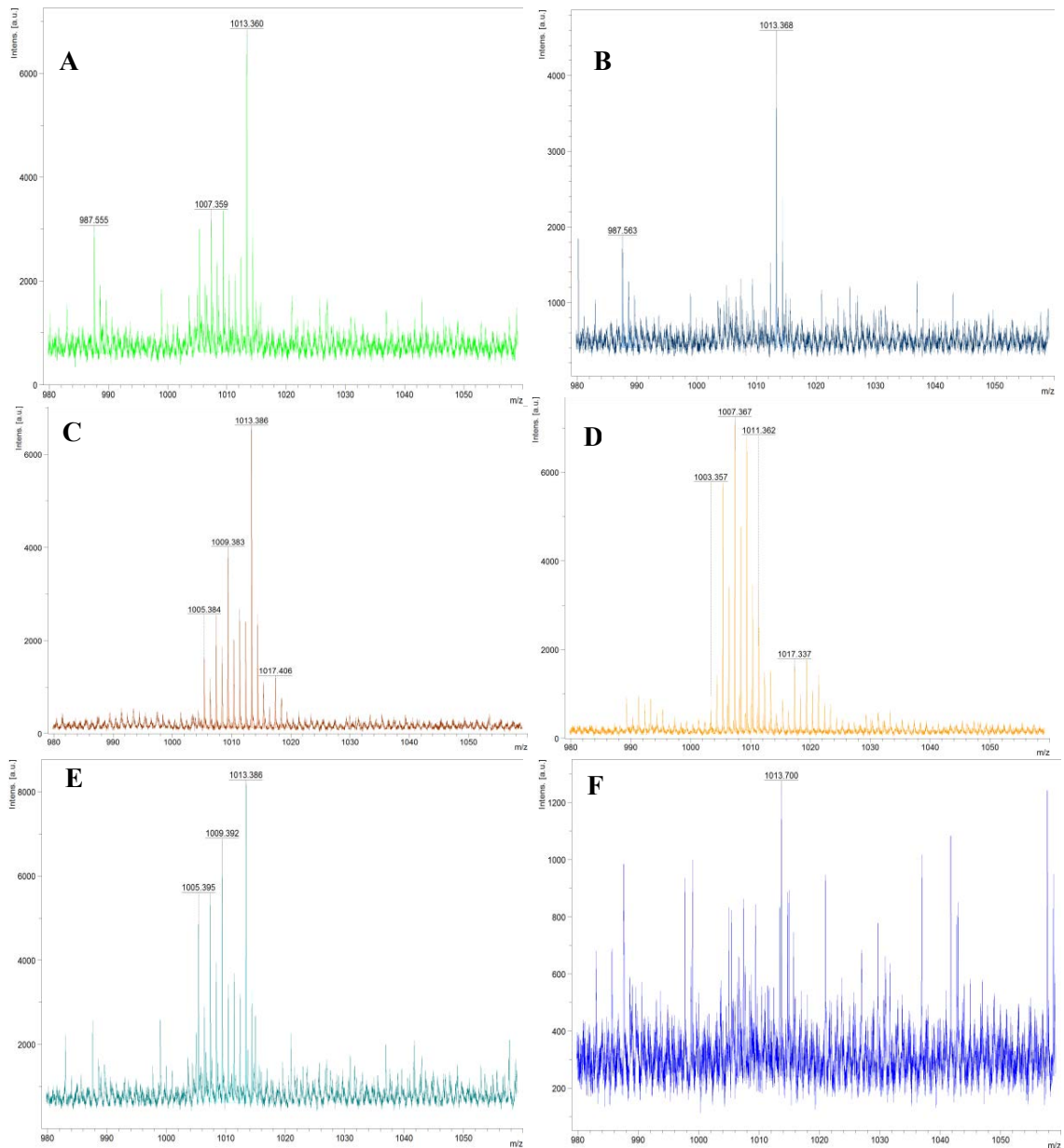


Figure 11: Spectra of noise signals from LPA species obtained in 25 μ l samples of serum from three different mice. Mouse 1: A) Sample 1; B) Sample 2. Mouse 2: C) Sample 3; D) Sample 4. Mouse 3: E) Sample 5; F) Sample 6. (Annex VIII)

4.2 Results achieved in the second experimental block

4.2.1 Behavioural test (EPM)

The animals were evaluated in the EPM behavioural test. In this study, the test was used for a dual purpose. In one hand, it was used as a behavioural test to measure anxiety parameters and on the other hand, as a stress induction procedure. For this reason, when reference is made to the behaviours shown by the animals in the EPM test, a control group (animals that have not previously undergone any procedure) and stress group (animals subjected to the restraint stress procedure prior to the EPM test) are indicated.

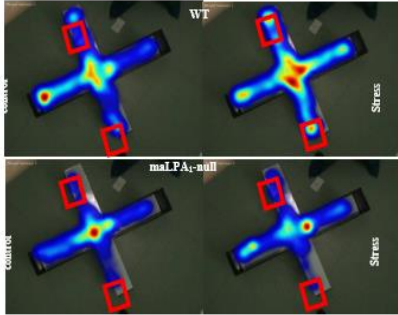
The behaviour shown in the WT and maLPA₁-null mice was different. In this sense, in comparison with WT, mice without LPA₁ receptor showed an anxious phenotype, consistent with previous studies (Santín et al., 2009; Castilla-Ortega et al., 2010; Moreno-Fernández et al., 2017; 2018) (Figure 12). In this sense, maLPA₁-null mice spent significantly less time in open arms ($F(1, 23) = 4.79$; $p \leq 0.05$) (Figure 12B and C), showing also a smaller number of open arm entries ($F(1, 23) = 10.13$; $p \leq 0.01$). In fact, a significantly higher anxiety index was observed in mice lacking the LPA₁ receptor ($F(1, 23) = 4.51$; $p \leq 0.05$) LSD; $p \leq 0.05$ (Figure 12D). Analysis of the number of entries and the first entry latency at the ends of the open arms, considered the most aversive region in the labyrinth, reveals differences between the groups ($F(1, 23) = 10.13$; $p \leq 0.005$ and $F(1, 16) = 5.23$; $p \leq 0.05$ respectively) (Figure 12E and F). In this sense, the control animals of the maLPA₁-null genotype entered fewer entries and the latency of the first entry was significantly higher than the WT control animals (LSD; $p \leq 0.05$). In contrast, no significant differences were observed between the animals of both genotypes subjected to the restraint stress protocol in the number of entries and time in the open

Summary

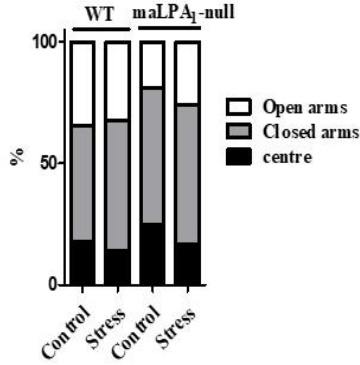
arms as well as in the anxiety index. Nevertheless, in maLPA₁-null animals, stress significantly increased the number of entries and reduced latency to access the ends of the labyrinth (LSD ≤ 0.05). On the other hand, the distance travelled (F (1, 23) =15.51; $p \leq 0.001$) and the average speed in the EPM test was also lower in mice lacking LPA₁ (F (1, 23) =16.50; $p \leq 0.001$) (LSD; $p \leq 0.05$) (12G and H respectively), indicating less exploratory activity in these animals. However, the time spent in the open and closed arms did not correlate with the distance travelled by the animals of the two genotypes at baseline ($r = -0.55$; $p > 0.5$ and $r = 0.41$; $p > 0.05$ for the open and closed arms, respectively, in WT and $r = -0.15$ mice; $p > 0.05$ and $r = 0.21$; $p > 0.5$ for the open and closed arms, respectively, in maLPA₁-null mice). With respect to ethological parameters, the absence of the LPA₁ receptor induced a significant increase in risk assessment behaviour (F (1, 23) =7.03; $p \leq 0.05$) (LSD; $p \leq 0.05$) and a decrease in head dipping (F(1, 23)=15,25; $p \leq 0.001$) (LSD ≤ 0.05) (Figure 12N) and rearing (F(1, 23)=17,37; $p \leq 0.001$) (LSD ≤ 0.05) (Figure 12K). Finally, maLPA₁-null mice are longer freezing (F(1,23)=5,19; $p \leq 0.05$) (LSD; $p \leq 0.05$) than animals of the WT genotype (Figure 12J).

Summary

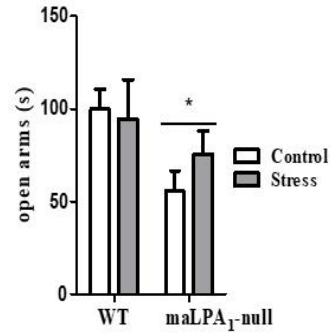
A) Exploratio of the device



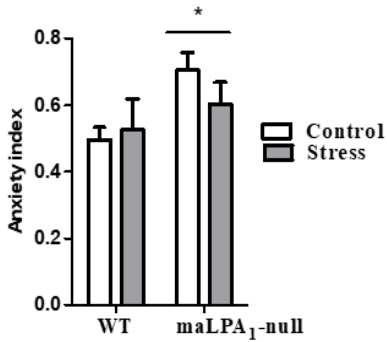
B) Time in EPM sections



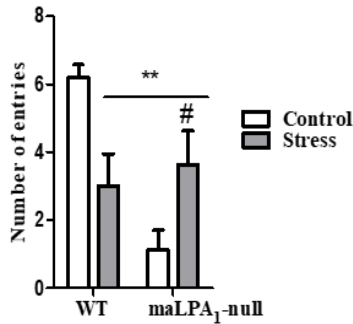
C)



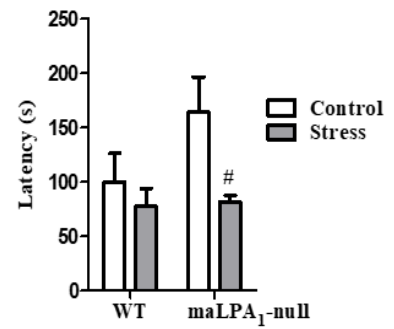
D)



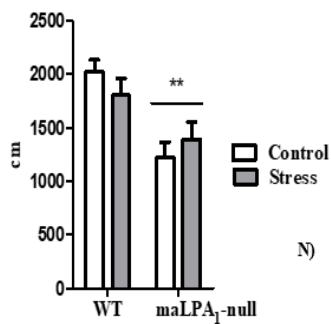
E) Extremes



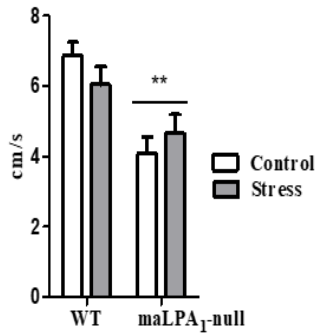
F) Extremes



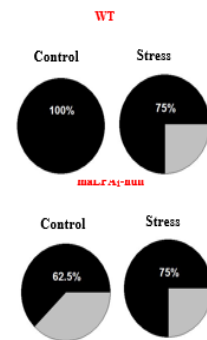
G) Distance



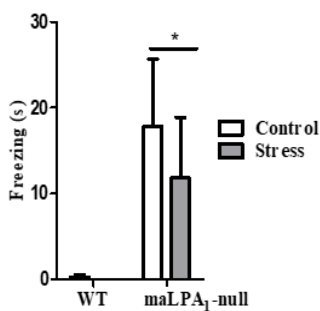
H) Velocity



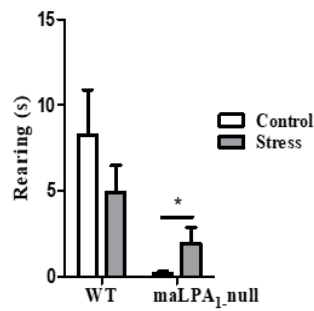
I) % of mice entering the distal ends of open arms



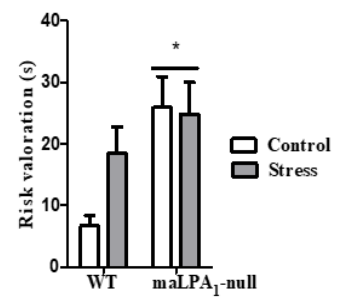
J)



K)



L)



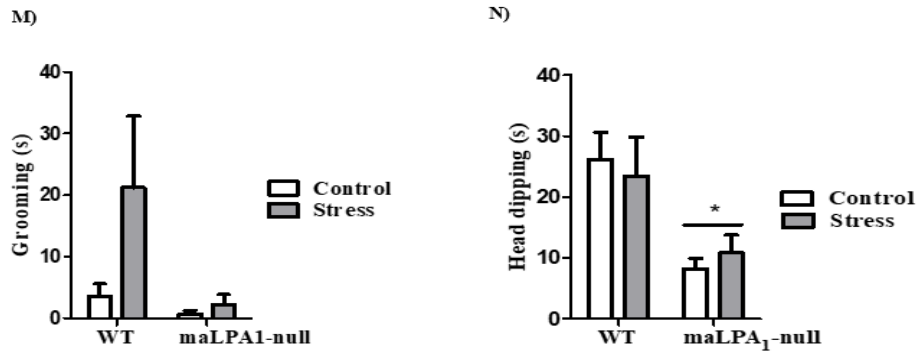


Figure 12: Behaviours analysed during the EPM test. The graphs show the assessment of device, for each genotype in basal conditions or under stress, and expressed as means \pm SEM. A) Composite map of all the paths travelled during the EPM test for each genotype. The maps are presented as "heat maps", indicating mean residence times according to colour code, with warmer colours indicating high residence times in the different compartments of the EPM and cooler colours indicating low residence times. B) Percentage of time spent in the EPM divided by the percentage of time spent in the open arms, closed arms and centre. C) Time spent in the open-air arm. D) Anxiety index. E) Number of entries at distal extremities. (F) Latency at the ends. G) Distance travelled in the labyrinth. H) Velocity I) Percentage of time the animals remained at the distal ends in relation to the total time spent in the open arms. Ethological parameters: J) freezing, K) rearing, L) risk assessment M) grooming, (K) head dipping. Post hoc LSD analyses are shown: differences between WT and maLPA1-null genotypes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) and differences between control and stress (# $p < 0.05$).

4.2.2 LPA species quantification under baseline conditions in wildtype and maLPA1-null mice

The absence of the LPA₁ receptor did not result in changes in total LPA concentrations ($t(8) = -0.12$, $p > 0.05$) (Figure 13A), nor in the concentrations of any of the LPA species examined in the hippocampus ($t(8) = 0$, $p > 0.05$; $t(8) = -0.7$, $p > 0.05$; $t(8) = 1.7$, $p > 0.05$; $t(8) = -0.96$, $p > 0.05$ for LPA 16:0; 18:0; 18:1 and 18:2, respectively) (Figure 13B). Regarding the percentage of relative abundance, in the hippocampus of mice lacking the LPA₁ receptor only changes in the expression of the species LPA 18:0 ($t(8) = -3.51$, $p = 0.007$) were observed, without significant changes in the percentage of relative abundance of the rest of the species evaluated ($t(8) = 0.20$ $p > 0.05$; $t(8) = 0$, $p > 0.05$).

$p > 0.05$; $t(8) = 0.12$, $p > 0.05$; $t(8) = 0.36$, $p > 0.05$ for LPA 16:0; 18:0; 18:1 and 18:2, respectively) (Figure 13C). In both WT and maLPA1-nulls, LPA 18:0 was the most abundant species in the hippocampus, followed by 18:1. On the other hand, the species LPA 20:4 was less abundant in the hippocampus of both genotypes, which caused a detection error and was therefore eliminated from the statistical analyses carried out. Taken together, these data suggest that the absence of the LPA₁ is not associated with major changes in the profile of lysophospholipids in the hippocampus.

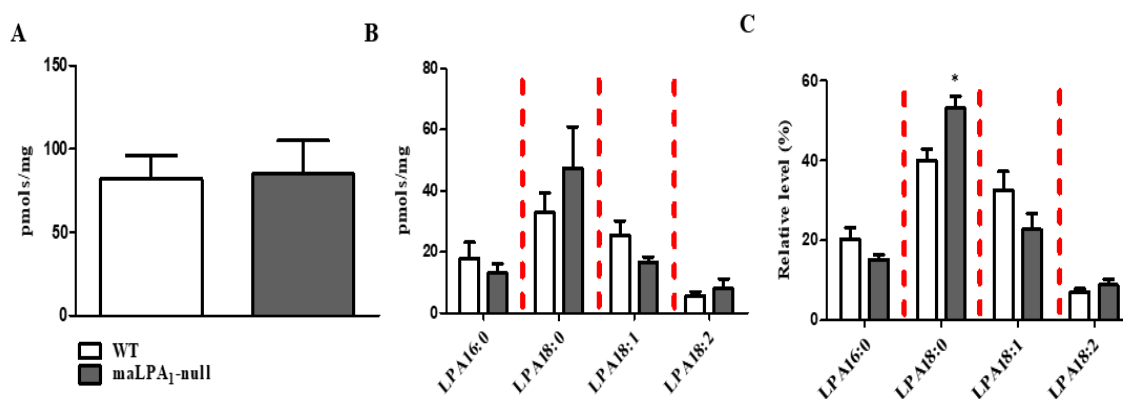


Figure 13: LPA in hippocampus of mice under baseline conditions. A) Total concentration of LPA per genotype. B) Concentrations of the different species of LPA in WT and maLPA1-null. C) Relative levels of LPA species according to genotype. LPA₁ receptor deficiency is not associated with major changes in the profile of lysophospholipids in the hippocampus. Post hoc LSD analyses are shown: differences with the WT group (* $p < 0.05$ WT versus maLPA1-nulls).

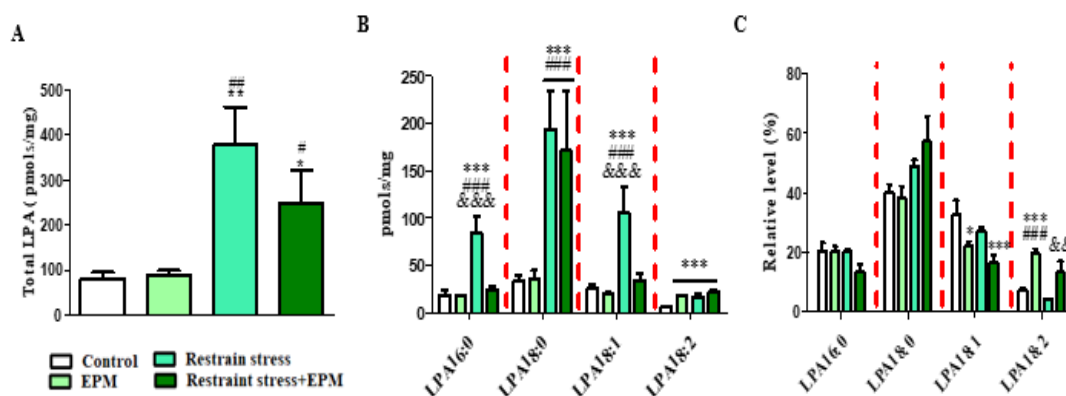
4.2.2 LPA species quantification under acute stress

After exposure to EPM, restraint stress and restraint stress+EPM, we observed a large disturbance in the concentrations of both all LPA species and total LPA in the WT hippocampus (Figure 14A and B). The one-way ANOVA revealed the effects of stress on the total LPA concentration ($F(3, 17) = 5.70$, $p \leq 0.01$) and the concentrations of all examined LPA species ($F(3, 17) = 11.52$; $p \leq 0.001$ for LPA 16:0; $F(3, 17) = 4.23$; $p \leq 0.02$ for LPA 18:0; $F(3, 16) = 9.28$; $p \leq 0.001$ for LPA 18:1; $F(3, 17) = 9.87$; $p \leq 0.001$ for LPA 18:2). Post hoc analysis showed an increase in total LPA concentrations after

Summary

moderate (LSD; $p \leq 0.05$) and intense (LSD; $p \leq 0.06$) stress. In relation to the different species analysed, LSD revealed that immobilization stress increased concentrations of all species examined (LSD; $p \leq 0.001$ control versus stressed animals for each species) and an increase in LPA 18:0 (LSD; $p \leq 0.001$) and LPA 18:2 (LSD; $p \leq 0.001$) species in animals under restraint stress+EPM. In contrast, concentrations of LPA 16:0 and LPA 18:1 species were reduced in animals under restraint stress +EPM compared to animals that had only been restrained (LSD; $p \leq 0.001$). However, stress caused by EPM behaviour only affected the concentration of species LPA 18:2 (LSD; $p = 0.02$). With regard to the effects of stress on the percentage of relative abundance, a reduction of the species LPA 18:1 ($F(3, 16) = 5.79$; $p \leq 0.01$) was observed in animals that underwent EPM (LSD; $p \leq 0.05$) and restraint stress+EPM (LSD; $p \leq 0.01$), in relation to the control group. In contrast, the percentage of relative abundance of the species LPA 18:2 was affected by treatments ($F(3, 17) = 7.97$; $p \leq 0.01$). In this sense, EPM stress (LSD; $p \leq 0.01$) and restraint stress+ EPM, although without reaching statistically significant differences (LSD; $p = 0.08$) increased their values in relation to the control group. However, restraint stress did not change the profile of relative abundance levels of hippocampal LPA species (LSD; $p > 0.05$) (Figure 14C). Taking into account all the data, restraint stress was the one that produced the greatest change in LPA concentrations in the hippocampus (Figure 14A and B), whereas stress from exposure to EPM had a greater incidence in the proportions of the relative species (Figure 14 C).

