

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**IMPLICACIONES DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN  
CELULAR NEURAL EN LOS EFECTOS DEL ESTRÉS EN  
PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA EN LA  
RATA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR José Joaquín Merino Martín**

Bajo la dirección de la Doctora:  
Carmen Sandi

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-1705-5**

---

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**IMPLICACIONES DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN**

**CELULAR NEURAL EN LOS EFECTOS DEL ESTRÉS EN**

**PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA EN LA RATA**

**TESIS DOCTORAL**

**JOSÉ JOAQUÍN MERINO MARTÍN**

---

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**IMPLICACIONES DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN**

**CELULAR NEURAL EN LOS EFECTOS DEL ESTRÉS EN**

**PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA EN LA RATA**

DIRECTOR: Dra. Carmen Sandi

TUTOR: Dr. Federico Morán

MEMORIA

Que para optar al grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

presenta

**JOSÉ JOAQUÍN MERINO MARTÍN**

Madrid, 2001

---

## ABREVIATURAS

<b>GRE:</b> Elementos de respuesta a glucocorticoides	<b>PST:</b> Polisialiltransferasas
<b>11<math>\beta</math>HSD:</b> 11 $\beta$ Hidroxilasa.	<b>PST-1</b> Polisialiltransferasa I
<b>i.c.v.:</b> intracerebroventricular	<b>r.p.m.:</b> revoluciones por minuto
<b>Ig G:</b> Inmunoglobulina G	<b>Ref:</b> Referencia
<b>A:</b> adrenalina	<b>Ig M:</b> Inmunoglobulina M
<b>AA:</b> ácido araquidónico.	<b>IP<sub>3</sub>:</b> Fosfatidilinositoltrifosfato.
<b>Radioinmunoensayo</b>	<b>RIA:</b>
<b>FGFR:</b> receptor del factor de crecimiento de fibroblastos	<b>L1</b> Antígeno L1 <b>s.c.:</b> subcutánea
	<b>LAM:</b> laberinto acuático de Morris
	<b>Veh:</b> vehículo
	<b>M:</b> Molar <b>vs:</b> versus
<b>ACTH:</b> Hormona adrenocorticotropa	<b>Man:</b> manosa
<b>Aldo:</b> Aldosterona.	<b>Met:</b> Metirapona
<b>ANOVA:</b> Análisis de la Varianza min: minutos	<b>mg:</b> miligramo
<b>Asn:</b> asparragina	<b>mM:</b> miliMolar
<b>ATP:</b> Adenosin trifosfato	<b>MR:</b> Receptor de mineralocorticoides
<b>BSA:</b> Albúmica sérica bovina	<b>mRNA:</b> RNA mensajero
<b>BDNF=</b> Factor neurotrófico derivado de cerebro	<b>NA:</b> noradrenalina
<b>CAMs:</b> moléculas de adhesión celular neural	<b>NCAM:</b> Molécula de Adhesión celular neural
<b>CBG:</b> Transcortina o globulina ligante de corticosterona	<b>ng:</b> nanogramos
<b>CMC:</b> Condicionamiento del miedo al contexto	<b>NGS:</b> Suero normal de cabra
<b>CNM:</b> control no manipulado	<b>nM:</b> nanomolar
<b>Cort:</b> Corticosterona	<b>NMDA:</b> N-metil-D-Aspartato.
<b>CRH:</b> Factor liberador de corticotropina	<b>NT 4/5:</b> Neurotrofina 4/5
<b>DAG Lipasa:</b> Diacil glicerol lipas	<b>NOS:</b> sintasa del óxido nítrico
<b>DAG:</b> Diacilglicerol	<b>p/v:</b> peso/ volumen
<b>Endo N:</b> Endoneuraminidasa N	<b>PBS:</b> tampón fosfato salino
<b>FAS:</b> Síndrome alcohólico fetal	<b>PKA:</b> proteína quinasa A
<b>GFAP:</b> proteína fibrilar glial	<b>PKC:</b> proteína quinasa C
<b>Glu:</b> glucosa	<b>PLC g:</b> Fosfolipasa C $\gamma$
<b>GPI:</b> glicosilfosfatidilinositol	<b>PSA:</b> Ácido polisiálico
<b>GR:</b> Receptor de glucocorticoides	<b>PSA-NCAM:</b> Forma polisializada de NCAM