Summary



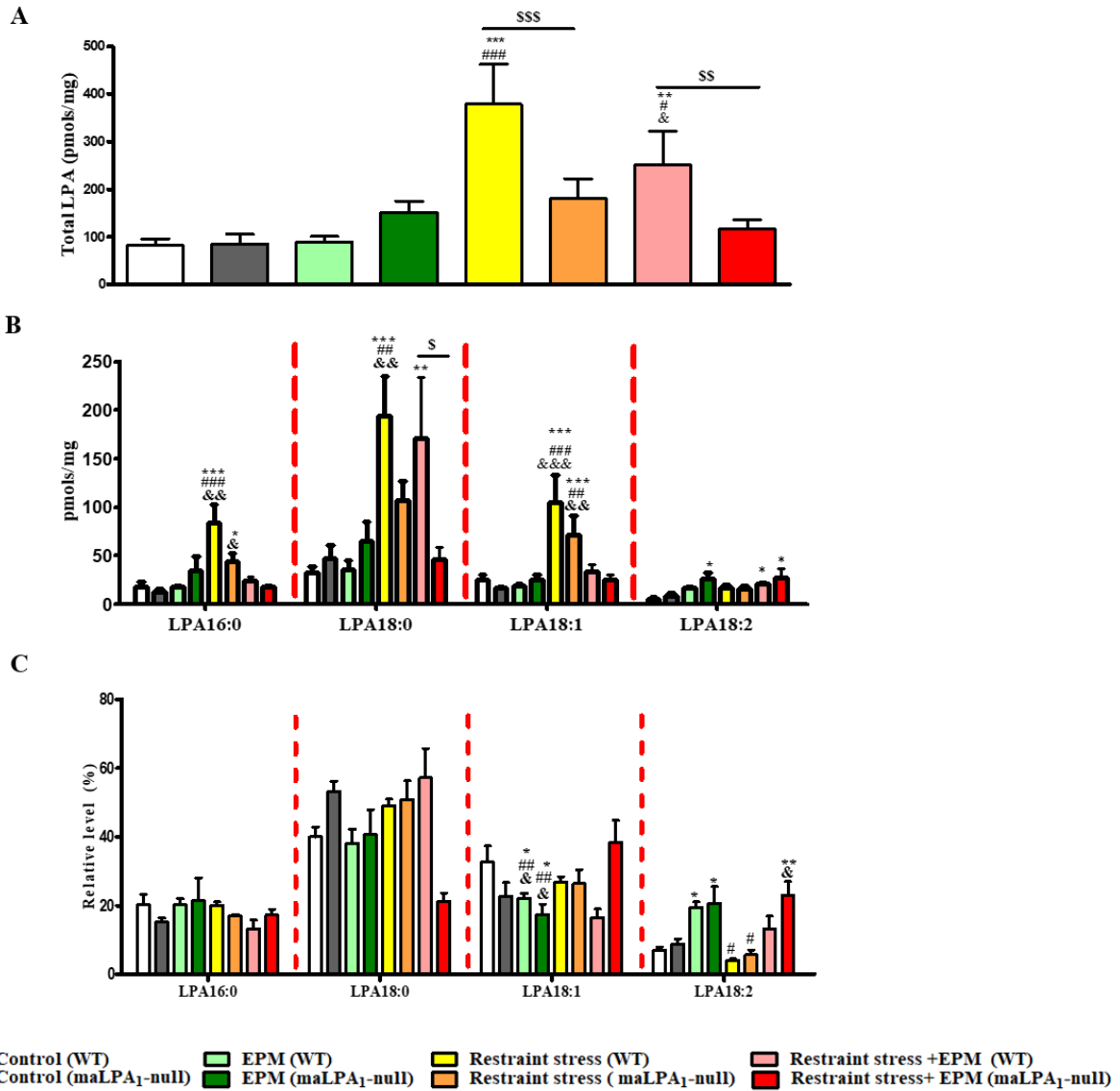
4.2.3 Effects of the absence of the LPA₁ receptor and different acute stressors on the hippocampal LPA profile

Due to the animal maLPA₁-null exhibits increased vulnerability to stress (Castilla-Ortega et al., 2011), the effects of stress and LPA₁ receptor deficiency on the hippocampus LPA profile were examined (Figure 21). A stress x genotype effect was observed on total LPA concentration ($F(3, 39) = 3.98$; $p \leq 0.01$) and on LPA species concentration 18:0 ($F(3, 37) = 3.34$; $p \leq 0.05$). Subsequent analyses revealed a higher concentration of total LPA in the hippocampus in animals of the WT genotype subjected to restraint stress followed or not by EPM compared to animals maLPA₁-null subjected to the same stress protocol (LSD; $p \leq 0.001$ or $p \leq 0.01$, restraint stress or restraint stress+EPM, respectively). EPM stress did not affect total hippocampal LPA concentrations. However, no significant differences in the maLPA₁-null genotype were observed in any of the stress conditions (LSD; $p > 0.05$) (Figure 21A). Regarding the

Summary

concentrations of LPA species (Figure 21B), restraint stress caused an increase in the concentrations of the species 16:0 LPA in both genotypes ((F (3, 39) = 9.16; $p \leq 0.001$); LSD; $p \leq 0.001$). With respect to species 18:0 LPA, the analyses revealed differences between treatments (F (3,37) = 4.82; $p \leq 0.01$) and in the interaction genotype x treatment (F (3,37) = 3.34; $p \leq 0.05$). Post-hoc analysis showed that restraint stress, regardless of whether the animals passed the EPM test or not, increased the concentration of 18:0 LPA, but only in WT animals (LSD; $p \leq 0.01$). The EPM test did not cause any change in the concentrations of this species in any of the genotypes (LSD: $p > 0.05$), although, restraint stress+EPM increased the concentration of this species in WT compared to the maLPA₁-null genotype (LSD; $p \leq 0.05$). Moreover a stress increased the concentration of 18:1 LPA (F (3, 37) = 16.89; $p \leq 0.001$), in both WT and maLPA₁-nulls, (LSD; $p \leq 0.0001$ for WT and $p \leq 0.001$ for maLPA₁-null versus its control). In addition, the data reveal differences between the groups due to stress in the concentrations of the species LPA 18:2 (F (3, 39) = 3,35; $p \leq 0.05$). These differences were observed in the groups that had submitted to EPM (with or without immobilization), although, statistical significance was only reached in the case of maLPA₁-null animals (LSD; $p \leq 0,05$ for maLPA₁-null and WT with LSD; $p = 0,075$). After normalization of lipid concentrations, no interaction effects (genotype x stress) were observed in any of the species examined, although, a stress effect was observed. Thus, stress affected the relative levels of 18:1 LPA (F (3, 37) = 4.75; $p \leq 0.01$) and 18:2 LPA (F (3, 39) = 6.11; $p \leq 0.01$) (Figure 15C and D). LSD analyses revealed these differences between the EPM stress groups and the control group (LSD; $p \leq 0.05$ for both WT and maLPA₁-null). In the case of species 18:2, an increase in the percentage of relative abundance was observed in the maLPA₁-null group with restraint stress +EPM with respect to the control group of the same genotype (LSD; $p \leq 0.01$).

Summary



D

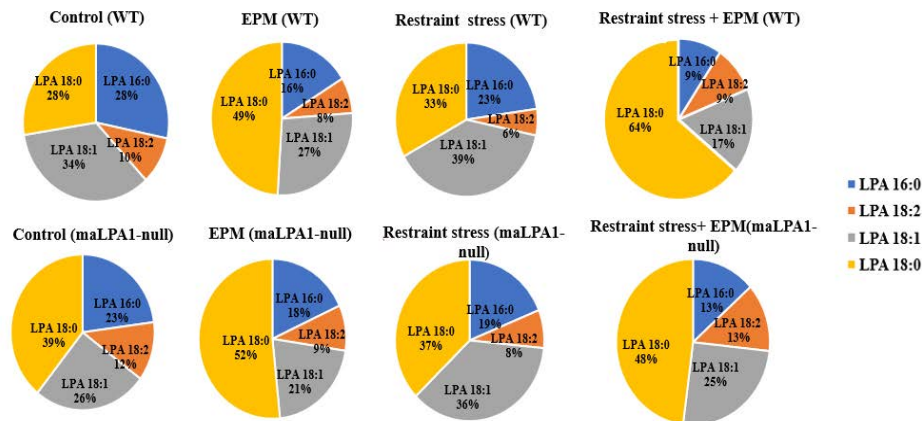


Figure 15: Effects of the absence of the LPA₁ receptor and different acute stressors on the concentrations and profile of LPA in the hippocampus. A) LPA total concentration. B) Concentrations of LPA species. C) Relative levels of LPA species. D) Percentage of LPA species. Post hoc LSD analyses are shown: (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; differences regarding the control of each genotype (WT or maLPA1-null), (# p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001; differences from EPM group), (&p < 0.05; &&p < 0.01; &&p < 0.001; differences from restraint stress) and (\$p < 0.05; \$p < 0.01; \$p < 0.001; differences between genotypes).

4.2.4 CORT Levels

Analysis of blood corticosterone (CORT) levels revealed no significant differences between genotypes at baseline, nor after any of the stress conditions ($F(1,39) = 0.39$; $p > 0.05$). However, in WT and maLPA1-null mice, restraint stress significantly increased CORT levels ($F(1,39) = 12.92$; $p \leq 0.001$) compared to their respective controls and to the levels of animals that had undergone the EPM test (LSD; $p \leq 0.01$). Surprisingly, differences in CORT levels were also observed between restraint stress and the combination of restraint stress+EPM test, which was significantly lower than in the restraint stress situation (LSD; $p \leq 0.01$). Likewise, the EPM and restraint stress+EPM groups presented higher levels of CORT than control, in the case of the maLPA1-nulls genotype ((LSD; $p \leq 0.05$) (Figure 16).

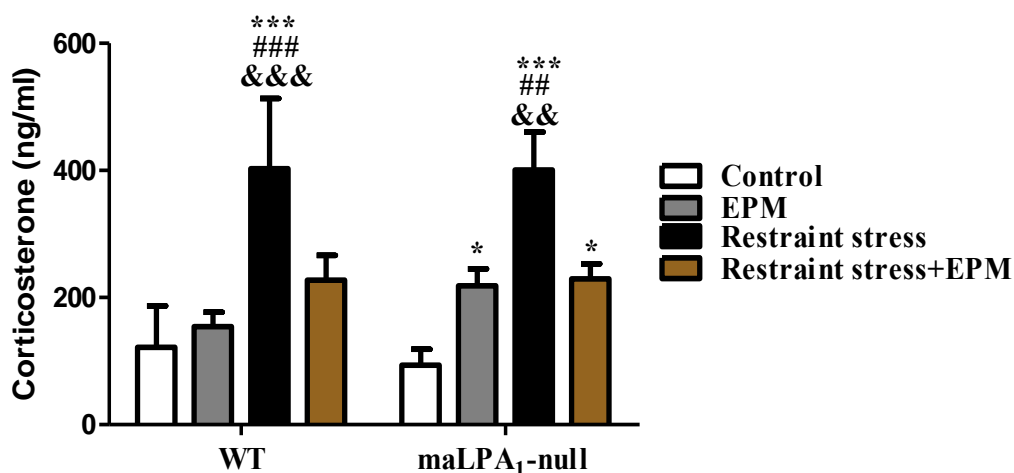


Figure 16: Concentration of corticosterone in serum. Restraint stress produced an increase in blood corticosterone levels in both genotypes compared to the control group and the other experimental groups. Differences with respect to control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$); differences with respect to stress induced by EPM (# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$) and differences with respect to stress induced by restraint stress+EPM (& $p < 0.05$; && $p < 0.01$; &&& $p < 0.001$).

4.3 Results achieved in the third experimental block

4.3.1 LPA species quantification under chronic stress conditions

Chronic stress does not alter the total concentration of LPA ($t(7) = 1.45$; $p > 0.5$) (Figure 17A). similar to the pattern seen with acute stress, chronic stress increased the concentration of 18:0 LPA compared to control ($t(7) = 2.28$; $p \leq 0.01$) but, unlike what happens to acute stress, did not alter the concentrations of LPA the rest of LPA species (16:0 LPA ($t(7) = 0.06$; $p > 0.05$), 18:1 LPA ($t(7) = 0.26$; $p > 0.05$) or 18:2 LPA) ($t(7) = -0.36$; $p > 0.05$) (Figure 17B). Chronic stress only affected the relative abundance of the species LPA 18:0 ($t(7) = 0.056$), not inducing changes in the rest of the species examined ($p > 0.05$) (Figure 17C).

Summary

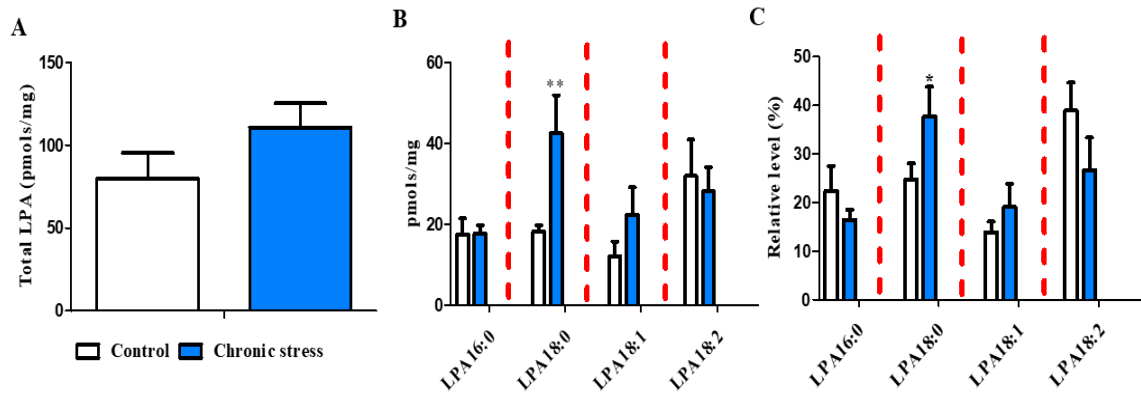


Figure 17: Effects of chronic stress on hippocampal LPA. A) Concentration of total LPA after the application of the chronic stress protocol. B) Concentrations of LPA species under chronic stress. C) Relative levels of LPA species under chronic stress. Chronic stress increased the concentration of the 18:0 LPA, without affecting the other species unchanged. Statistical differences with respect to control are shown (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.3.2 Effects of continued administration of LPA in hippocampal LPA species

The results obtained reveal that there are no statistically significant differences between treatments in the total LPA concentration ($t(8) = 0,75$; $p > 0.05$) (Figure 18A).

Regarding the concentrations of the different species of LPA, the continued administration of this lipid caused an increase in the 18:1 LPA, although without reaching statistical significance ($t(8) = -1.89$; $p = 0.09$), not affecting the rest of the species ($t(8) = 1.67$ for LPA 16:0; $t(8) = 1.49$ for LPA 18:0 and $t(8) = 1.84$ for 18:2, where $p > 0.05$) (Figure 18B).

Summary

In relation to the relative levels of the LPA species studied, continued administration of LPA led to an increase in the relative levels of 18:1 LPA ($t(8) = -5.19$, $p < 0.001$) and 18:2 ($t(8)=2.26$; $p<0.05$), without affecting the rest of the species ($t(8) = 1.22$ for 16: 0 LPA and $t (8) = 0.89$ for 18:0 LPA, $p>0.05$).

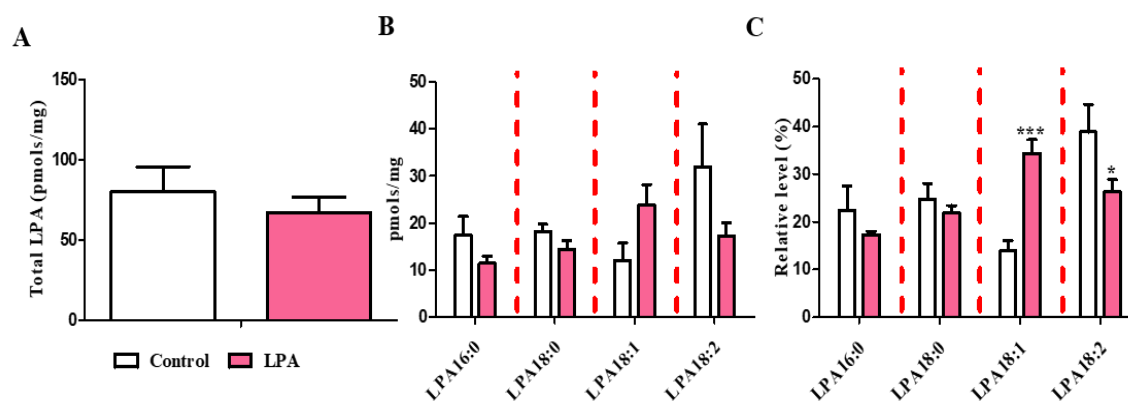


Figure 18: Effects of continued administration of 18:1 LPA in the hippocampal LPA. A) Concentration of total LPA after chronic administration of LPA. B) Concentrations of LPA species. C) Relative levels of LPA species. Differences from control are shown (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

5. DISCUSSION

Here, we have characterized the effects of genetic manipulation and exposure to different acute environmental stresses, such as EPM and restraint stress, on hippocampal levels of LPA species. Moreover, the impact of chronic restraint stress and the effect of repeated LPA administration in the hippocampal profile and levels of the LPA has been studied. In order to achieve these objectives two sets of experiment have been conducted.

For this purpose, previously, it has been essential to fine-tune the procedure for determining the different species of LPA, both in tissue (hippocampus) and in serum. The procedures carried out have allowed to verify, in a systematic way, that the method used is reliable and robust for the determination of LPA species in brain tissue, but not

Summary

for the determination in blood serum of mice with mixed genetic background 129X1/SvJ x C57BL/6J.

Tissue extractions were correctly optimized according to the amount of mass analyzed. This procedure can also be carried out for future studies in other brain regions, which have a greater or lesser extension than this limbic structure.

In our study, the different species of LPA were successfully detected and quantified by MALDI-TOF. However, despite the use of Phos-tag, which significantly lowers the detection limit compared to other methods that do not use it (Morisheige et al., 2010; Tanaka et al., 2004), the 20:4 LPA species was found below the detection limits, so it could not be quantified in hippocampus of mice. Although there are no previous studies that determine and quantify the different species of LPA in the hippocampus, in the spinal cord, a structure that belongs to the nervous system, the species 20:4 LPA is also below the limit of detection using the MALDI-TOF, even after inducing damage to the sciatic nerve, a procedure that causes an increase in the remaining species of LPA in the dorsal horn of the spinal cord (Ma et al., 2013). For this reason, the species 20:4 LPA has been eliminated from the subsequent analyses carried out for the achievement of objectives 2 and 3 of this doctoral thesis.

On the other hand, in mouse serum, the mass spectra resulted with little signal and an excess of noise was perceived; in addition, these signals were not constant and the obtained values were not reproducible. A different fact was observed in the tests of fetal bovine and rabbit serum, in which the detection of the different species of LPA was feasible. Therefore, in the case of mouse serum samples, the concentration of each species of LPA was lower than detectable levels by MALDI-TOF, while in the samples of bovine fetal and rabbit serum the concentrations were at detectable levels.

Summary

Ultimately, considering the optimisation of the method, the procedure used is useful for the objectives pursued, in our case, for the determination of the concentrations of the different species of LPA in hippocampus. Thus, after obtaining the calibration curves, the linearity of the method could be observed. Also, after the replication of the procedure and taking into account the little available bibliography on the matter (Yang & Han, 2016), we can inform that the method is precise. Finally, the detection limits of the species 20:4 was below these limits, as previously described (Ma et al., 2013). However, at least in mouse serum samples of the strain used in our studies (the mixed genetic background 129X1/SvJ x C57BL/6J), it was not possible to quantify the LPA and its species. Although more studies are necessary to determine the cause of the low signal-to-noise ratio obtained, possibly the availability of LPA species in samples is below the detection limits (Armbruster & Pry, 2008).

Once the quantification method of the LPA species in tissue was optimized, we proceeded to achieve the objectives that define the second experimental block. Where, the effects of genetic manipulation and exposure to different acute stressors had been characterized, on the levels of LPA species in the hippocampus.

LPA is an important signalling molecule in the brain that participates in multiple physiological actions and pathophysiological conditions (Aoki, 2004; Fukushima et al., 2001; Ishii et al., 2004; Tigyi & Parrill, 2003). The biological functions of LPA species are associated with specific receptors coupled to G proteins called LPA₁₋₆ (Choi & Chun, 2013). These receptors are expressed in the brain and may be involved in the regulation of emotional behaviour, especially LPA₁ receptors (Castilla-Ortega et al., 2011; Moreno-Fernández et al., 2017, 2018; Pedraza, et al., 2014; Santin et al., 2009); LPA₂ (Schneider et al., 2018), LPA₃ (Uchida et al., 2014; Ueda et al., 2018) and LPA₅ (Callaerts-Vegh et al., 2012; Tsukahara et al., 2018). LPA species containing both saturated and unsaturated

Summary

long-chain fatty acids (e.g., C16 and C18) and may activate LPA₁ receptors (Bandoh et al., 2000). However, contrary to what was observed with the deletion of the LPA₃ receptor (Ma et al., 2009), the absence of LPA₁ receptor did not induce serious alterations in the total concentrations of LPA or its different species in the hippocampus. It can therefore be concluded that the absence of the LPA₁ receptor did not affect the production of this lipid. In fact, the levels of LPA in the hippocampus in mice lacking LPA₁ were similar to those observed in WT animals. Together with the evidence accumulated with animals that lack receptors for LPA, it could be stated that the LPA₃ receptor is an important determinant of LPA synthesis (Ma et al., 2009). The LPA₂ receptor, although to a lesser extent, may also contribute to the production of LPA (Zhao et al., 2009). However, at least in the hippocampus, the LPA₁ receptor does not appear to play a crucial role in the synthesis of LPA. Nevertheless, since the LPA pattern of the hippocampus is slightly modified in maLPA₁-null mice, with a significant increase in the relative levels of the saturated 18:0 LPA, a reasonable hypothesis would be that LPA₁ receptor deficiency can modify the catalytic activity of phospholipase A1 (PLA1) and phospholipase A2 (PLA2), enzymes responsible for producing LPA species (Aoki et al., 2008). However, other routes cannot be excluded. Among these other pathways, ATX-mediated pathways may play a role. In this sense, although with exceptions, recent studies suggest that ATX may produce different groups of LPA species (Nikitopoulou et al., 2013). In addition, different species of LPA may activate ATX/lisoPLD to give rise to different species of lysophosphatidylcholine (LPC) that would give rise to different chains that would be precursors of LPA (Salgado-Polo et al., 2018). However, these hypotheses should be interpreted with caution and more studies are needed to determine what is causing these differences in the profile of different LPA species in the hippocampus in the absence of the LPA₁ receptor (Aoki et al., 2008).



Summary

Stress, particularly restraint stress protocol, alone or combined with EPM, led to an increase in the total concentration of LPA in the hippocampus and produced changes in concentrations of different species of LPA. Surprisingly, the changes were minor in animals subjected to restraint stress +EPM. Different hypotheses can be proposed to explain these effects, but perhaps the most reasonable is that in both groups, an effect of restraint was observed, whereas the procedure of exposure to EPM hardly produces changes in the concentrations of LPA. In animals subjected to restraint stress +EPM, there were more time between the end of the stressor and the extraction of the brains, so a minor change in LPA concentrations could be due to the effect of the passage of time. However, this hypothesis needs to be taken with caution and more studies are needed to verify these differences between the two groups in LPA concentrations. Nevertheless, these data reveal that the LPA system of the hippocampus is affected by stress particularly by restraint stress. Although, EPM increased the concentration of the 18:2 LPA, restraint stress substantially affected all the LPA species examined. Changes in the concentration of 18:2 LPA, in the EPM group and restraint stress+EPM could explain the increase in the relative abundance of the 18:2 LPA, which in turn leads to a change in the LPA profile. In sum, restraint stress led to a significant increase in the concentrations of LPA and all species examined in the hippocampus. In contrast, EPM modified the profile of LPA species in the hippocampus by inducing an increase in 18:2 LPA and reducing concentrations of 18:1 LPA. Restraint stress + EPM also affected the hippocampal LPA profile by increasing the relative levels of the species 18:2. Although, these effects were observed in both WT and maLPA1 animals, they were less dramatic in the absence of the LPA₁ receptor.

Exposure to stress increases the release of GC, which induces a large amount of pathological effects, especially when prolonged over time (Joëls, 2018). GCs can modify

Summary

the composition of lipids in the hippocampus. In this sense, a recent study showed an increase in glycerophospholipids such as PC, PCe, PE and PC in the ventral hippocampus, while PA levels were reduced (Miranda et al., 2019). Interestingly, our data reveal that restraint stress increases concentrations of LPA species from several synthetic pathways in which the main precursors are LPC and PA among others. ATX specifically acts on LPC species. The increase in LPA concentrations observed in our study could be due, at least in part, to an increase in the expression and/or activity of autotaxin (ATX). In this sense, a strong correlation has been observed between LPA concentrations and levels of this enzyme (Nakamura et al., 2008, Watanabe et al., 2007). In our study, since stress alters the activity of the hypothalamus-hypophysis-suprarenal (HHA) axis and increases CORT levels (Boettcher et al., 2017; Kofman, 2002; McEwen et al., 1999; Sapolsky, Meaney, & McEwen, 1985), concentrations of this hormone were determined. In both genotypes, after restraint stress, a significant increase in CORT levels was observed. In *maLPA1*-null animals, both EPM stress and restraint stress+EPM produced an increase in CORT levels with respect to control, but surprisingly, no differences between genotypes were observed after exposure to acute stress, as previously described (Pedraza et al., 2014). The differences in the experimental procedure probably explain the differences between the studies (i.e., in the initial study a restraint period of 30 min was used, whereas in our study the period was 60 min). In addition, the time from stressor application to blood extraction was different (0 min versus 10 min used in the present study). Since plasma CORT levels decrease progressively with time after restraint stress (Shafiei et al., 2012; Uchida et al., 2010), the time elapsed between stressor application and blood withdrawal may explain the apparent inconsistencies between studies. However, this increase in CORT levels may reveal the cause of the increase in hippocampal LPA concentrations. Thus, it has been observed that the administration of dexamethasone, a synthetic analogue of CORT, to cell

Summary

in cultures, increases the levels of mRNA and ATX protein (Honjo et al., 2018). Thus, an increase in the levels of CORT may increase the levels of ATX and its enzymatic activity. In addition, after mild stress (EPM), the LPA profile of the hippocampus was modified, but not the LPA levels. Although ATX may be involved in the mechanism underlying the observed differences, no changes in CORT levels were observed in animals under EPM stress. Therefore additional pathways may also be involved (Tanaka et al., 2006; Meeteren et al., 2006), which may explain the limited increase in LPA levels in WT mice coupled with changes induced by restraint stress. Further studies are needed to clarify the underlying mechanisms responsible for the increase in LPA concentrations after restraint stress, changes in LPA profile caused by EPM, and the effects of the combination of stressors. However, metabolic disturbances that occur in LPA species in the hippocampus after acute stress undoubtedly lead to a cascade of molecular events within this region of the brain, which would be responsible, at least in part, for the negative effects of stress in the hippocampus (Sood, Chaudhari & Vaidya, 2018).

On the other hand, as expected, LPA₁ receptor deficiency caused an anxious phenotype in the EPM (Castilla-Ortega et al., 2010; Moreno-Fernández et al., 2017, 2018; Santin et al., 2009). As observed in previous studies, maLPA₁-null animals showed a high anxiety index and low exploratory activity (Castilla-Ortega et al., 2010; Santín et al., 2009), together with a lower percentage of entries at the distal ends of the open arms (62% vs. 100% WT) and a shorter time spent in them, which would indicate that these animals exhibit an anxious profile in the test. In the same line, maLPA₁-null mice exhibited greater freezing behaviour, risk assessment, less vertical exploration time and fewer head dipping, which support the anxious profile of these animals and may be indicative of an emotional hyperreactivity in the absence of the LPA₁ receptor (Moreno-Fernández et al., 2017, 2018; Pedraza et al., 2014). Although the participation of the

Summary

LPA₁ receptor in the regulation of emotion and in the appearance of anxiety is an established fact, the participation of the endogenous LPA system in emotion has not yet been determined. In addition, it is not known whether there is a relationship between the levels of LPA species in the hippocampus with the different emotional parameters recorded in behavioural tests, such as EPM. The only available data have been obtained by administering LPA and observing its effects in tests measuring different emotional parameters (Castilla-Ortega et al., 2014; Kim et al., 2017). Although the evidence is inconclusive, the administration of LPA caused changes in emotional behaviour. In addition, a recent study by our research group examines depression-related behaviours in stressed animals that have received continued administration of LPA (Moreno-Fernandez et al., 2019 (under review)). The data revealed that the stress and continued infusion of LPA produced a depressive effect. Our study uses a different approach, after summiting the animals to stress or a behavioural test, it is determined the total LPA and LPA species concentrations and analysed the hippocampal LPA profile. It would be interesting to be able to relate the behavioural changes with the modification of the lipidic profile in order to know in detail what role plays this neuromodulatory system in the regulation of emotions.

To the best of our knowledge, this second experimental block of this doctoral thesis constitutes the first approximation to identify and determine the profile of LPA species in the hippocampus, both in WT mice and in *maLPA₁-null*. In addition, the effect of acute stress on hippocampal concentrations of LPA species has been explored for the first time. The results show that the absence of the LPA₁ receptor did not alter the levels of the LPA species, but slightly modified the profile. In contrast, stress, particularly the restraint stress procedure, significantly altered LPA levels in the hippocampus. These

Summary

data reveal that the hippocampal LPA may be one of the systems affected by acute stress and could be a therapeutic target to palliate the negative effects induced by stress.

In the third experimental block of this doctoral thesis, the effect of a chronic and unpredictable stressor on the hippocampal LPA system has been characterized. It has also been studied the effects of a continued administration of the 18:1 species on this LPA system.

It is known that chronic stress causes an increase in the response of the HHA axis (Oliveira et al., 2015), which leads to numerous neurobiological alterations (Conrad, 2010; Lin et al., 2018). The hippocampus, which contains a high density of glucocorticoid receptors, is a target structure for the negative effects of stress (Orlovsky et al., 2014). Among these neurobiological alterations caused by stress in the hippocampus, an increase in oxidative stress has been observed (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012; Sato et al., 2010), a reduction in neurogenesis (Castilla-Ortega et al., 2011) and an increase in neuroinflammation (Grosse et al., 2015; Sorrells et al., 2009). These alterations at the hippocampal level could explain, at least in part, the appearance of behavioural alterations due to stress (Pizzagalli, 2014).

Numerous mechanisms have been proposed for mediating the negative effects of chronic stress (Herbet et al., 2017), but until relatively recently, no attention has been paid to the role that lipids can play in this process (Miranda & Oliveira, 2015; Oliveira et al., 2016). One of these lipids may be the LPA. Our group has shown that the LPA-LPA1 signalling pathway may be mediating the negative effects of chronic stress in the hippocampus. Thus, as previously commented, the absence of the LPA₁ receptor-mediated signalling pathway increases vulnerability to the negative effects of stress (Castilla-Ortega et al., 2011). Furthermore, it increases the impact of stress on the

Summary

alteration of the HHA axis, on the reduction of hippocampal neurogenesis (Castilla-Ortega et al., 2011) and on the increase of oxidative stress (García-Fernández et al., 2012). However, it was not known what occurs with the hippocampal LPA system when exposed to chronic stress. The results obtained in this doctoral thesis reveal that chronic stress increases total concentrations of LPA, although without reaching statistical significance, and causes a significant increase in concentrations of the 18:0 LPA.

Deregulation in lipid concentrations has been consistently observed after exposure to stress, particularly chronic stress (Kargan et al., 1999; Chaung et al., 2010; Faria et al., 2015; Miranda et al., 2019). On the one hand, at the plasma level, an increase in lipid levels has been observed in Vietnam War veterans with post-traumatic stress disorder, particularly in cholesterol, triglycerides and low-density lipoproteins (Kargan et al., 1999). In animals, using the model of social stress by defeat, which is a model of chronic stress, lipid deregulation has been registered, by alteration in the metabolism of lipids that entails an increase in their levels, mainly due to an increase in the transcriptional activity of genes involved in the synthesis of lipids (Chaung et al., 2010). More recently, improvements in analytical techniques have made it possible to study the effect of stress on the composition of brain lipids. Thanks to this, it has been observed that exposure to chronic and unpredictable stress induces changes in the relative cellular levels of the signalling lipids in the brain, specifically, an increase in phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) and a decrease in phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA) and cardiolipine (CL) (Faria et al., 2015), possible precursors of LPA synthesis, have been observed. Distinguishing between dorsal and ventral hippocampus, it was detected that in the dorsal hippocampus the levels of LPC were reduced and in contrast in the ventral hippocampus the concentrations of LPC and glycerophospholipids, such as PC, PCE, PE and PI, were increased (Miranda et al., 2019). We do not know what it



Summary

may be causing this specificity between hippocampal regions, but it may be due to functional differences between the two regions. Thus, the dorsal hippocampus is involved in the control of cognitive functions, whereas the ventral hippocampus is related to stress, emotion and affection (Fanselow & Dong, 2010). An increase in lipid levels in this region, key to emotional regulation, may induce numerous problems. In this sense, an increase in lipid concentrations at the brain level has been associated with animal models of psychopathologies, mainly depression. Elevated ceramide levels lead to a reduction in neurogenesis (Gulbins et al., 2015; 2016), autophagy (Gulbins et al., 2018) and deregulation of the HPA axis (Grassmé et al., 2015), all of which may induce, at least in part, the develop of depression-related behaviours (Brunkhorts-Kanaan, 2019). This increase in ceramide levels, which would be key to the appearance of neurobiological alterations that lead to the appearance of depressive symptoms, is reversed with treatment with antidepressants (Grassmé et al., 2015). Likewise, an accumulation of phospholipids (specifically arachidonic acid) (Riederer et al., 2010), mainly in the hippocampus (Oliveira et al., 2016) has been found in an animal model of depression (Green et al., 2005; 2009). Given the functional implications of LPA (Anliker & Chun, 2004; Birgbauer & Chun, 2006; Choi et al., 2010; Chun et al., 2010; Ishii et al., 2004; Noguchi et al., 2009; Rivera & Chun, 2006), and its role in emotional regulation and coping with stress (Castilla-Ortega et al, 2011; Pedraza et al., 2014), a change in the hippocampal pattern of the LPA system may be implicated in the effects and appearance of mood alterations due to stress. More studies are needed to determine the impact of the changes of the LPA system on behaviour and mood.

Different from what happens with acute stress, chronic stress only increase the levels of the 18:0 LPA. Several hypotheses can be proposed to explain these the apparently contradictory effects. Thus, continued stress may specifically affect one

Summary

of the synthetic routes of LPA. LPA species with unsaturated chains (16:1, 18:1, 18:2, 20:4) are mostly produced by PLA1 isoenzymes, while saturated species (16:0, 18:0) are produced by PLA2 isoenzymes (Aoki, 2004a). An increase in the activity of PLA2, which may be produced by an increase in GC (Oliveira et al., 2016), has already been proposed following exposure to a chronic and unpredictable stress model (Dennis et al., 2011; Oliveira et al., 2016). Another possibility may be due to changes in the expression of LPA receptors caused by chronic and unpredictable stress. Thus, LPA species with saturated and unsaturated chains present differences in biological activities, implying that they are recognized by different LPA receptors (reviewed in Aikawa et al., 2015). Preliminary data from our group reveal that, although chronic stress does not affect the mRNA levels of LPA receptors in the hippocampus, the expression of the protein for the LPA₁ receptor is reduced respect to the control situation (unpublished data). Changes in the expression of receptors could explain the specificity in the increase of the concentrations of the species LPA 18:0.

On the other hand, it is a widely confirmed fact that stress, particularly chronic stress, causes an increase in oxidative stress (Castilla-Ortega et al., 2011; García-Fernández et al., 2012; Sato et al., 2010). High levels of free radicals or reactive oxygen species (ROS) may directly damage lipids (Moldovan & Moldovan, 2004); mainly lipids that contain double carbon-carbon bonds. This phenomenon, called lipid peroxidation, primarily affects unsaturated fatty acids (Pradenas et al., 2012; Ayala et al., 2014). An increase in lipid peroxidation may explain, at least partially the differences found in the levels of unsaturated species between acute and chronic stress. Thus, as indicated in the second experimental block, an increase in GC increases the expression and catalytic activity of ATX (Honjo et al., 2018). Although this would occur after chronic stress, an increase in lipid peroxidation could lead to a reduction in the concentrations of unsaturated species,

Summary

even if their synthesis is increased, and may explain the specific increase of the 18:0 species, which would not suffer a reduction in its levels due to the increase in oxidative stress, however other species of LPA would be affected. Not all these hypotheses to explain these results are mutually exclusive. However, they are speculative, based on our data and available literature, and should be formulated with caution. Future studies are necessary to find what is causing the selective increase of the 18:0 species, without affecting the other LPA species.

On the other hand, given the contradictory effects observed after the continued administration of the specie LPA 18:1 (Moreno-Fernández et al., 2019, under review), we studied what happens with the LPA profile after 18:1 LPA administration. In this sense, it has been observed that, after the administration of this species, via i.c.v., there is an increase in hippocampal neurogenesis (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2018; Walker et al., 2016; Rosell del Valle, doctoral thesis 2014). In addition, its administration reduces depression-like behaviours in research animals (Rosell del Valle, doctoral thesis 2014). At the cognitive level, the administration of LPA in Long-Evans rats improves spatial memory measured in the Morris Water Maze (Dash et al., 2004). On the other hand, its administration in Wistar rats causes an increase in anxiety and a greater activation of the periaqueductal grey substance (Castilla-Ortega et al., 2014), a key region in the integration of the emotional processing of aversive stimuli, such as fear, panic responses and nociception (Brandão et al., 2003; Graeff, 2003). On the other hand, a recent study carried out by our group reveals that the administration of the species LPA 18:1 has contradictory effects depending on whether it is administered in control animals or in animals subjected to a chronic stress protocol. Thus, in control animals it produces an increase in hedonic behaviour and mitigates the negative effects of acute stress on the HPA axis response. On the other hand, in animals submitted to a stress protocol, contrary

Summary

to our expectations, the continuous delivery of LPA potentiated rather than inhibited some (e.g., anhedonia, reduced latency to the first immobility period), though not all, behavioural effects of stress and lead led to an alteration in the genes coding for proteins involved in the excitatory/inhibitory balance in the ventral hippocampus and to changes in corticosterone levels (Moreno-Fernandez et al., 2019, in review). Taken together, these data indicate that under basal conditions, with the exception of the study by Castilla-Ortega et al., 2014, the administration of LPA 18:1 induces a resilient behavioural and neurobiological profile, whereas in chronically stressed animals induced negative effects potentiating some, though not all, of the negative effects of stress and induced additional adverse consequences

In our study, the administration of this lipid did not cause any change in the concentrations of the different species of LPA, although modified the LPA profile by increasing the relative values of the specie LPA 18:1. In a pilot study carried out (see annex IX) the administration of this lipid reversed the increase in 18:0 species caused by stress. Considering these data, the neurobiological effects due to the administration of LPA could not be explained by significant changes in the concentrations of the different LPA species. However, this treatment does cause subtle changes in their concentration, which is reflected in the relative values. A small change in the composition of lipids can have a great impact on the levels of other homologous lipids (Hannun & Obeid, 2008) that can have repercussions at a behavioural level (Miranda & Oliveira, 2015; Oliveira et al., 2016). This increase in the relative levels of the 18:1 species could be one of the mechanisms involved in the neurobiological effects of LPA.

On the other hand, the negative effects observed after the administration of LPA in chronic stress situations can not be explained by changes in the concentrations of the different LPA species or in their profile at the hippocampal level, since no differences

Summary

were observed with respect to the group with the environmental control treatment. Other mechanisms may explain the contradictory effects induced by LPA at baseline or after exposing to a stressor.

In summary, the LPA₁ receptor deficiency did not disturb the levels of LPA species, but slightly modified the hippocampal LPA profile. On the other hand, stress, particularly stress by restraint, significantly altered the hippocampal LPA levels. In contrast, chronic stress affected the profile of LPA in the hippocampus, increasing the concentrations and relative values of the species 18:0 LPA. Changes in the hippocampal LPA system may be one of the neurobiological mechanisms involved in the negative effects of stress, and consequently in the appearance of psychopathological disorders, and may constitute one of the therapeutic targets for their treatment. However, more studies are needed to determine what effects the specific modification of the hippocampal LPA system and LPA profile have on behaviour and other neurobiological systems. As well as to know why chronic stress, unlike acute stress, produces an increase in the concentrations and relative levels of the 18:0 species in the hippocampus, without affecting the rest of the species. In addition, it would be necessary to expand the pilot study initiated to consistently check whether continued administration of LPA is capable of reversing the negative effects of stress on the hippocampal LPA system and to determine whether there is a relationship between these changes and behavioural performance.

6. CONCLUSIONS

1. The protocol of the extraction and quantification of LPA species is optimal for study the LPA species in the hippocampus of mouse
2. The concentrations of each LPA species in serum from mice with the mixed genetic 129X1/SvJ x C57BL/6J are at values lower than those detectable by the MALDI-TOF.
3. Under physiological conditions, the most abundant LPA species in the mouse hippocampus is 18:0, followed by 18:1 in both WT and maLPA1-null.
4. The absence of the LPA₁ receptor did not cause change in LPA species concentrations, although it slightly modified the hippocampal LPA profile.
5. Restraint stress, fundamentally if not applied together with EPM, produced significant changes in the concentrations of LPA in the hippocampus, whereas the stress induced by EPM affected the relative proportions of this lipidic system.
6. The effect of acute stress was greater in WT animals than in the absence of the LPA₁ receptor.
7. Chronic stress increased the concentration of the 18:0 LPA species without altering the other LPA species in the hippocampus.
8. The continued administration of 18:1 LPA caused an increased in the relative levels of the species 18:1 LPA in the hippocampus.