---

## A mis padres y hermanas

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Carmen Sandi la acogida en su grupo de trabajo, así como la dedicación y la ayuda prestada en el desarrollo de la Tesis. También quisiera agradecer al profesor Dr. Ciaran Regan, la oportunidad que me dio de trabajar en su laboratorio del Centro de Biotecnología de *University College Dublin* (Irlanda), donde estudié la polisialización de NCAM en el hipocampo, gracias a una estancia corta del Ministerio de Educación y Ciencia (actual Ministerio de Ciencia y Tecnología)

También, agradezco a la profesora Dra. E. Bock, del Instituto de Patología Molecular en Dinamarca, la generosa donación de los anticuerpos policlonales para NCAM, y a la profesora Dra G. Rougon del INSERM la desinteresada donación del monoclonal de PSA-NCAM.

Por otro lado, también quisiera expresar mi agradecimiento a los investigadores Dr. Alberto Ferrús, Dra. Carmen Guaza y Dr. José Borrel del grupo de Plasticidad Neural del Instituto Cajal del *C.S.I.C.*

También agradezco a todos mis compañeros de nuestro grupo de trabajo la ayuda prestada, así como a todos los becarios, técnicos y profesores del Dpto. de Psicobiología de la UNED, y a las secretarías Ana y Mela. También a mis compañeros de Doctorado, con los que coincidí en los cursos de Doctorado del programa de Bioquímica y Biología Molecular, especialmente a Raquel Torres. Así mismo, quisiera agradecer la hospitalidad mostrada por todos los becarios del profesor Dr. Regan en Dublín, entre ellos Sean Mulvany, y muy especialmente a sus postdoctorales Dra. Helen C. Gallagher y Dr. Keith Murphy, que me ayudaron a adaptarme mejor a la cultura irlandesa.

Por último, agradezco la ayuda mostrada por los profesores Dr. Antonio Tormo y Dra. F. Mata, y sobre todo por mi tutor de Tesis, Dr. Federico Morán, en todos los trámites burocráticos relativos al Doctorado y a la lectura de la Tesis en el Dpto de Bioquímica y Biología Molecular I, así como a la Dra. Ana Martínez por las interesantes sugerencias propuestas en el examen de Prelectura de Tesis.

También agradezco a Alberto Marcos, Juan Martínez y Luis Verdugo su ayuda en materia informática. Por último, agradezco a mis amigos, con los que estudié en el Instituto en Aranjuez y más tarde en la Complutense, el ánimo e interés mostrado por mis "historias" con las ratas. Entre ellos,

---

Fernando Valladares, Elena de la Vega, Fernando Doral, Alberto Martín, Alfredo, Escuderos, Julio, Julian, Enrique Torrijos, y Pedro Arévalo. También, me gustaría dar las gracias especialmente a María José Simón del Dpto. de Nutrición por sus ánimos.

---

# **ÍNDICE GENERAL**

---

<b>1.1. INTRODUCCIÓN A LOS ESTUDIOS NEUROBIOLÓGICOS DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....</b>	<b>21</b>
• Fases de la memoria.....	21
• Consolidación de la memoria.....	22
1.2. Modelos de aprendizaje en paradigmas conductuales de aprendizaje y memoria.....	22
• Modelo de condicionamiento del miedo al contexto. ....	23
• Modelo del laberinto acuático de Morris.....	24
• Modelo de evitación pasiva.....	24
1.3. Áreas del lóbulo temporal medial implicadas en procesos de aprendizaje y memoria.....	25
• Papel del hipocampo en procesos de aprendizaje y memoria.....	25
• Implicaciones de la amígdala en la formación de la memoria.....	26
1.4. Memoria y plasticidad neural.....	27
• Modelo de la LTP (Potenciación a largo plazo).....	27
• Mecanismos celulares implicados en los procesos de aprendizaje y memoria.....	28
<b>1.5. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL.....</b>	<b>28</b>
1.5.1. Clasificación de las moléculas de adhesión celular neural.....	28
1.5.2. Molécula de adhesión celular neural, NCAM.....	29
1.5.2.1. Regulación de la expresión génica NCAM.....	29