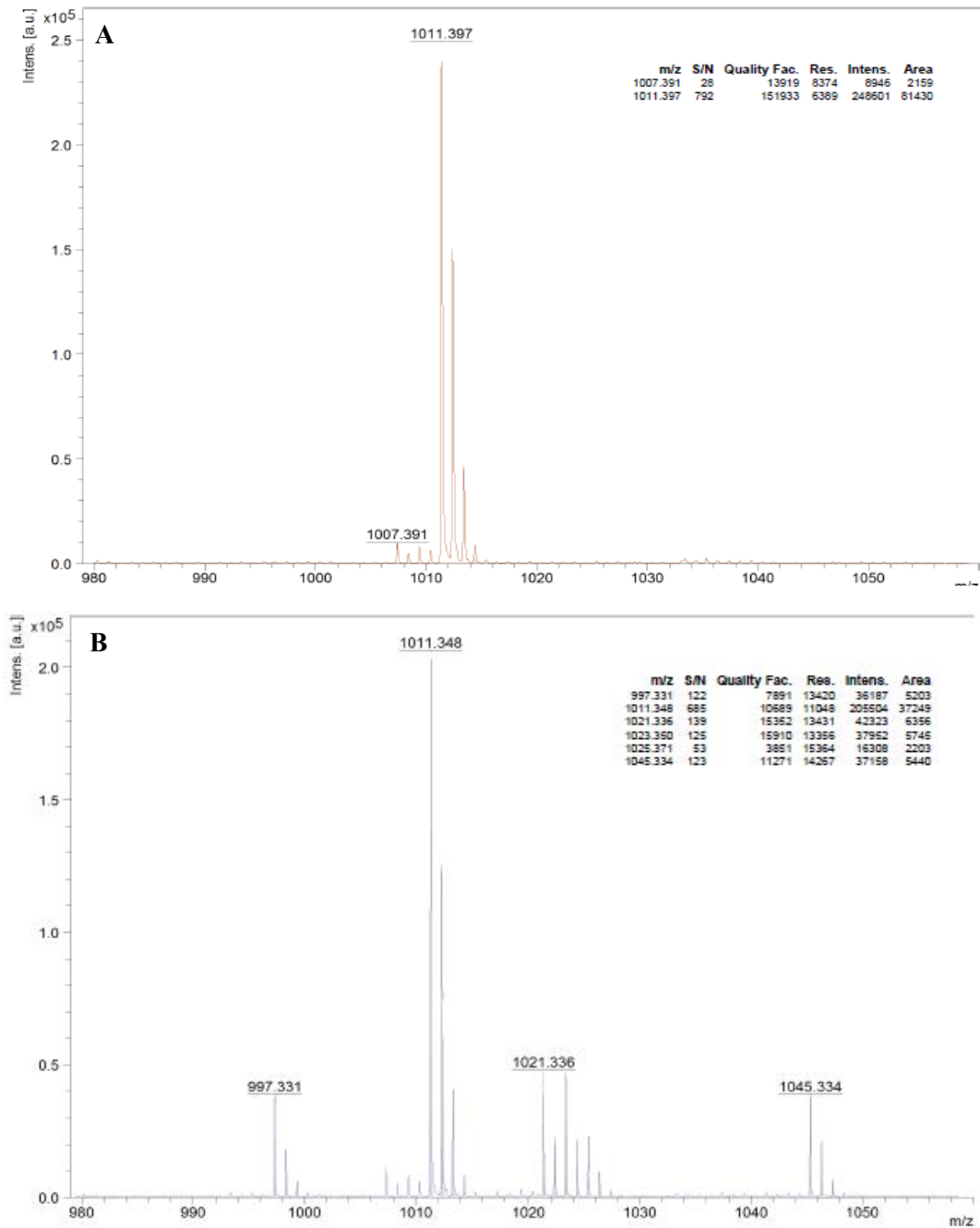
Summary

ANEXOS

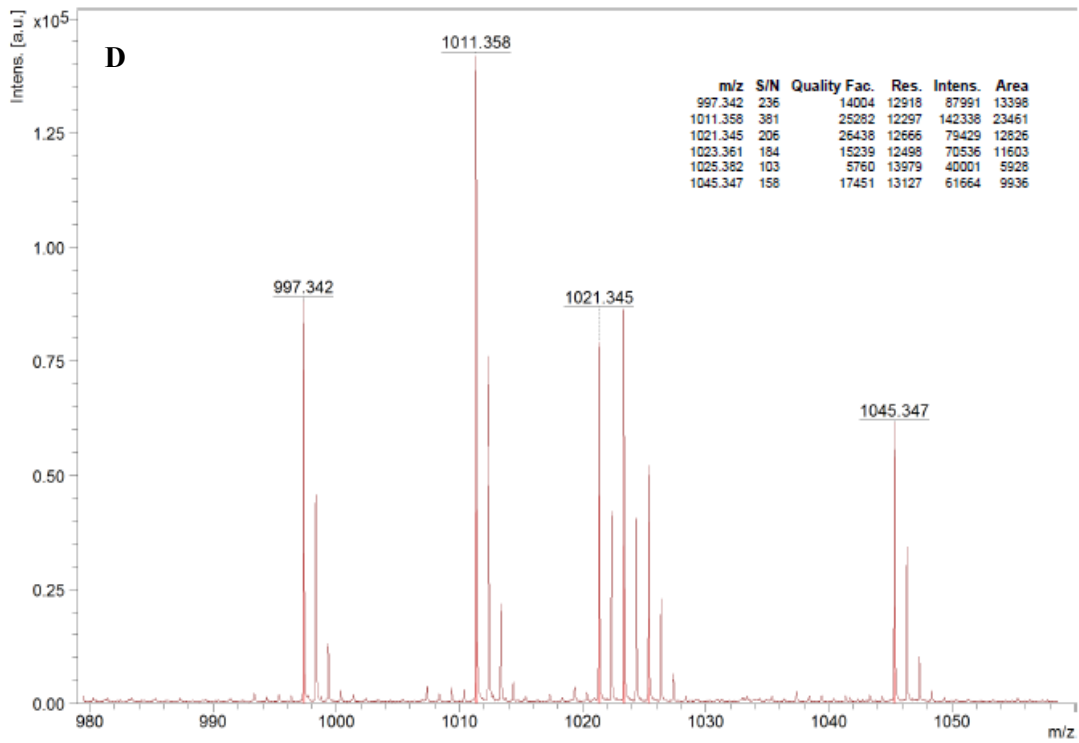
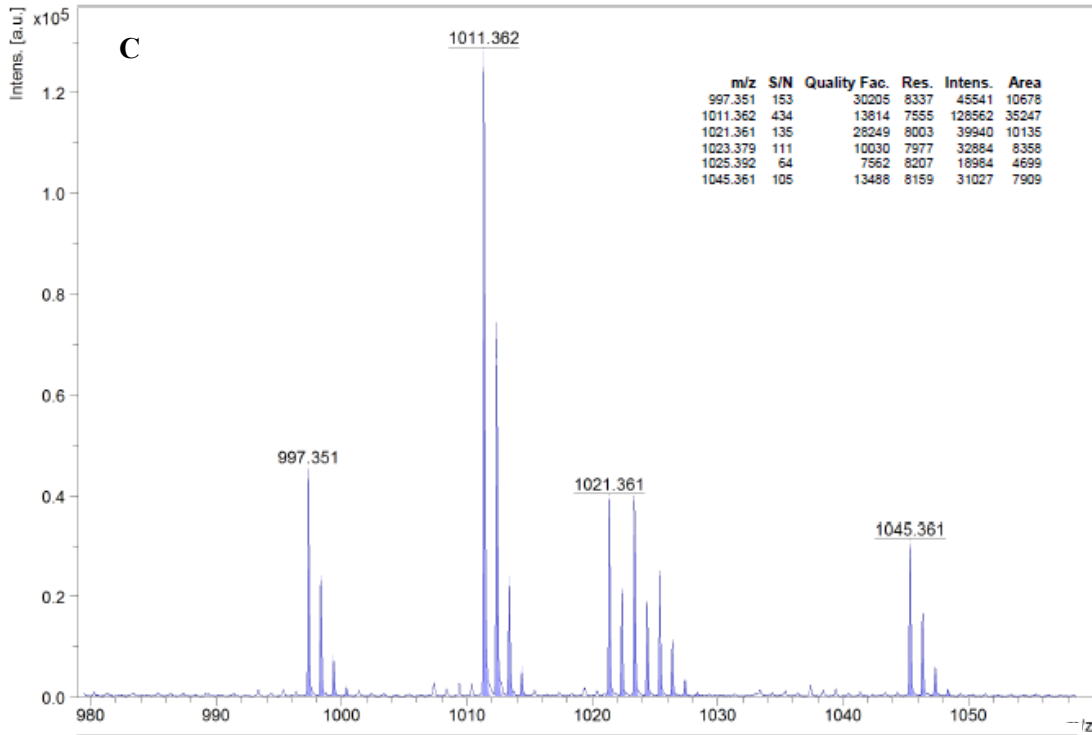


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

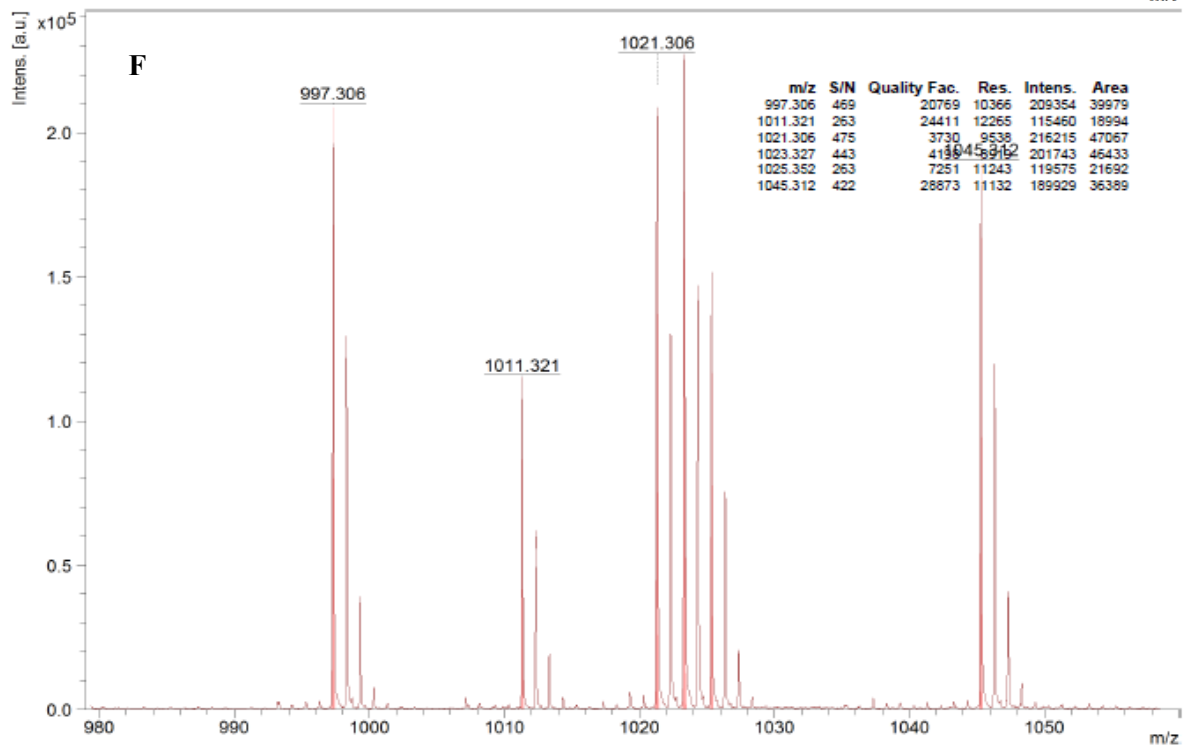
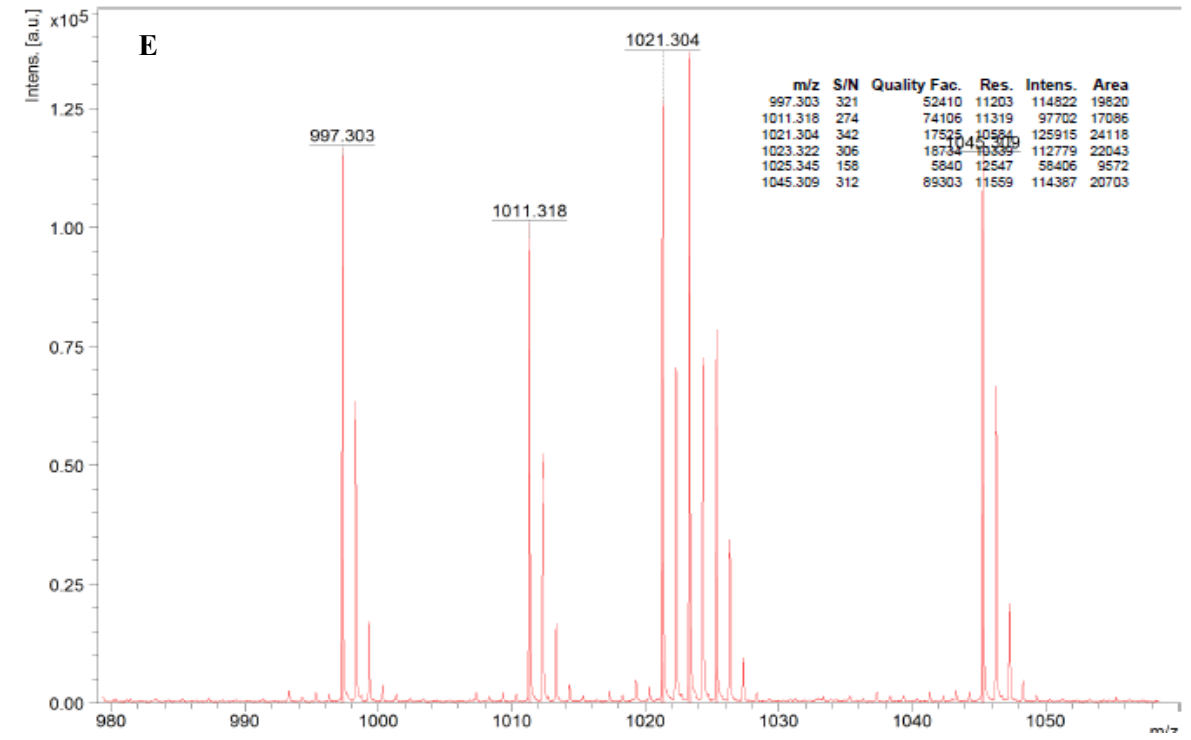
Anexo I: Espectros de los estándares de las especies de LPA



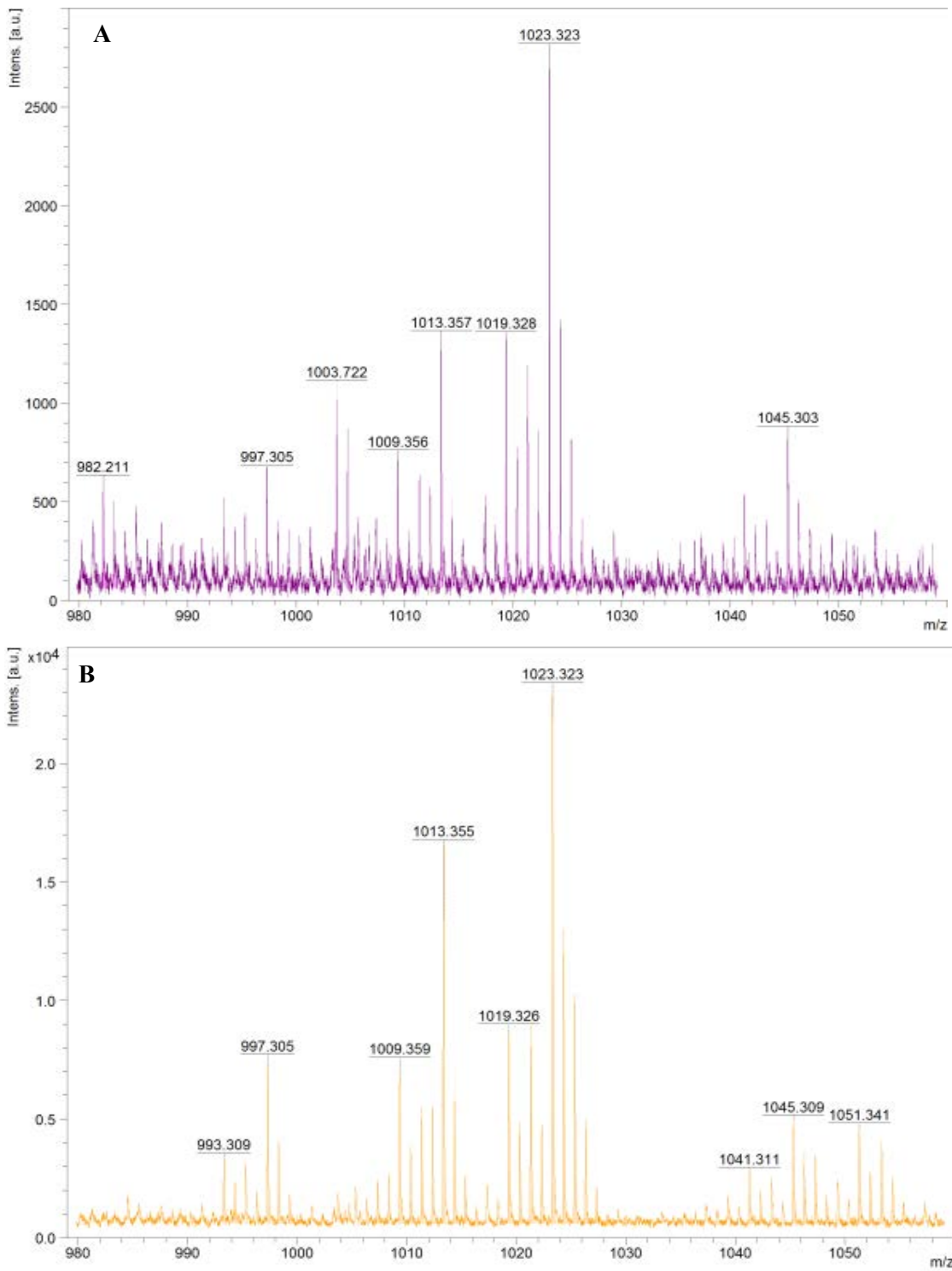
Anexos

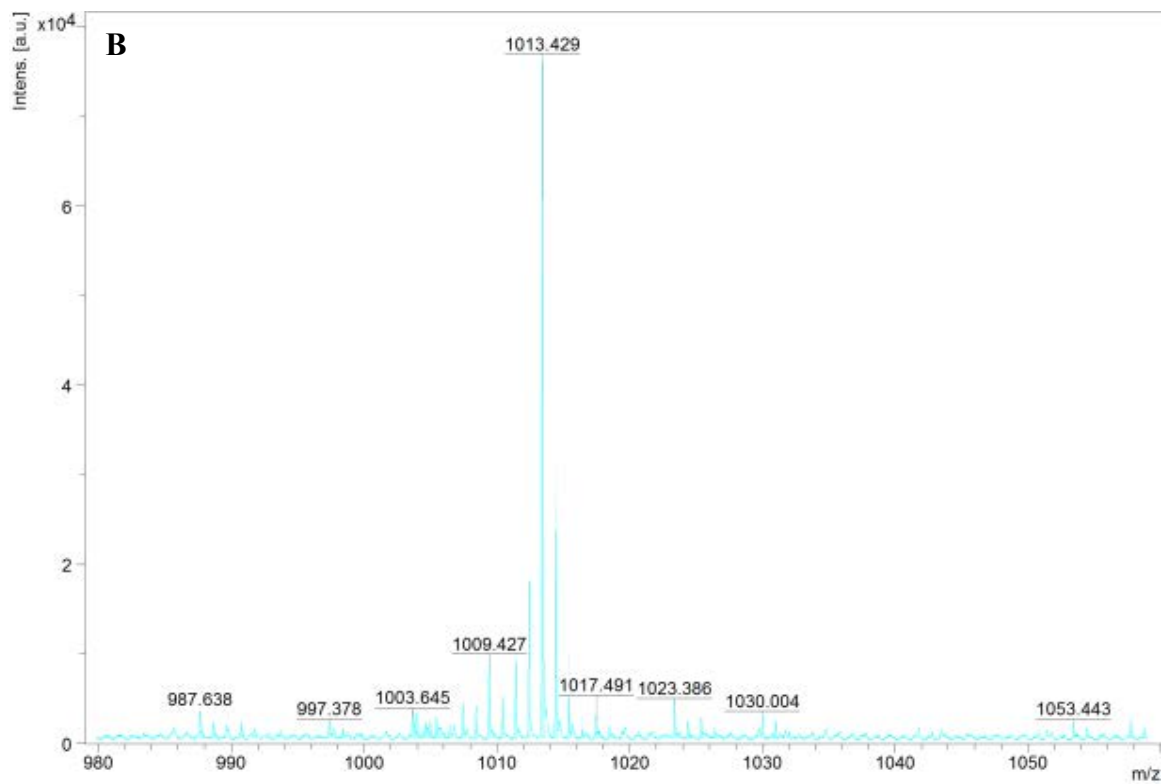
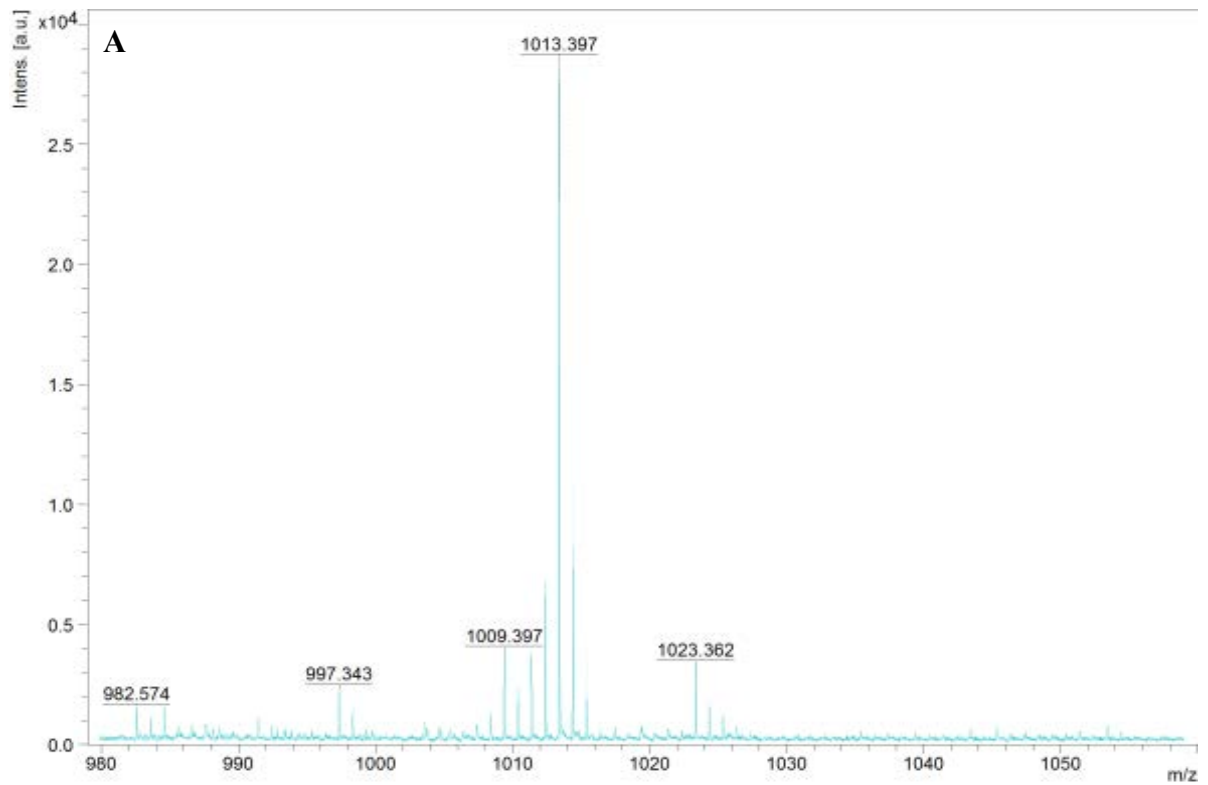


Anexos

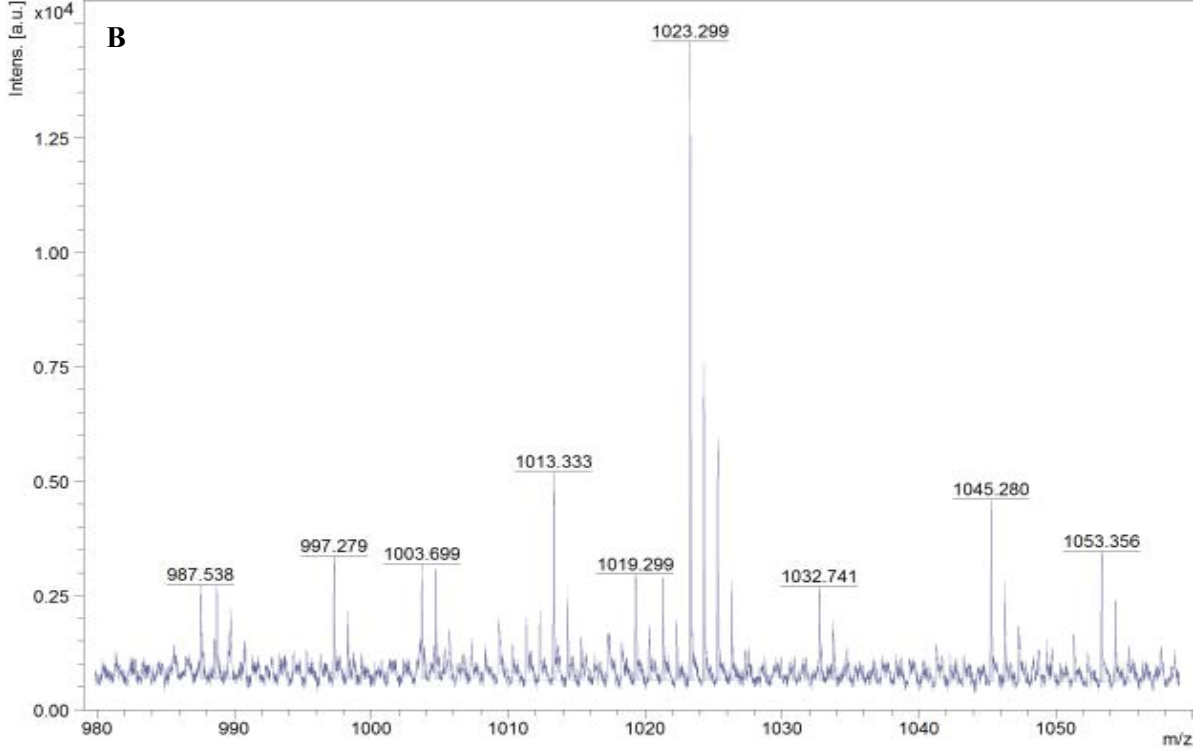
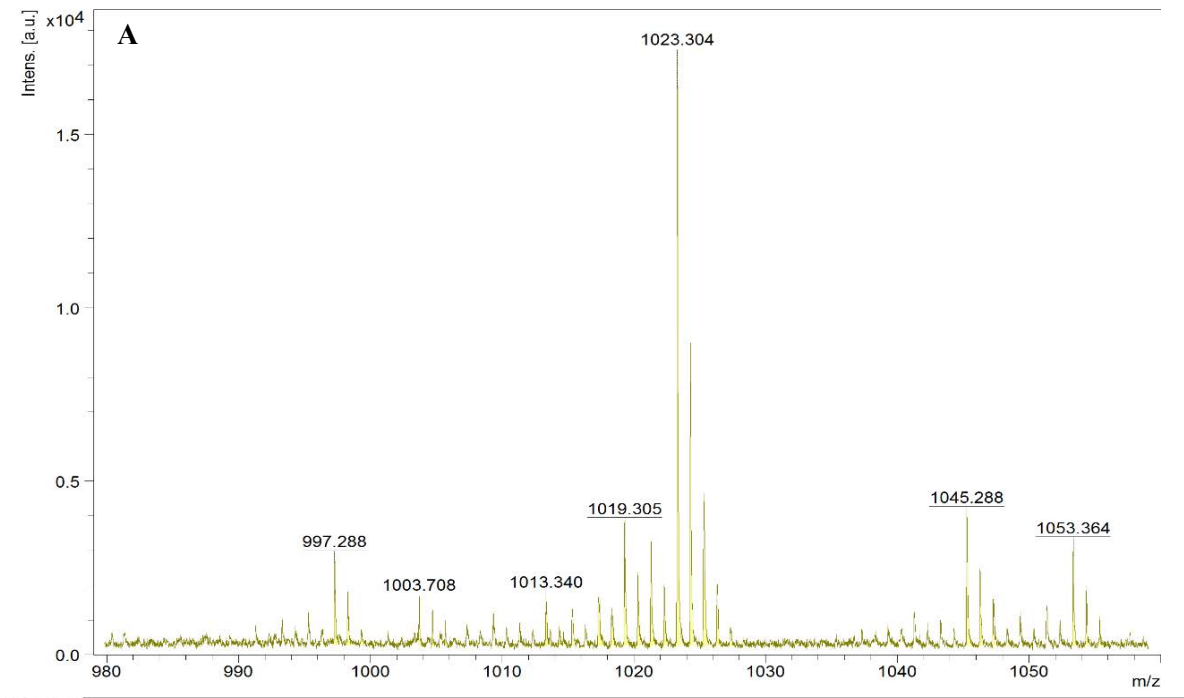


Anexo II: Espectros de tejido de hipocampo de ratón

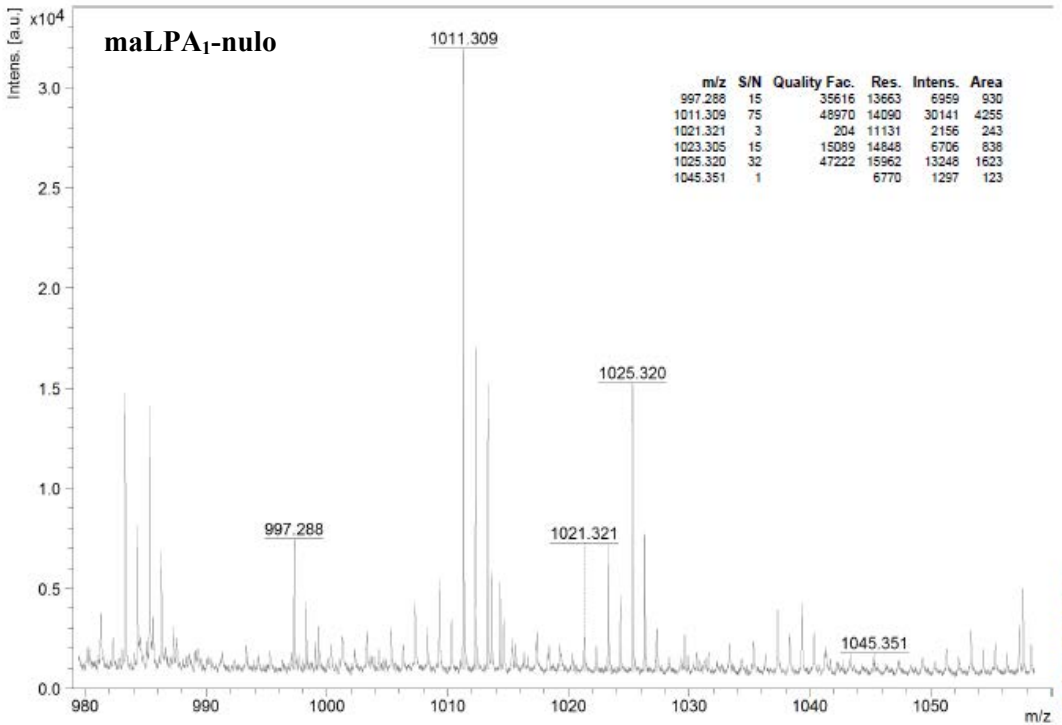
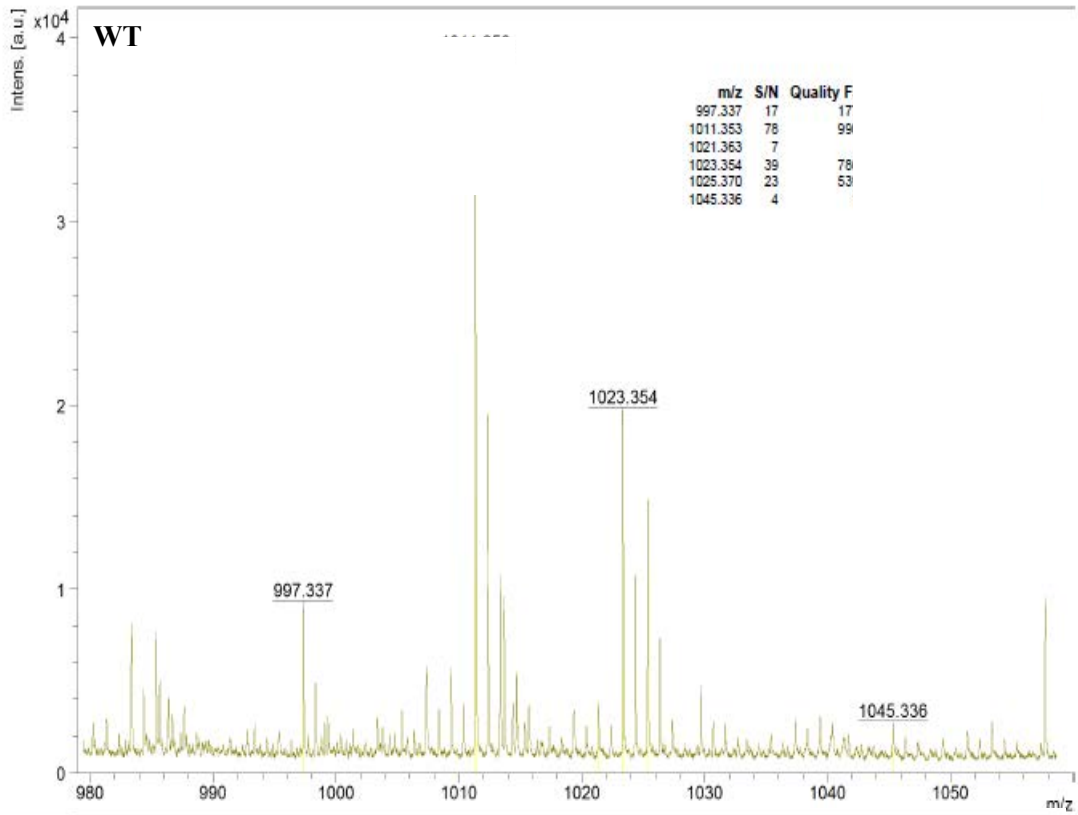


Anexo III: Espectros de tejido de hámster

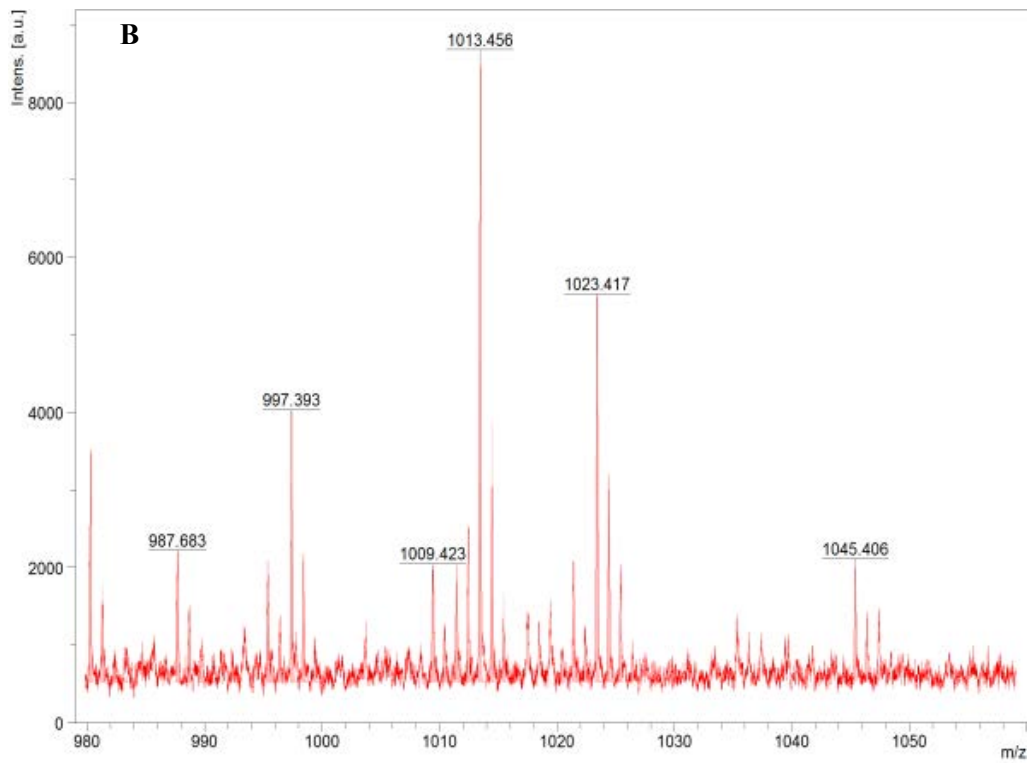
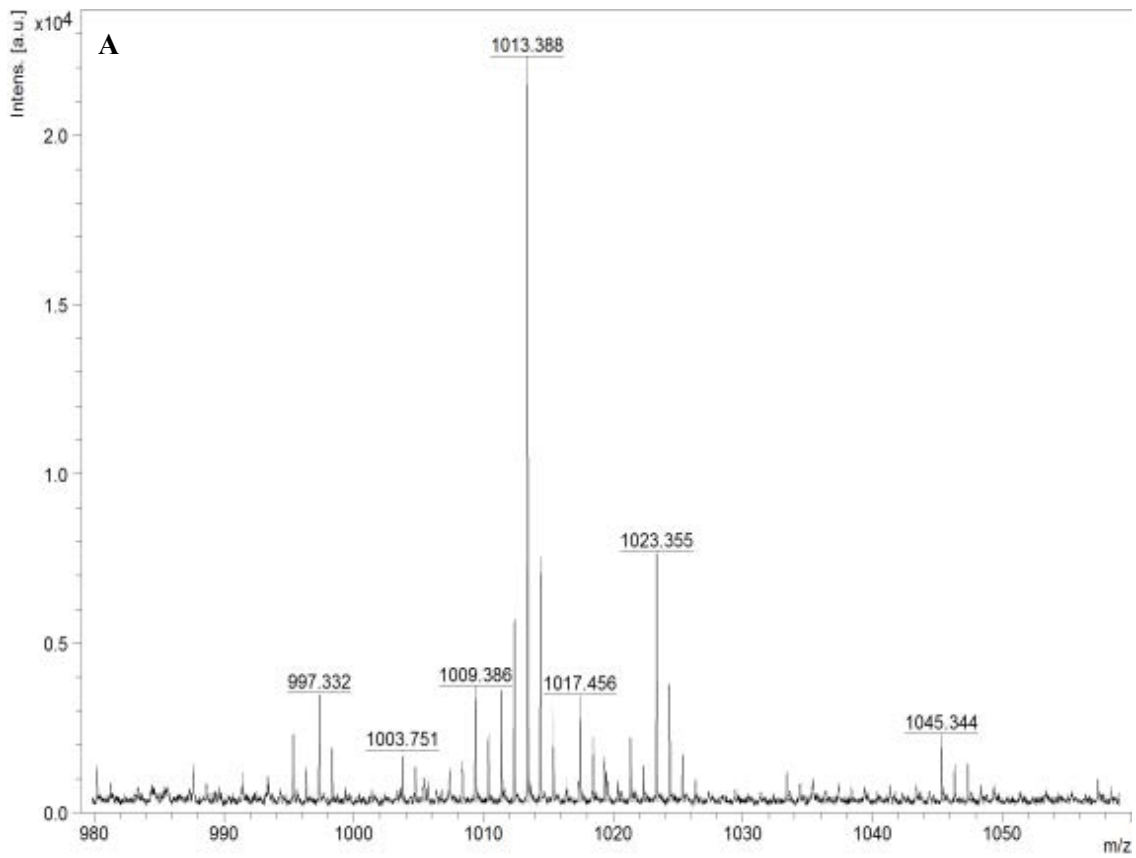
Anexo IV: Espectros de tejido cerebral de ratón superior a 100 mg



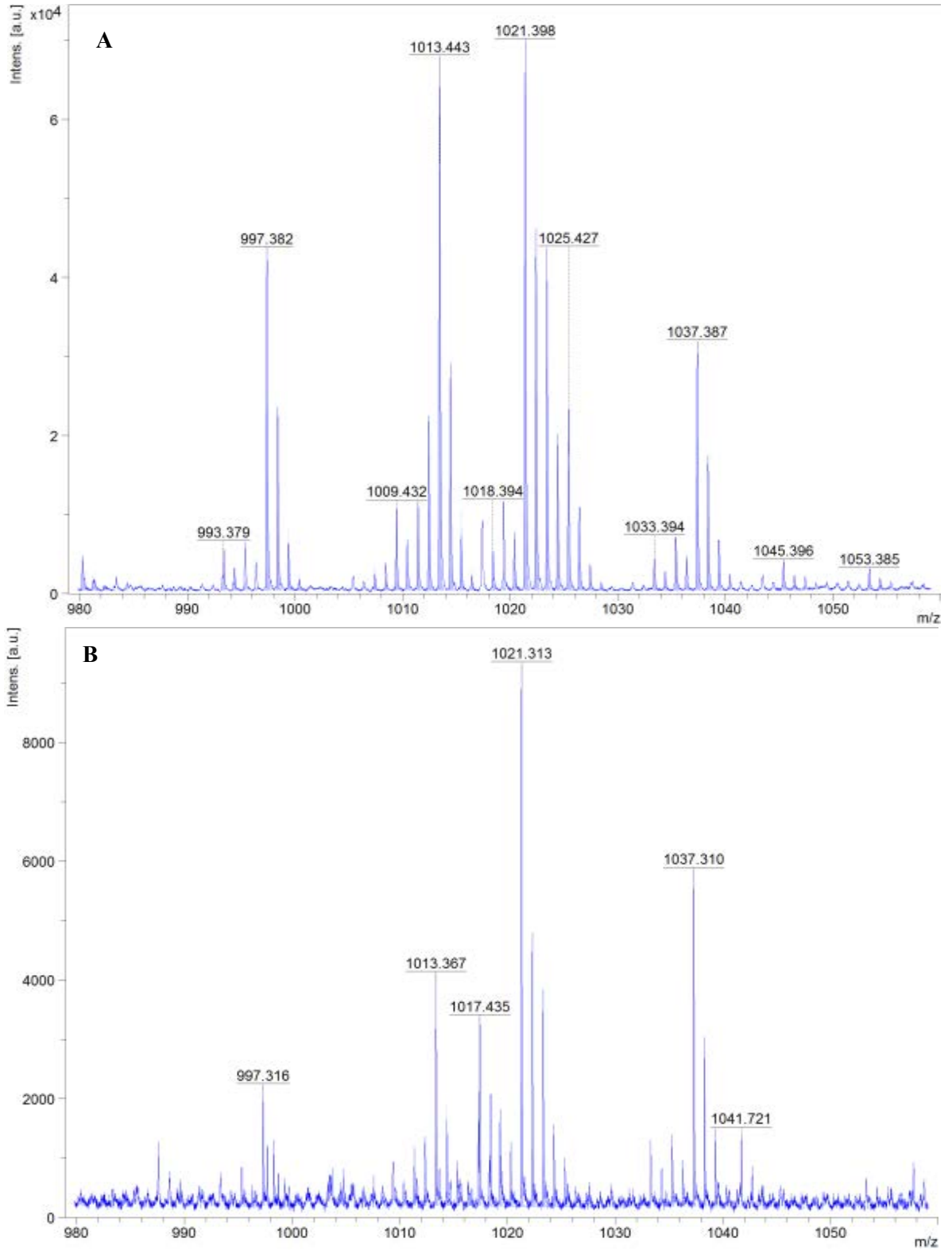
Anexo V: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidas de hipocampo de ratones



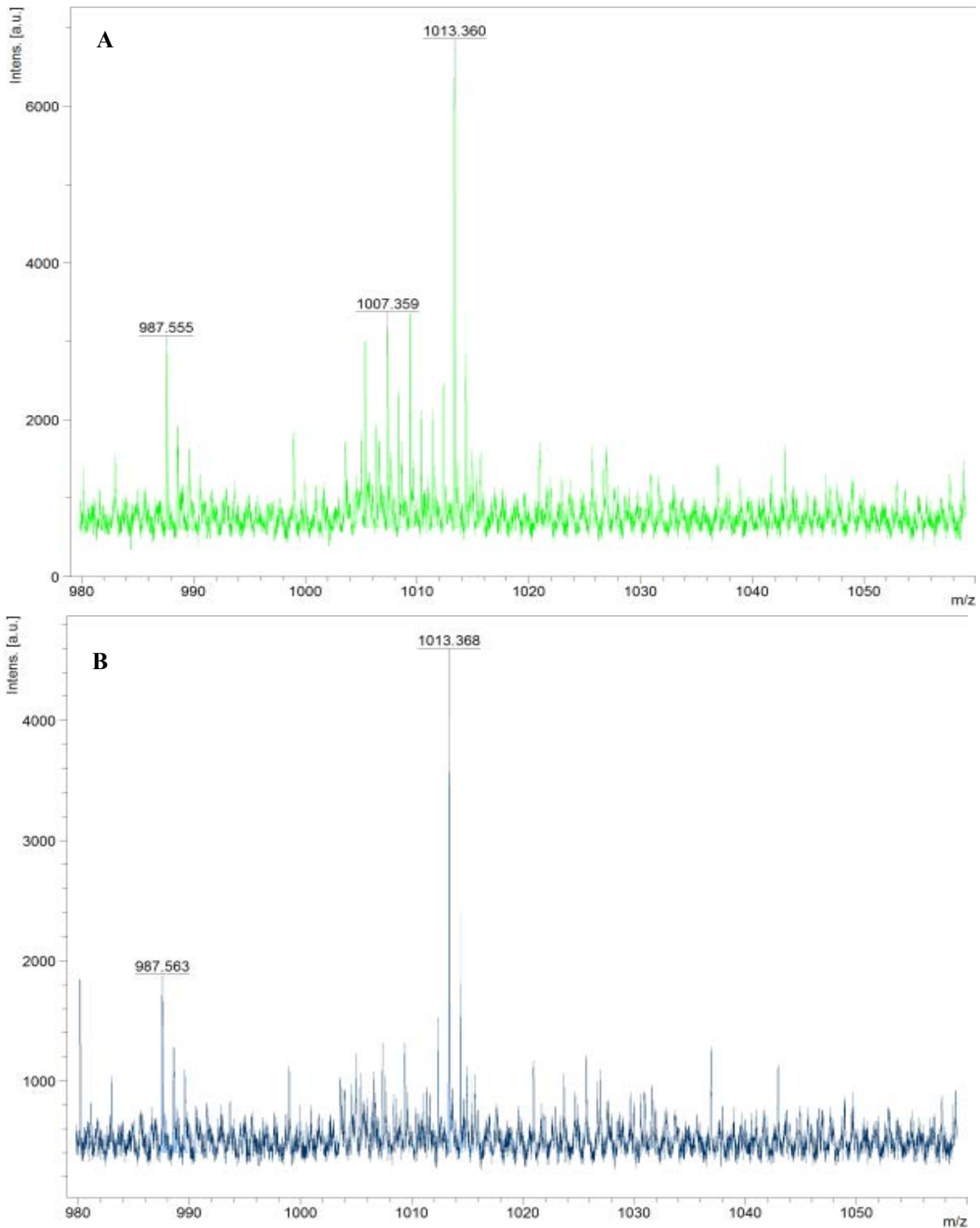
Anexo VI: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos en 25 μ l suero bovino fetal

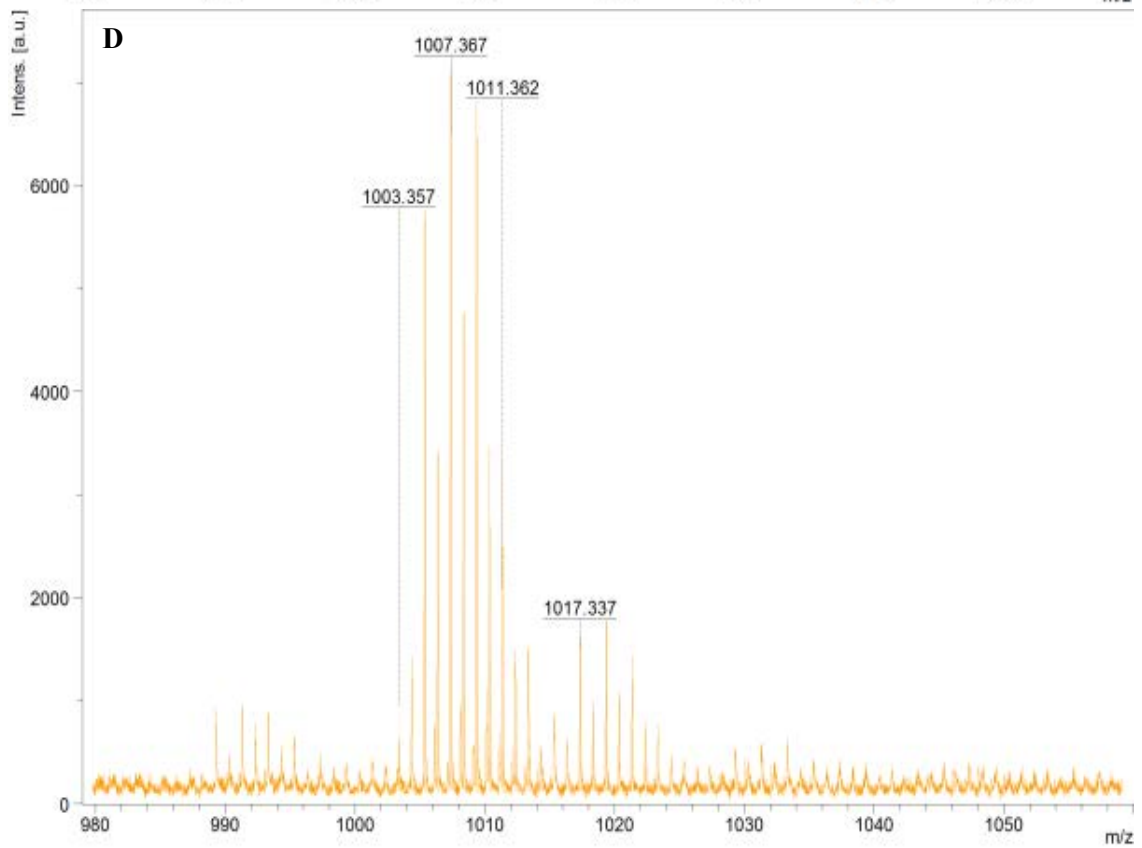
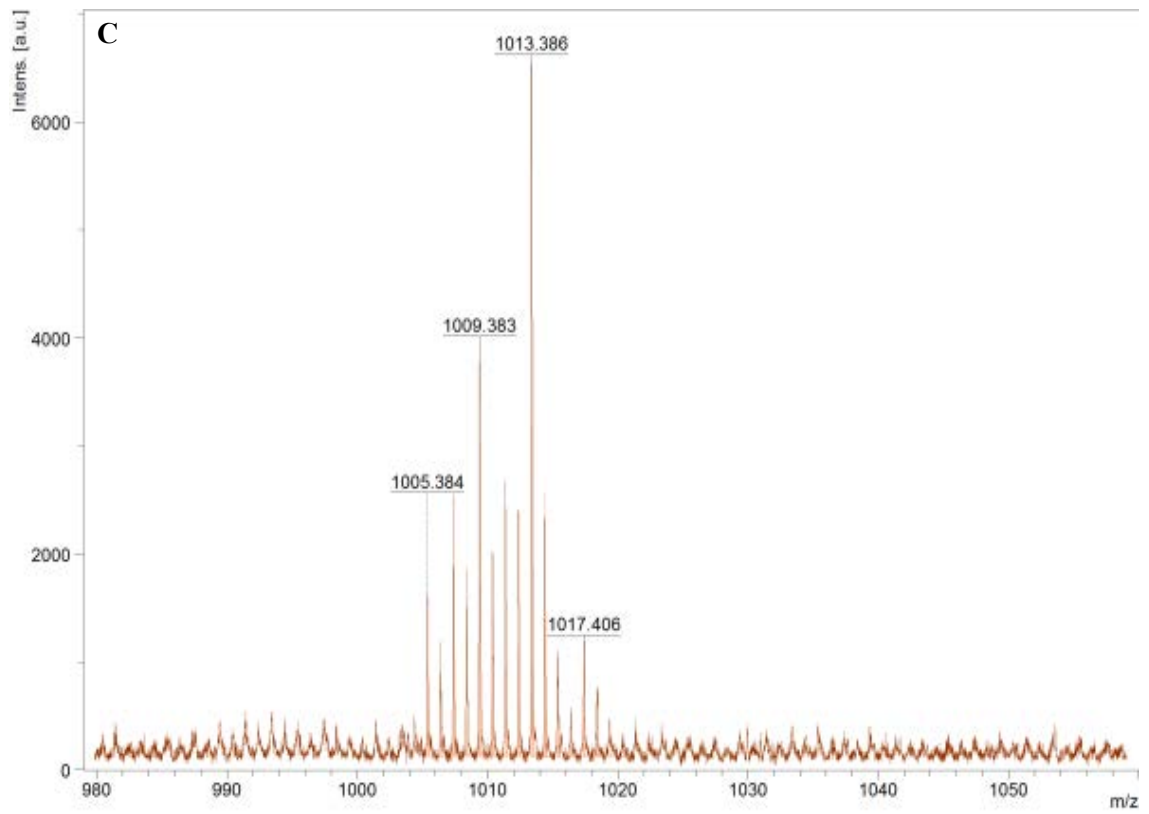


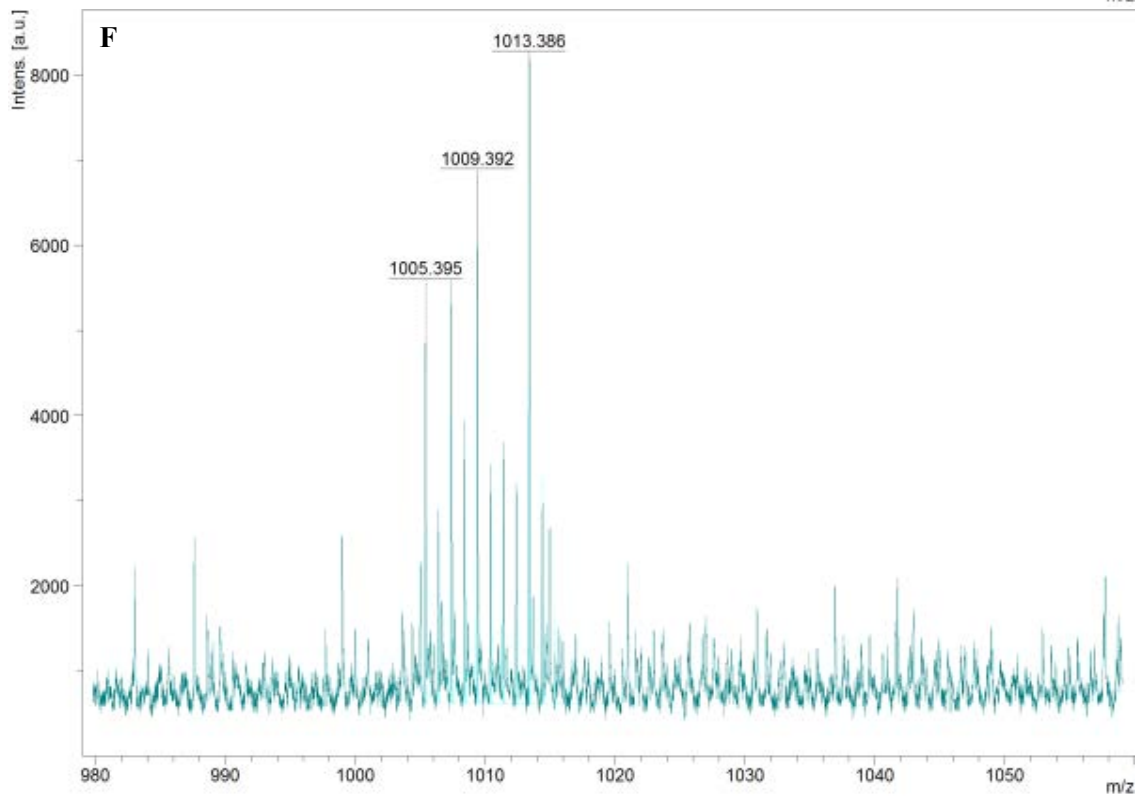
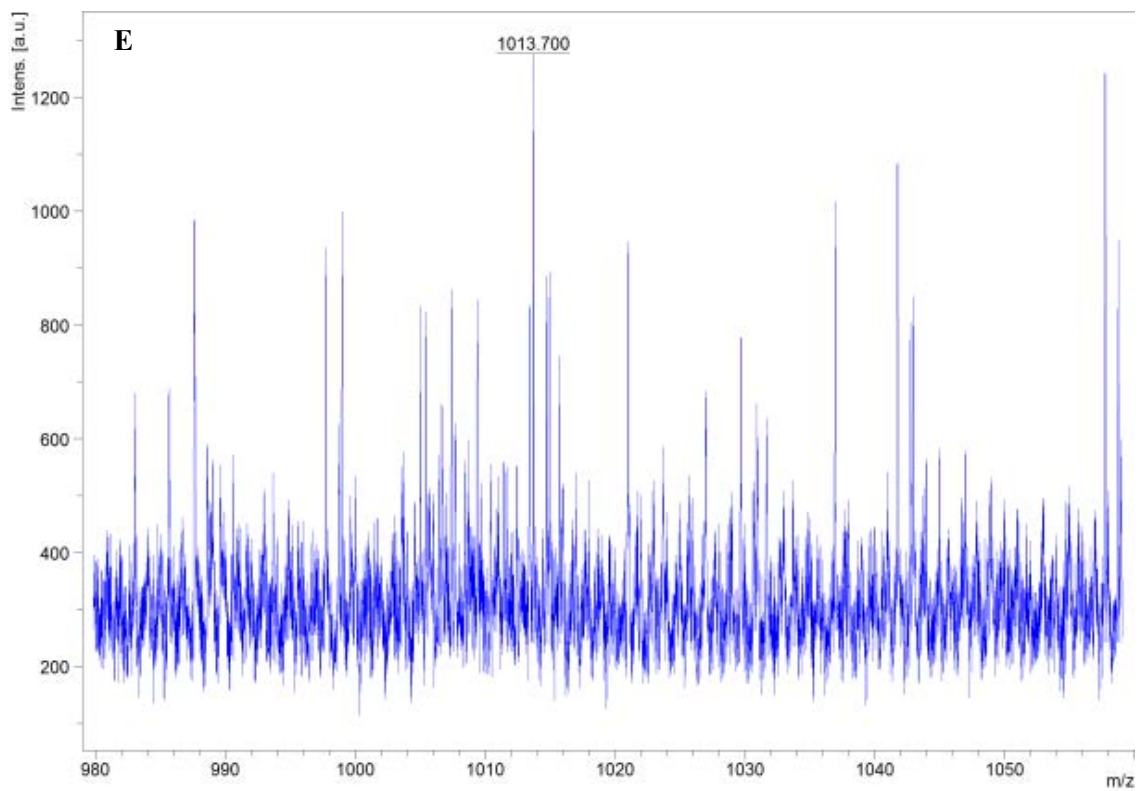
Anexo VII: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos en 25 μ l suero de conejo



Anexo VIII: Espectros de las señales de las especies de LPA obtenidos en 25 μ l suero de ratón







Anexo IX: Grupo experimental estrés crónico + administración de LPA

Para determinar si la administración continuada de LPA es capaz de revertir los efectos del estrés crónico sobre el sistema LPA hipocampal, se incluyó un nuevo grupo experimental: estrés crónico + LPA. Sin embargo, debido a la mortandad obtenida durante el experimento, el n de este grupo quedó reducido a tres, considerándose insuficiente para extraer conclusiones, decidiendo no incluirlo en el análisis principal de esta tesis, pero sí en un anexo, ya que se considera que son resultados preliminares prometedores.

Los resultados obtenidos con la inclusión de este grupo pueden verse resumidos en la figura A.1

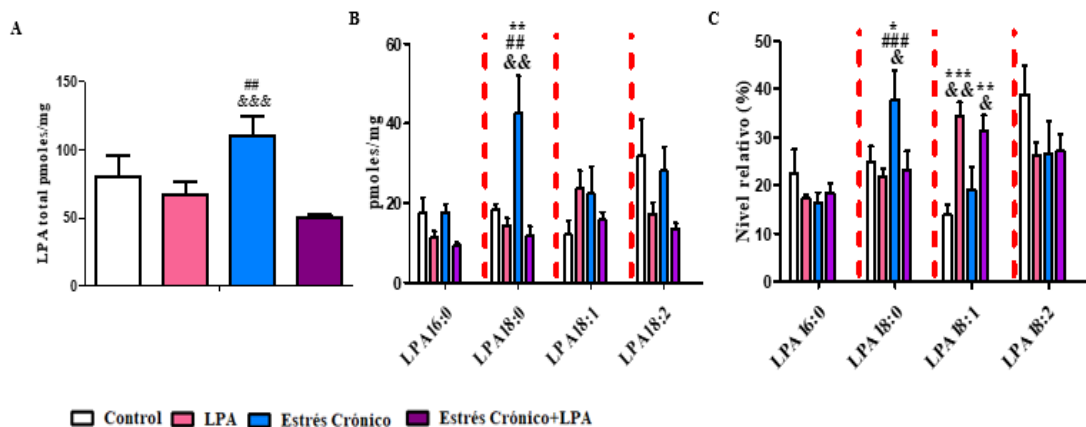


Figura A.1: A) Concentración de LPA total tras la administración repetida de LPA. B) Concentraciones de las especies de LPA. C) Niveles relativos de las especies de LPA. Los análisis estadísticos revelan diferencias respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) diferencias respecto al grupo de LPA (# $p < 0,05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$) y diferencias respecto al grupo estrés por inmovilización y administración de LPA (& $p < 0,05$; && $p < 0.01$; &&& $p < 0.001$).

A raíz de estos resultados podría decirse que la administración de LPA en condiciones de estrés es capaz de revertir algunos de los cambios producidos en el sistema de LPA hipocampal.

REFERENCIAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Agnati, L. F., Tiengo, M., Ferraguti, F., Biagini, G., Benfenati, F., Benedetti, C., ... Fuxe, K. (1991). Pain, analgesia, and stress: an integrated view. *The Clinical Journal of Pain*, 7 Suppl 1, S23-37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1810518>
- Aikawa, S., Hashimoto, T., Kano, K., & Aoki, J. (2015). Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *Journal of Biochemistry*, 157(2), 81–89. <https://doi.org/10.1093/jb/mvu077>
- Albers, H. M. H. G., Dong, A., van Meeteren, L. A., Egan, D. A., Sunkara, M., van Tilburg, E. W., ... Ovaa, H. (2010). Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7257–7262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001529107>
- Allard, J., Barron, S., Diaz, J., Lubetzki, C., Zalc, B., Schwartz, J. C., & Sokoloff, P. (1998). A rat G protein-coupled receptor selectively expressed in myelin-forming cells. *European Journal of Neuroscience*, 10(3), 1045–1053.
- An, S., Bleu, T., Zheng, Y., & Goetzl, E. J. (1998). Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization. *Molecular Pharmacology*, 54(5), 881–888. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804623>
- Anliker, B., & Chun, J. (2004). Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20555–20558. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400013200>
- Aoki, J. (2004). Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(5), 477–489. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2004.05.001>
- Aoki, J., Inoue, A., & Okudaira, S. (2008). Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(9), 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.06.005>
- Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., ... Arai, H. (2002). Serum Lysophosphatidic Acid Is Produced through Diverse Phospholipase Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48737–48744. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206812200>
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 29 Suppl 1, S49-52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852857>
- Aston, C., Jiang, L., & Sokolov, B. P. (2005). Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, 10(3), 309–322. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001565>
- Avanti Polar Lipids. (n.d.). Retrieved February 27, 2019, from <https://avantilipids.com/>
- Bach, D., & Wachtel, E. (2003). Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1610(2), 187–197.

Referencias

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648773>

- Balla, T. (2013). Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiological Reviews*, 93(3), 1019–1137. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2012>
- 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(1–2), 159–165.
- Bektas, M., Payne, S. G., 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(5), 801–811. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407123>
- Bieberich, E. (2012). It's a lipid's world: Bioactive lipid metabolism and signaling in neural stem cell differentiation. *Neurochemical Research*, 37(6), 1208–1229. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0698-5>
- Birgbauer, E., & Chun, J. (2006). New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 63(23), 2695–2701. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6155-y>
- Black, E. J., Clair, T., Delrow, J., Neiman, P., & Gillespie, D. A. F. (2004). Microarray analysis identifies Autotaxin, a tumour cell motility and angiogenic factor with lysophospholipase D activity, as a specific target of cell transformation by v-Jun. *Oncogene*, 23(13), 2357–2366. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207377>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., ... Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 22(4), 589-599.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015>
- Bollen, M., Gijbbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W., & Stefan, C. (2000). Nucleotide Pyrophosphatases/Phosphodiesterases on the Move. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6), 393–432. <https://doi.org/10.1080/10409230091169249>
- Boyer, P. (2000). Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? *Acta Psychiatrica Scandinavica. Supplementum*, (406), 24–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11131467>
- Brandão, M. L., Vianna, D. M., Masson, S., & Santos, J. (2003). [Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety]. *Revista Brasileira de Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*, 25 Suppl 2, 36–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978585>
- Brown, H. A., & Murphy, R. C. (2009). Working towards an exegesis for lipids in biology. *Nature Chemical Biology*, 5(9), 602–606. <https://doi.org/10.1038/nchembio0909-602>
- Bruins, A. P. (1991). Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric



Referencias

- pressure. *Mass Spectrometry Reviews*, *10*(1), 53–77.
<https://doi.org/10.1002/mas.1280100104>
- Brunkhorst-Kanaan, N., Klatt-Schreiner, K., Hackel, J., Schröter, K., Trautmann, S., Hahnefeld, L., ... Tegeder, I. (2019). Targeted lipidomics reveal derangement of ceramides in major depression and bipolar disorder. *Metabolism*, *95*, 65–76.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.04.002>
- Callaerts-Vegh, Z., Leo, S., Vermaercke, B., Meert, T., & D’Hooge, R. (2012a). LPA₅ receptor plays a role in pain sensitivity, emotional exploration and reversal learning. *Genes, Brain and Behavior*, *11*(8), n/a-n/a.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00840.x>
- Callaerts-Vegh, Z., Leo, S., Vermaercke, B., Meert, T., & D’Hooge, R. (2012b). LPA₅ receptor plays a role in pain sensitivity, emotional exploration and reversal learning. *Genes, Brain and Behavior*, *11*(8), n/a-n/a.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00840.x>
- Cammack, R., Atwood, T., Campbell, P., Parish, H., Smith, A., Vella, F., & Stirling, J. (Eds.). (2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acref/9780198529170.001.0001>
- Carrié, I., Clément, M., de Javel, D., Francès, H., & Bourre, J. M. (2000). Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *Journal of Lipid Research*, *41*(3), 465–472. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706594>
- Castilla-Ortega, E., Escuredo, L., Bilbao, A., Pedraza, C., Orio, L., Estivill-Torrús, G., ... Pavón, F. J. (2014). 1-Oleoyl lysophosphatidic acid: a new mediator of emotional behavior in rats. *PloS One*, *9*(1), e85348.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085348>
- Castilla-Ortega, E., Sánchez-López, J., Hoyo-Becerra, C., Matas-Rico, E., Zambrana-Infantes, E., Chun, J., ... Santin, L. J. (2010). Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA1 receptor. *Neurobiology of Learning and Memory*, *94*(1), 73–82.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.04.003>
- Castro, J. E., Diessler, S., Varea, E., Ma, C., Larsen, M. H., Cordero, M. I., & Sandi, C. (2012). Personality traits in rats predict vulnerability and resilience to developing stress-induced depression- like behaviors , HPA axis hyper-reactivity and brain changes in pERK1 / 2 activity. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.12.014>
- Cerqueira, J. J., Mailliet, F., Almeida, O. F. X., Jay, T. M., & Sousa, N. (2007). The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(11), 2781–2787. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4372-06.2007>
- Cerutis, D. R., Weston, M. D., Ogunleye, A. O., McVaney, T. P., & Miyamoto, T. (2014). Lysophosphatidic acid (LPA) 18:1 transcriptional regulation of primary human gingival fibroblasts. *Genomics Data*, *2*, 375–377.
<https://doi.org/10.1016/j.gdata.2014.10.014>
- Cevc, G., Allen, T. M., & Neidleman, S. L. (1993). *Phospholipids handbook*. New

Referencias

- York: Marcel Dekker, Inc. Retrieved from <https://copac.jisc.ac.uk/id/8119633?style=html>
- Choi, J W, Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C. W., Mutoh, T., ... Chun, J. (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50(December 2009), 157–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753>
- Choi, Ji Woong, & Chun, J. (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(1), 20–32. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2012.07.015>
- Choi, Ji Woong, Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C.-W., Mutoh, T., ... Chun, J. (2010a). LPA Receptors: Subtypes and Biological Actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 157–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753>
- Choi, Ji Woong, Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C., Mutoh, T., ... Chun, J. (2010b). LPA Receptors : Subtypes and Biological Actions. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753>
- Christian, K. M., Song, H., & Ming, G. (2014). Functions and Dysfunctions of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 243–262. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014134>
- Christie, W. W. (2003). *Lipid analysis : isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. Published in 2003 in Bridgewater by Oily*. Oily Press. Retrieved from <https://lib.ugent.be/en/catalog/rug01:002002644>
- Chun, J., Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S., & Moolenaar, W. H. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 579–587. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003111>
- Chun, Jerold, Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S., & Moolenaar, W. H. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 579–587. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003111>
- Coleman, R. A., & Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research*, 43(2), 134–176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14654091>
- Contos, J. J. A., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., & Chun, J. (2000). Requirement for the lp A1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior.
- Contos, J. J. A., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M. A., Ye, X., Kawamura, S., ... Chun, J. (2002). Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). *Molecular and Cellular Biology*, 22(19), 6921–6929. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215548>

Referencias

- Cooks, R. G., Ouyang, Z., Takats, Z., & Wiseman, J. M. (2006). Ambient Mass Spectrometry. *Science*, *311*(5767), 1566–1570. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1119426>
- Cronan, J. E. (2003). Bacterial Membrane Lipids: Where Do We Stand? *Annual Review of Microbiology*, *57*(1), 203–224. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090851>
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, *23*(5), 238–245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12008002>
- Dash, P. K., Orsi, S. A., Moody, M., & Moore, A. N. (2004). A role for hippocampal Rho–ROCK pathway in long-term spatial memory. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *322*(3), 893–898. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.004>
- Dass, C. (2007). *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Wiley-Interscience. Retrieved from <https://www.wiley.com/en-us/Fundamentals+of+Contemporary+Mass+Spectrometry-p-9780471682295>
- Daulatzai, M. A. (2014). Role of Stress, Depression, and Aging in Cognitive Decline and Alzheimer's Disease. In *Current topics in behavioral neurosciences* (Vol. 18, pp. 265–296). https://doi.org/10.1007/7854_2014_350
- DeMar, J. C., Ma, K., Bell, J. M., Igarashi, M., Greenstein, D., & Rapoport, S. I. (2006). One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *Journal of Lipid Research*, *47*(1), 172–180. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500362-JLR200>
- Demmig-Adams, B., & Adams, W. W. (2002). Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. *Science*, *298*(5601), 2149–2153. <https://doi.org/10.1126/science.1078002>
- Deng, W., Balazs, L., Wang, D.-A., Van Middlesworth, L., Tigyi, G., & Johnson, L. R. (2002). Lysophosphatidic acid protects and rescues intestinal epithelial cells from radiation- and chemotherapy-induced apoptosis. *Gastroenterology*, *123*(1), 206–216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12105849>
- Dias-Ferreira, E., Sousa, J. C., Melo, I., Morgado, P., Mesquita, A. R., Cerqueira, J. J., ... Sousa, N. (2009). Chronic Stress Causes Frontostriatal Reorganization and Affects Decision-Making. *Science*, *325*(5940), 621–625. <https://doi.org/10.1126/science.1171203>
- Dotson, V. M., Szymkowicz, S. M., Kirton, J. W., McLaren, M. E., Green, M. L., & Rohani, J. Y. (2014). Unique and Interactive Effect of Anxiety and Depressive Symptoms on Cognitive and Brain Function in Young and Older Adults. *Journal of Depression and Anxiety*, *S1*(01). <https://doi.org/10.4172/2167-1044.S1-003>
- Emanuel Schwarz; Sudhakran Prabakaran; Phil Whitfield; Hilary Major; F. M. Leweke; Dagmar Koethe; Peter McKenna; Sabine Bahn(2008). High throughput lipidomic profiling of schizophrenia and bipolar disorder brain tissue reveals alterations of free fatty acids, phosphatidylcholines, and ceramides. *Journal of Proteome Research*, *7*(10), 4266–4277. Retrieved from

- <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed8&NEWS=N&AN=2009115288>
- Estivill-Torrus, G., Llebreg-Zayas, P., Matas-Rico, E., Santin, L., Pedraza, C., De Diego, I., ... De Fonseca, F. R. (2008). Absence of LPA1 Signaling Results in Defective Cortical Development. *Cerebral Cortex*, *18*(4), 938–950. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm132>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., ... Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, *46*(5), 839–862. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., ... Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, *50 Suppl*(Supplement), S9-14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Francès, H., Draï, P., Smirnova, M., Carrié, I., Debray, M., & Bourre, J. M. (2000). Nutritional (n-3) polyunsaturated fatty acids influence the behavioral responses to positive events in mice. *Neuroscience Letters*, *285*(3), 223–227. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01065-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01065-X)
- Frugier, T., Crombie, D., Conquest, A., Tjhong, F., Taylor, C., Kulkarni, T., ... Pébay, A. (2011). Modulation of LPA Receptor Expression in the Human Brain Following Neurotrauma. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *31*(4), 569–577. <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9650-0>
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. J., Weiner, J. A., & Chun, J. (2001). Lysophospholipid receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *41*(1), 507–534. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.507>
- García-Díaz, B., Riquelme, R., Varela-Nieto, I., Jiménez, A. J., de Diego, I., Gómez-Conde, A. L., ... Estivill-Torrús, G. (2015). Loss of lysophosphatidic acid receptor LPA1 alters oligodendrocyte differentiation and myelination in the mouse cerebral cortex. *Brain Structure & Function*, *220*(6), 3701–3720. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0885-7>
- Goldstein, S., Halbreich, U., Asnis, G., Endicott, J., & Alvir, J. (1987). The hypothalamic-pituitary-adrenal system in panic disorder. *American Journal of Psychiatry*, *144*(10), 1320–1323. <https://doi.org/10.1176/ajp.144.10.1320>
- Graeff, F. G. (2003). [Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder]. *Revista Brasileira de Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*, *25 Suppl 2*, 42–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978586>
- Griesinger, H., Fuchs, B., Süß, R., Matheis, K., Schulz, M., & Schiller, J. (2014). Stationary phase thickness determines the quality of thin-layer chromatography/matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectra of lipids. *Analytical Biochemistry*, *451*, 45–47. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.02.002>
- Gulbins, E., Palmada, M., Reichel, M., Lüth, A., Böhmer, C., Amato, D., ... Kornhuber, J. (2013). Acid sphingomyelinase–ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nature Medicine*, *19*(7), 934–938.



- <https://doi.org/10.1038/nm.3214>
- Han, X., Yang, K., & Gross, R. W. (2012). Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses. *Mass Spectrometry Reviews*, *31*(1), 134–178. <https://doi.org/10.1002/mas.20342>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(2), 139–150. <https://doi.org/10.1038/nrm2329>
- Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R., & 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*(4), 1071–1083. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8922387>
- Hill, M. N., Hellems, K. G. C., Verma, P., Gorzalka, B. B., & Weinberg, J. (2012). Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *36*(9), 2085–2117. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.07.001>
- Horrobin, D. F., & Bennett, C. N. (1999). Depression and bipolar disorder: relationships to impaired fatty acid and phospholipid metabolism and to diabetes, cardiovascular disease, immunological abnormalities, cancer, ageing and osteoporosis Possible candidate genes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, *60*(4), 217–234. <https://doi.org/10.1054/plef.1999.0037>
- Houben, A. J. S., & Moolenaar, W. H. (2011). Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, *30*(3–4), 557–565. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9319-7>
- Hu, T., & Zhang, J. L. (2018). Mass-spectrometry-based lipidomics. *Journal of Separation Science*, *41*(1), 351–372. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700709>
- Hurst-Kennedy, J., Zhong, M., Gupta, V., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2010). 24R,25-Dihydroxyvitamin D₃, lysophosphatidic acid, and p53: A signaling axis in the inhibition of phosphate-induced chondrocyte apoptosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *122*(4), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.05.010>
- Ishii, I., Contos, J. J., Fukushima, N., & Chun, J. (2000). Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol. Pharmacol.*, *58*(5), 895–902. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11040035>
- Ishii, Isao, Fukushima, N., Ye, X., & Chun, J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual Review of Biochemistry*, *73*(1), 321–354. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073731>
- Itagaki, K., Takebayashi, M., Abe, H., Shibasaki, C., Kajitani, N., Okada-Tsuchioka, M., ... Yamawaki, S. (2019). Reduced Serum and Cerebrospinal Fluid Levels of Autotaxin in Major Depressive Disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *22*(4), 261–269. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyz005>
- Jasinska, R., Zhang, Q. X., Pilquill, C., Singh, I., Xu, J., Dewald, J., ... Brindley, D. N.



Referencias

- (1999). Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters. *The Biochemical Journal*, 340 (Pt 3), 677–686. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359651>
- Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1–3), 245–256. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00153-0)
- JONES, G., STRUGNELL, S. A., & DeLUCA, H. F. (1998). Current Understanding of the Molecular Actions of Vitamin D. *Physiological Reviews*, 78(4), 1193–1231. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.1193>
- Kang, E., Wen, Z., Song, H., Christian, K. M., & Ming, G.-L. (2016a). Adult Neurogenesis and Psychiatric Disorders. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9), a019026. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019026>
- Kang, E., Wen, Z., Song, H., Christian, K. M., & Ming, G. (2016b). Adult Neurogenesis and Psychiatric Disorders. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9), a019026. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019026>
- Kéri, S., Szabó, C., & Kelemen, O. (2014). Blood biomarkers of depression track clinical changes during cognitive-behavioral therapy. *Journal of Affective Disorders*, 164, 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.04.030>
- Khosla, C., Gokhale, R. S., Jacobsen, J. R., & Cane, D. E. (1999). Tolerance and Specificity of Polyketide Synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 219–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.219>
- Kihara, Y., Mizuno, H., & Chun, J. (2015). Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Experimental Cell Research*, 333(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.11.020>
- Knobloch, M. (2017). The Role of Lipid Metabolism for Neural Stem Cell Regulation. *Brain Plasticity*, 1, 1–11. <https://doi.org/10.3233/BPL-160035>
- Koga, Y., Nishihara, M., Morii, H., & Akagawa-Matsushita, M. (1993). Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiological Reviews*, 57(1), 164–182. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8464404>
- Kotarsky, K., Boketoft, A., Bristulf, J., Nilsson, N. E., Norberg, A., Hansson, S., ... Olde, B. (2006). Lysophosphatidic Acid Binds to and Activates GPR92, a G Protein-Coupled Receptor Highly Expressed in Gastrointestinal Lymphocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(2), 619–628. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.098848>
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215), 894–902. <https://doi.org/10.1038/nature07455>
- Kuzuyama, T., & Seto, H. (2003). Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Natural Product Reports*, 20(2), 171–183. <https://doi.org/10.1039/b109860h>

- Ladrón de Guevara-Miranda, D., Moreno-Fernández, R. D., Gil-Rodríguez, S., Rosell-Valle, C., Estivill-Torrús, G., Serrano, A., ... Castilla-Ortega, E. (2018). Lysophosphatidic acid-induced increase in adult hippocampal neurogenesis facilitates the forgetting of cocaine-contextual memory. *Addiction Biology*, (Everitt 2014). <https://doi.org/10.1111/adb.12612>
- Lazar, K., & Walker, S. (2002). Substrate analogues to study cell-wall biosynthesis and its inhibition. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(6), 786–793. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00355-1](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00355-1)
- Le-Niculescu, H., Kurian, S. M., Yehyaw, N., Dike, C., Patel, S. D., Edenberg, H. J., ... Niculescu, A. B. (2009). Identifying blood biomarkers for mood disorders using convergent functional genomics. *Molecular Psychiatry*, 14(2), 156–174. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.11>
- Ledeen, R W, & Wu, G. (2004). Nuclear lipids: key signaling effectors in the nervous system and other tissues. *Journal of Lipid Research*, 45(1), 1–8. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300015-JLR200>
- Ledeen, Robert W., & Wu, G. (2004). Nuclear lipids: key signaling effectors in the nervous system and other tissues. *Journal of Lipid Research*, 45(1), 1–8. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300015-JLR200>
- Lee, C.-W., Kim, N.-H., Choi, H.-K., Sun, Y., Nam, J.-S., Rhee, H. J., ... Huh, S.-O. (2008). Lysophosphatidic acid-induced c-fos up-regulation involves cyclic AMP response element-binding protein activated by mitogen- and stress-activated protein kinase-1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(3), 785–794. <https://doi.org/10.1002/jcb.21663>
- Lee, C.-W., Rivera, R., Dubin, A. E., & Chun, J. (2007). LPA₄/GPR23 Is a Lysophosphatidic Acid (LPA) Receptor Utilizing G_s-, G_q/G_i-mediated Calcium Signaling and G12/13-mediated Rho Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4310–4317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610826200>
- Lee, C.-W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A. E., & Chun, J. (2006). GPR92 as a New G12/13- and G_q-coupled Lysophosphatidic Acid Receptor That Increases cAMP, LPA₅. *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23589–23597. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603670200>
- Lee, C.-W., Yung, Y. C., Mosley, A. N., Chun, J., Teo, S. T., Herr, D. R., ... Mutoh, T. (2010). LPA Receptors: Subtypes and Biological Actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 157–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753>
- Lee, L. H.-W., Shui, G., Farooqui, A. A., Wenk, M. R., Tan, C.-H., & Ong, W.-Y. (2009). Lipidomic analyses of the mouse brain after antidepressant treatment: evidence for endogenous release of long-chain fatty acids? *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(07), 953. <https://doi.org/10.1017/S146114570900995X>
- Lee, M., Choi, S., Halldén, G., Yo, S. J., Schichnes, D., & Aponte, G. W. (2009). P2Y₅ is a G_{α_i}, G_{α_{12/13}} G protein-coupled receptor activated by lysophosphatidic acid that reduces intestinal cell adhesion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(4), G641–G654.



<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00191.2009>

- Li, Y., Chen, Y., Gao, X., & Zhang, Z. (2017). The behavioral deficits and cognitive impairment are correlated with decreased IGF-II and ERK in depressed mice induced by chronic unpredictable stress. *International Journal of Neuroscience*, *127*(12), 1096–1103. <https://doi.org/10.1080/00207454.2017.1337014>
- Lin, M. E., Herr, D. R., & Chun, J. (2010). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: Signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, *91*(3–4), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.02.002>
- Lin, M., Hou, G., Zhao, Y., & Yuan, T.-F. (2018). Recovery of Chronic Stress-Triggered Changes of Hippocampal Glutamatergic Transmission. *Neural Plasticity*, *2018*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/9360203>
- Lingwood, C. A., Manis, A., Mahfoud, R., Khan, F., Binnington, B., & Mylvaganam, M. (2010). New aspects of the regulation of glycosphingolipid receptor function. *Chemistry and Physics of Lipids*, *163*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.09.001>
- Liston, C., Cichon, J. M., Jeanneteau, F., Jia, Z., Chao, M. V, & Gan, W.-B. (2013). Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. *Nature Neuroscience*, *16*(6), 698–705. <https://doi.org/10.1038/nn.3387>
- Liu, M., & Subbaiah, P. V. (1993). Activation of plasma lysolecithin acyltransferase reaction by apolipoproteins A-I, C-I and E. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1168*(2), 144–152. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8504148>
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 434–445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- Lydic, T. A., & Goo, Y.-H. (2018). Lipidomics unveils the complexity of the lipidome in metabolic diseases. *Clinical and Translational Medicine*, *7*(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0182-9>
- Ma, L., Nagai, J., Chun, J., & Ueda, H. (2013). An LPA species (18:1 LPA) plays key roles in the self-amplification of spinal LPA production in the peripheral neuropathic pain model. *Molecular Pain*, *9*, 29. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-9-29>
- Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience*, *69*(1), 83–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637635>
- Makino, S., Smith, M. A., & Gold, P. W. (2002). Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. *Brain Research*, *943*(2), 216–223. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12101044>
- Malcher-Lopes, R., Franco, A., & Tasker, J. G. (2008). Glucocorticoids shift arachidonic acid metabolism toward endocannabinoid synthesis: a non-genomic anti-inflammatory switch. *European Journal of Pharmacology*, *583*(2–3), 322–

339. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.033>
- Masago, K., Kihara, Y., Yanagida, K., Hamano, F., Nakagawa, S., Niwa, M., & Shimizu, T. (2018). Lysophosphatidic acid receptor, LPA6, regulates endothelial blood-brain barrier function: Implication for hepatic encephalopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(4), 1048–1054. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.106>
- Matas-Rico, E., García-Díaz, B., Llebreg-Zayas, P., López-Barroso, D., Santín, L., Pedraza, C., ... Estivill-Torrús, G. (2008a). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 39(3), 342–355. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.07.014>
- Matas-Rico, E., García-Díaz, B., Llebreg-Zayas, P., López-Barroso, D., Santín, L., Pedraza, C., ... Estivill-Torrús, G. (2008b). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(3), 342–355. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.07.014>
- McEwen, B. S. (2010). Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1204 Suppl(Suppl), E38-59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05568.x>
- McEwen, B. S. (2016). Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*, 1645, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.043>
- McEwen, B. S., & Gianaros, P. J. (2011). Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annual Review of Medicine*, 62, 431–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-052209-100430>
- McEwen, de Leon MJ, Lupien, & Meaney. (1999). Corticosteroids, the Aging Brain and Cognition. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 10(3), 92–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10322401>
- Meerschaert, K., De Corte, V., De Ville, Y., Vandekerckhove, J., & Gettemans, J. (1998). Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatidic acid. *The EMBO Journal*, 17(20), 5923–5932. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.5923>
- Meganathan, R. (2001). Biosynthesis of menaquinone (vitamin K2) and ubiquinone (coenzyme Q): a perspective on enzymatic mechanisms. *Vitamins and Hormones*, 61, 173–218. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153266>
- Miranda, A. M., & Oliveira, T. G. (2015). Lipids under stress - A lipidomic approach for the study of mood disorders. *BioEssays*, 37(11), 1226–1235. <https://doi.org/10.1002/bies.201500070>
- Moreno-Fernández, R. D., Pérez-Martín, M., Castilla-Ortega, E., Rosell Del Valle, C., García-Fernández, M. I., Chun, J., ... Pedraza, C. (2017). maLPA1-null mice as an endophenotype of anxious depression. *Translational Psychiatry*, 7(4), e1077. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.24>
- Morishige, J., Urikura, M., Takagi, H., Hirano, K., Koike, T., Tanaka, T., & Satouchi,

- K. (2010). A clean-up technology for the simultaneous determination of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a phosphate-capture molecule, Phos-tag. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(7), 1075–1084. <https://doi.org/10.1002/rcm.4484>
- Mühle, C., Reichel, M., Gulbins, E., & Kornhuber, J. (2013). Sphingolipids in Psychiatric Disorders and Pain Syndromes (pp. 431–456). Springer, Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1511-4_22
- Mühle, Christiane, Wagner, C. J., Färber, K., Richter-Schmidinger, T., Gulbins, E., Lenz, B., ... Kornhuber, J. (2019). Secretory Acid Sphingomyelinase in the Serum of Medicated Patients Predicts the Prospective Course of Depression. *Journal of Clinical Medicine*, 8(6), 846. <https://doi.org/10.3390/jcm8060846>
- Müller, C. P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Gulbins, E., & Kornhuber, J. (2015). Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(8), 1052–1065. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.014>
- Murakami, Makoto, & Kudo, I. (2002). Phospholipase A2. *Journal of Biochemistry*, 131(3), 285–292. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872155>
- Murakami, Masanori, Shiraishi, A., Tabata, K., & Fujita, N. (2008). Identification of the orphan GPCR, P2Y10 receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(4), 707–712. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.145>
- Muscella, A., Greco, S., Elia, M. G., Storelli, C., & Marsigliante, S. (2003). PKC- ζ is required for angiotensin II-induced activation of ERK and synthesis of C-FOS in MCF-7 cells. *Journal of Cellular Physiology*, 197(1), 61–68. <https://doi.org/10.1002/jcp.10336>
- Nho, K., Ramanan, V. K., Horgusluoglu, E., Kim, S., Inlow, M. H., Risacher, S. L., ... Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). (2015). Comprehensive Gene- and Pathway-Based Analysis of Depressive Symptoms in Older Adults. *Journal of Alzheimer's Disease*, 45(4), 1197–1206. <https://doi.org/10.3233/JAD-148009>
- Noguchi, K., Herr, D., Mutoh, T., & Chun, J. (2009). Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.11.010>
- Noguchi, K., Ishii, S., & Shimizu, T. (2003). Identification of p2y₉/GPR23 as a Novel G Protein-coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, Structurally Distant from the Edg Family. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25600–25606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302648200>
- Ohuchi, H., Hamada, A., Matsuda, H., Takagi, A., Tanaka, M., Aoki, J., ... Noji, S. (2008). Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Developmental Dynamics*, 237(11), 3280–3294. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21736>
- Oka, S., Ota, R., Shima, M., Yamashita, A., & Sugiura, T. (2010). GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications*, 395(2), 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.169>
- Okudaira, S., Yukiura, H., & Aoki, J. (2010). Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie*, 92(6), 698–706. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.04.015>
- Olianas, M. C., Dedoni, S., & Onali, P. (2015). Antidepressants activate the lysophosphatidic acid receptor LPA 1 to induce insulin-like growth factor-I receptor transactivation, stimulation of ERK1/2 signaling and cell proliferation in CHO-K1 fibroblasts. *Biochemical Pharmacology*, 95(4), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.002>
- Olianas, M. C., Dedoni, S., & Onali, P. (2016). LPA1 Mediates Antidepressant-Induced ERK1/2 Signaling and Protection from Oxidative Stress in Glial Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 359(2), 340–353. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.236455>
- Oliveira, T. G., Chan, R. B., Bravo, F. V., Miranda, A., Silva, R. R., Zhou, B., ... Sousa, N. (2016). The impact of chronic stress on the rat brain lipidome. *Molecular Psychiatry*, 21(1), 80–88. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.14>
- Orosa, B., González, A., Mera, A., Gómez-Reino, J. J., & Conde, C. (2012). Lysophosphatidic acid receptor 1 suppression sensitizes rheumatoid fibroblast-like synoviocytes to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Arthritis & Rheumatism*, 64(8), 2460–2470. <https://doi.org/10.1002/art.34443>
- Pagès, C., Simon, M. F., Valet, P., & Saulnier-Blache, J. S. (2001). Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 64(1–4), 1–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11324699>
- Påhlsson, P., Spitalnik, S. L., Spitalnik, P. F., Fantini, J., Rakotonirainy, O., Ghardashkhani, S., ... Larson, G. (2001). Characterization of Galactosyl Glycerolipids in the HT29 Human Colon Carcinoma Cell Line. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 396(2), 187–198. <https://doi.org/10.1006/ABBI.2001.2610>
- Patel, S., Kingsley, P. J., Mackie, K., Marnett, L. J., & Winder, D. G. (2009). Repeated Homotypic Stress Elevates 2-Arachidonoylglycerol Levels and Enhances Short-Term Endocannabinoid Signaling at Inhibitory Synapses in Basolateral Amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 34, 2699–2709. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.101>
- Pedraza, C., Sa, J., & Chun, J. (2014). Fear extinction and acute stress reactivity reveal a role of LPA 1 receptor in regulating emotional-like behaviors, 1659–1672. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0592-9>
- Peretó, J., López-García, P., & Moreira, D. (2004). Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(9), 469–477. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2004.07.002>
- Pilpel, Y., & Segal, M. (2006). The role of LPA1 in formation of synapses among cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, 97(5), 1379–1392. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03825.x>
- Pinto, V., Costa, J. C., Morgado, P., Mota, C., Miranda, A., Bravo, F. V., ... Sousa, N. (2015). Differential impact of chronic stress along the hippocampal dorsal–ventral

Referencias

- axis. *Brain Structure and Function*, 220(2), 1205–1212.
<https://doi.org/10.1007/s00429-014-0713-0>
- Piomelli, D., Astarita, G., & Rapaka, R. (2007). A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 743–754. <https://doi.org/10.1038/nrn2233>
- Porter, J. W., & Spurgeon, S. L. (1981). *Biosynthesis of isoprenoid compounds*. Wiley.
- Poulsen, L. la C., Siersbæk, M., & Mandrup, S. (2012). PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(6), 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.003>
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 635–700.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Rappley, I., Myers, D. S., Milne, S. B., Ivanova, P. T., LaVoie, M. J., Brown, H. A., & Selkoe, D. J. (2009). Lipidomic profiling in mouse brain reveals differences between ages and genders, with smaller changes associated with α -synuclein genotype. *Journal of Neurochemistry*, 111(1), 15–25.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06290.x>
- Resh, M. D. (2016). Fatty acylation of proteins: The long and the short of it. *Progress in Lipid Research*, 63, 120–131. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2016.05.002>
- Ricciarelli, R., Zingg, J.-M., & Azzi, A. (2001). Vitamin E: protective role of a Janus molecule. *The FASEB Journal*, 15(13), 2314–2325. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0258rev>
- Richmond, G. S., & Smith, T. K. (2011). Phospholipases A₁. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 588–612. <https://doi.org/10.3390/ijms12010588>
- Rivera, R., & Chun, J. (2006). Biological effects of lysophospholipids. In *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* (Vol. 160, pp. 25–46). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/112_0507
- Ruh, H., Sandhoff, R., Meyer, B., Gretz, N., & Hopf, C. (2013). Quantitative Characterization of Tissue Globotetraosylceramides in a Rat Model of Polycystic Kidney Disease by PrimaDrop Sample Preparation and Indirect High-Performance Thin Layer Chromatography–Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight–Mass Spectrometry with Automated Data Acquisition. *Analytical Chemistry*, 85(13), 6233–6240. <https://doi.org/10.1021/ac400931u>
- Russell, D. W. (2003). The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 137–174.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712>
- Saitoh, A., Yamada, M., Yamada, M., Kobayashi, S., Hirose, N., Honda, K., & Kamei, J. (2006). ROCK inhibition produces anxiety-related behaviors in mice. *Psychopharmacology*, 188(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0466-4>
- Sano, T., Baker, D., Virag, T., Wada, A., Yatomi, Y., Kobayashi, T., ... 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(24), 21197–21206.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M201289200>

Referencias

- Santin, L. J., Bilbao, A., Pedraza, C., Matas-Rico, E., López-Barroso, D., Castilla-Ortega, E., ... Estivill-Torrús, G. (2009). Behavioral phenotype of maLPA₁-null mice: increased anxiety-like behavior and spatial memory deficits. *Genes, Brain and Behavior*, 8(8), 772–784. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00524.x>
- Schick, M. J. (1987). Handbook of lipid research 4—the physical chemistry of lipids, by Donald M. Small, Plenum, New York, 1986, 672 pp. Price: \$89.50. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters*, 25(2), 86–87. <https://doi.org/10.1002/pol.1987.140250211>
- Sibille, E., Ph, D., Wang, Y., Joeyen-waldorf, J., Gaiteri, C., Surget, A., ... Lewis, D. A. (2009). A Molecular Signature of Depression in the Amygdala Copyright © 2009 American Psychiatric Association . All rights reserved . *Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes*, 2009(18), 1–14. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.08121760>
- Simon, M.-F., Chap, H., & Douste-Blazy, L. (1984). Platelet aggregating activity of lysophosphatidic acids is not related to their calcium ionophore properties. *FEBS Letters*, 166(1), 115–119. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80055-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80055-1)
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (n.d.). *Principles of instrumental analysis*.
- Snyder, A. P. (n.d.). *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Retrieved from <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Son, H.-H., Moon, J.-Y., Seo, H. S., Kim, H. H., Chung, B. C., & Choi, M. H. (2014). High-temperature GC-MS-based serum cholesterol signatures may reveal sex differences in vasospastic angina. *Journal of Lipid Research*, 55(1), 155–162. <https://doi.org/10.1194/jlr.D040790>
- Sonoda, H., Aoki, J., Hiramatsu, T., Ishida, M., Bandoh, K., Nagai, Y., ... Arai, H. (2002). A Novel Phosphatidic Acid-selective Phospholipase A₁ That Produces Lysophosphatidic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34254–34263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201659200>
- Sousa, N., & Almeida, O. F. X. (2012). Disconnection and reconnection: The morphological basis of (mal)adaptation to stress. *Trends in Neurosciences*, 35(12), 742–751. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.08.006>
- Sousa, N., Cerqueira, J. J., & Almeida, O. F. X. (2008). Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Research Reviews*, 57(2), 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.007>
- Stam, H., Schoonderwoerd, K., & Hülsmann, W. C. (1987). Synthesis, storage and degradation of myocardial triglycerides. *Basic Research in Cardiology*, 82 Suppl 1, 19–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3311005>
- Stefan, C., Jansen, S., & Bollen, M. (2005). NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(10), 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.08.005>
- Subbaiah, P. V., Albers, J. J., Chen, C. H., & Bagdade, J. D. (1980). Low density lipoprotein-activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Identity of lysolecithin acyltransferase and lecithin-cholesterol

Referencias

- acyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(19), 9275–9280. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7410425>
- Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y., Tokumura, A., & Hanahan, D. J. (1999). Occurrence of lysophosphatidic acid and its alkyl ether-linked analog in rat brain and comparison of their biological activities toward cultured neural cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1440(2–3), 194–204. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00127-4)
- Sumida, H., Noguchi, K., Kihara, Y., Abe, M., Yanagida, K., Hamano, F., ... Ishii, S. (2010). LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood*, 116(23), 5060–5070. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-272443>
- Tabata, K., Baba, K., Shiraishi, A., Ito, M., & Fujita, N. (2007a). The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), 861–866. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.063>
- Tabata, K., Baba, K., Shiraishi, A., Ito, M., & Fujita, N. (2007b). The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), 861–866. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.063>
- 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(5), 573–582. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10905618>
- Taguchi, R., & Ishikawa, M. (2010). Precise and global identification of phospholipid molecular species by an Orbitrap mass spectrometer and automated search engine Lipid Search. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 4229–4239. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.04.034>
- Taniguchi, N. (2002). *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*.
- Taverna, E., Götz, M., & Huttner, W. B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 465–502. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155801>
- Terranova, J. I., Ogawa, S. K., & Kitamura, T. (2019). Adult hippocampal neurogenesis for systems consolidation of memory. *Behavioural Brain Research*, 372, 112035. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112035>
- Thumser, A. E., Voysey, J. E., & Wilton, D. C. (1994). The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. *The Biochemical Journal*, 301 (Pt 3), 801–806. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8053904>
- Tigyi, G. (2010). Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *British Journal of Pharmacology*, 161(2), 241–270. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00815.x>
- Tokumura, A., Fukuzawa, K., Yamada, S., & Tsukatani, H. (1980). Stimulatory effect

Referencias

- of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregnant rats. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 245(1), 74–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6902643>
- Tokumura, A., Miyake, M., Yoshimoto, O., Shimizu, M., & Fukuzawa, K. (1998). Metal-ion stimulation and inhibition of lysophospholipase D which generates bioactive lysophosphatidic acid in rat plasma. *Lipids*, 33(10), 1009–1015. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832081>
- Tokumura, A., Nishioka, Y., Yoshimoto, O., Shinomiya, J., & Fukuzawa, K. (1999). Substrate specificity of lysophospholipase D which produces bioactive lysophosphatidic acids in rat plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1437(2), 235–245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10064906>
- Tokumura, Akira, Kanaya, Y., Kitahara, M., Miyake, M., Yoshioka, Y., & Fukuzawa, K. (2002). Increased formation of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in serum of hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Lipid Research*, 43(2), 307–315. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861673>
- Trim, P. J., & Snel, M. F. (2016). Small molecule MALDI MS imaging: Current technologies and future challenges. *Methods*, 104, 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.01.011>
- Tsai, M., & O'Malley, B. W. (1994). Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annual Review of Biochemistry*, 63(1), 451–486. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.002315>
- Uchida, H., Nagai, J., & Ueda, H. (2014). Lysophosphatidic acid and its receptors LPA1 and LPA3 mediate paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *Molecular Pain*, 10, 71. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-71>
- Ueda, H., Neyama, H., Nagai, J., Matsushita, Y., Tsukahara, T., & Tsukahara, R. (2018). Involvement of lysophosphatidic acid-induced astrocyte activation underlying the maintenance of partial sciatic nerve injury-induced neuropathic pain. *PAIN*, 159(11), 2170–2178. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001316>
- Ueda, H., Neyama, H., Sasaki, K., Miyama, C., & Iwamoto, R. (2018). Lysophosphatidic acid LPA1 and LPA3 receptors play roles in the maintenance of late tissue plasminogen activator-induced central poststroke pain in mice. *Neurobiology of Pain*. <https://doi.org/10.1016/J.YNPAL.2018.07.001>
- Umemura, K., Yamashita, N., Yu, X., Arima, K., Asada, T., Makifuchi, T., ... Kimura, H. (2006). *Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients*. *Neuroscience Letters* (Vol. 400). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.02.008>
- Umezū-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., ... 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(2), 227–233. <https://doi.org/10.1083/jcb.200204026>
- van Corven, E. J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T., & Moolenaar, W. H. (1989). Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*, 59(1), 45–54. Retrieved from

Referencias

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2551506>
- van der Bend, R. L., de Widt, J., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H., & van Blitterswijk, W. J. (1992). Metabolic conversion of the biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, in fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1125*(1), 110–112. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1567902>
- van Meeteren, L. A., Ruurs, P., Stortelers, C., Bouwman, P., van Rooijen, M. A., Pradere, J. P., ... Jonkers, J. (2006). Autotaxin, a Secreted Lysophospholipase D, Is Essential for Blood Vessel Formation during Development. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(13), 5015–5022. <https://doi.org/10.1128/MCB.02419-05>
- Vance, D. E., & Vance, J. E. (2002). *Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes*. Elsevier.
- Vancura, A., & Haldar, D. (1992). Regulation of mitochondrial and microsomal phospholipid synthesis by liver fatty acid-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(20), 14353–14359. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629224>
- Walker, T. L., Overall, R. W., Vogler, S., Sykes, A. M., Ruhwald, S., Lasse, D., ... Kempermann, G. (2016). Lysophosphatidic Acid Receptor Is a Functional Marker of Adult Hippocampal Precursor Cells. *Stem Cell Reports*, *6*(4), 552–565. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.03.002>
- Walsh, C. T. (2004). Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Modularity and Versatility. *Science*, *303*(5665), 1805–1810. <https://doi.org/10.1126/science.1094318>
- Wang, A., & Dennis, E. A. (1999). Mammalian lysophospholipases. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1439*(1), 1–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395961>
- Wang, M., Wang, C., Han, R. H., & Han, X. (2016). Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine. *Progress in Lipid Research*, *61*, 83–108. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.12.002>
- Watanabe, Y., Gould, E., & McEwen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*, *588*(2), 341–345. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91597-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91597-8)
- Watson, A. D. (2006). Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of Lipid Research*, *47*(10), 2101–2111. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600022-JLR200>
- Webb, T. E., Kaplan, M. G., & Barnard, E. A. (1996). Identification of 6H1 as a P2Y Purinoceptor: P2Y5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *219*(1), 105–110. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0189>
- Weiner, J. A., Hecht, J. H., & Chun, J. (1998). Lysophosphatidic acid receptor gene *vzg-1/lp(A)1/edg-2* is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *Journal of Comparative Neurology*, *398*(4), 587–598. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980907\)398:4<587::AID-CNE10>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980907)398:4<587::AID-CNE10>3.0.CO;2-5)

- Weiner, J. a., & Chun, J. (1999). Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 5233–5238. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5233>
- Wenk, M. R. (2005). Erratum: The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(7), 594–610. <https://doi.org/10.1038/nrd1776>
- Williams, J. R., Khandoga, A. L., Goyal, P., Fells, J. I., Perygin, D. H., Siess, W., ... Fujiwara, Y. (2009). Unique ligand selectivity of the GPR92/LPA5 lysophosphatidate receptor indicates role in human platelet activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 17304–17319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003194>
- Xiao, Z., Jaiswal, M. K., Deng, P.-Y., Matsui, T., Shin, H.-S., Porter, J. E., & Lei, S. (2012). Requirement of phospholipase C and protein kinase C in cholecystokinin-mediated facilitation of NMDA channel function and anxiety-like behavior. *Hippocampus*, 22(6), 1438–1450. <https://doi.org/10.1002/hipo.20984>
- Xu, K., Ma, L., Li, Y., Wang, F., Zheng, G., Sun, Z., ... Tian, X. (2015). Genetic and Functional Evidence Supports LPAR1 as a Susceptibility Gene for Hypertension. *Hypertension*, 641–646. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05515>
- Yanagida, K., Ishii, S., Hamano, F., Noguchi, K., & Shimizu, T. (2007). LPA₄/p2y₉/GPR23 Mediates Rho-dependent Morphological Changes in a Rat Neuronal Cell Line. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5814–5824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610767200>
- Yanagida, K., Masago, K., Nakanishi, H., Kihara, Y., Hamano, F., Tajima, Y., ... Ishii, S. (2009). Identification and Characterization of a Novel Lysophosphatidic Acid Receptor, p2y₅/LPA₆. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17731–17741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808506200>
- Yang, K., & Han, X. (2016). Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(11), 954–969. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.010>
- Ye, X. (2008). Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the reproductive system. *Human Reproduction Update*, 14(5), 519–536. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn023>
- Ye, Xiaoqin, Hama, K., Contos, J. J. A., Anliker, B., Inoue, A., Skinner, M. K., ... Chun, J. (2005). LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*, 435(7038), 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature03505>
- Yuan, X., Jin, M., Xu, X., Song, Y., Wu, C., Poo, M., & Duan, S. (2003). Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nature Cell Biology*, 5(1), 38–45. <https://doi.org/10.1038/ncb895>
- Yukiura, H., Hama, K., Nakanaga, K., Tanaka, M., Asaoka, Y., Okudaira, S., ... Aoki, J. (2011). Autotaxin Regulates Vascular Development via Multiple Lysophosphatidic Acid (LPA) Receptors in Zebrafish * □, 286(51), 43972–43983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301093>



Referencias

- Yung, Y. C., Stoddard, N. C., & Chun, J. (2014a). LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Lipid Research*, *55*(7), 1192–1214. <https://doi.org/10.1194/jlr.R046458>
- Yung, Y. C., Stoddard, N. C., & Chun, J. (2014b). LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Lipid Research*, *55*(7), 1192–1214. <https://doi.org/10.1194/jlr.R046458>
- Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Mirendil, H., & Chun, J. (2015). Lysophosphatidic Acid Signaling in the Nervous System. *Neuron*, *85*(4), 669–682. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.009>
- Zanfini, A., Dreassi, E., Berardi, A., Piomboni, P., Costantino-Ceccarini, E., & Luddi, A. (2014). GC-EI-MS Analysis of Fatty Acid Composition in Brain and Serum of Twitcher Mouse. *Lipids*, *49*(11), 1115–1125. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3945-0>
- Zheng, Y., Kong, Y., & Goetzl, E. J. (2001). Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *166*(4), 2317–2322. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160288>

AGRADECIMIENTOS





Después de todo el tiempo y el esfuerzo por desarrollar esta tesis doctoral me siento muy satisfecha por llegar y dar por finalizada esta etapa de mi vida. Han sido tiempos difíciles en los que me ha tocado madurar y aprender no solo profesionalmente sino que personalmente también.

Muchísimas personas me han ayudado en esta etapa y me siento muy afortunada por todos aquellas que han contribuido, que han criticado de forma constructiva y aportado para que pueda conseguir finalizar este estudio, que sin lugar a duda, siempre ha sido un sueño poder llegar hasta aquí.

Quiero empezar agradeciendo a mis directoras Carmen Pedraza y Marga Pérez por brindarme la oportunidad de formar parte de este grupo en el que me he sentido muy acogida por todos los miembros. A Carmen por introducirme en el mundo de la psicobiología y a ti Marga por introducirme en la neurogénesis y por todos los ánimos recibidos. A Luis por todos los debates que surgen de manera espontánea (de los que siempre se aprende algo nuevo) y por estar ahí, gracias de corazón. Y a Guillermo Estivill por su colaboración.

En cuanto a mis compañeros, gracias por estar ahí, por todos los momentos que hemos compartidos, por todas las risas y por hacer amena la hora de la comida. Empezaré por Román, gracias por estar ahí siempre, resolverme todas las dudas y echarme una mano en todo durante tu tiempo en el laboratorio. A ti Emma por todos los momentos y por permitirme formar parte de tu vida no solo como amiga sino como un familiar más. A Cristina por todos tus consejos y tus buenas palabras que siempre salen de un buen corazón como el tuyo, ha sido genial conocerte y tenerte como amiga. A ti Andrea, siempre dispuesta a colaborar (que risas nos echamos), me encanta tenerte como compañera y amiga también. A Patri por su sonrisa a todas horas y la paz que siempre

transmite. Fabiola por ser un sol y una compañera con mucho talento. David has sido un compañero ejemplar y aunque no hemos trabajado codo a codo no me cabe duda lo altamente profesional que eres, gracias por todo tu apoyo. Sara gil, Mari Carmen y Estela, gracias por los momentos compartidos, aunque me hubiera gustado que hubiéramos coincidido más. Y a Fran, por su colaboración y apoyo desde el comienzo de esta tesis. Por último, a ti Patricia Chaves por estar ahí en mis comienzos con el campo de la neurogénesis, ha sido todo un placer compartir horas de inmundos contigo.

A todo el personal del SCAI que he tenido el placer de conocer y trabajar cerca sobre todo a ti Carolina Lobo, gracias por tu cercanía, apoyo y colaboración en todo.

A Tiago Oliveira Gil y su grupo de la escuela de Medicina de la universidad de Miño de Portugal, por su acogida y sus críticas constructivas que me han ayudado avanzar en esta tesis doctoral.

También quiero agradecer a Mercedes, Araceli, Carlos y a todos los profesores del departamento que me han ayudado a mejorar en mi perfil como docente.

A María por ser mi hermana malagueña y por estar ahí siempre. A Mouna por todas nuestras quedadas y todos los buenos momentos que hemos tenido durante el desarrollo de esta tesis.

A mis amigos desde la infancia porque a pesar de la distancia siempre han estado y me han motivado para seguir adelante y a la realización de este sueño. A ti Sumaya, que eres más que una hermana, por todos lo que hemos vivido y por siempre dar todo lo que está en tus manos con tal de ayudar, no hay gracias suficientes para ti. Ana que a pesar de que estés en tierras muy lejanass no han faltado las llamadas semanales, a Sandra por estar siempre dispuesta. Por último, a ti Jenny por tu apoyo, disponibilidad, demostrarme que no existen grandes distancias y por nuestra amistad de calidad.

A mis padres por entender que este es mi mundo desde muy pequeña y a mis sobrinos por todo el amor que recibo de ellos, que a pesar de la distancia siempre me tienen presentes.

Por último, a ti mi mejor amigo y mi marido por entender desde un principio que se trata de un sueño y hacer todo lo posible con tal de verme llegar a mi meta. Gracias por empujarme hacia adelante cuando sentía que no podía más y por recordarme siempre que esto lo llevo en la sangre y que es mi pasión. Gracias por todo tu apoyo, por aceptar todos los momentos que no he podido estar contigo, que esta etapa fue una prioridad porque era un sueño llevarlo a cabo. Sobre todo, gracias por estar ahí, por creerme en mí siempre y por la hija que espero que muy pronto esté en nuestros brazos. Gracias Amor por ser tú y quererme como lo haces.