---

1.5.2.2. Estructura molecular de NCAM y de sus isoformas.....	30
1.5.2.2.1. Estructura y función de los diferentes dominios estructurales de NCAM.....	31
1.5.3. Estructura molecular de L1.....	33
1.5.4. Modificaciones post-traduccionales de las moléculas de adhesión celular neural.....	35
1.5.4.1. Modificaciones post-traduccionales de NCAM.....	35
1.5.4.1.1. Polisialización de NCAM.....	35
• Características estructurales del ácido polisiálico en la célula.....	36
• Síntesis de ácido polisiálico.....	37
• Localización y distribución de las polisialiltransferasas en el sistema nervioso.....	37
• Regulación del estado de polisialización de NCAM.....	38
1.5.4.1.2. Fucosilación.....	39
1.5.4.2. Modificaciones postrasnlacionales de L1.....	19
1.5.5. Localización y distribución de las moléculas de adhesión celular neural de la familia de las superinmunoglobulinas en el sistema nervioso.....	39
• Localización y distribución de NCAM en el sistema nervioso.....	40
• Localización y distribución de PSA-NCAM.....	41
• Localización y distribución de L1.....	43
1.5.6. Mecanismos de señalización celular mediados por NCAM y L1.....	44
1.5.7. Funciones de las CAMs en el sistema nervioso.....	47

---

1.5.7.1. Función de adhesión y de reconocimiento celular.....	47
1.5.7.1.1. PSA-NCAM como modulador de la adhesión celular.....	50
1.5.7.2. Papel de las CAMs en los procesos de crecimiento neuronal.....	52
1.5.8. Papel de las CAMs en procesos de plasticidad sináptica.....	53
• Papel de las CAMs en el remodelamiento sináptico.....	54
• Implicación de las CAMs en la LTP.....	55
1.5.9. Implicación de las CAMs en los procesos de aprendizaje y memoria.....	56
• NCAM.....	56
• PSA-NCAM.....	56
• L1.....	57
<b>1.6. Fisiopatología asociada a la expresión alterada de las CAMs</b>	
<b>en el sistema nervioso.....</b>	<b>58</b>
• Fisiopatología relacionada con la expresión de NCAM.....	58
• Fisiopatología relacionada con la expresión de L1.....	59
<b>1.7. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS.....</b>	<b>59</b>
1.7.1. Sistema nervioso autónomo.....	59
1.7.2. Eje hipotalámico - hipofisario-adrenal.....	60
1.7.3. Los glucocorticoides.....	62
1.7.3.1. Receptores de glucocorticoides.....	62
1.7.3.2. Mecanismo de acción de los glucocorticoides.....	63
• Acciones genómicas.....	64
• Acciones no genómicas.....	65

---

<b>1.8. ESTRÉS Y MEMORIA.....</b>	<b>65</b>
1.8.1. Sistemas adrenérgico y noradenérgico.....	66
1.8.2. Glucocorticoides: plasticidad sináptica y memoria.....	66
1.8.3. Efectos del estrés y de los glucocorticoides sobre la expresión de moléculas de adhesión celular neural en procesos de aprendizaje y memoria.....	67
1.8.4. Efectos neurales del estrés crónico y mecanismos implicados.....	68
1.8.5. Implicaciones del estrés crónico en paradigmas conductuales de aprendizaje y memoria.....	69
1.8.6. Efectos del estrés crónico sobre la expresión de moléculas de adhesión celular neural en el hipocampo.....	70
<b>2. PLANTEAMIENTOS y OBJETIVOS.....</b>	<b>72</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
<b>3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....</b>	<b>76</b>
<b>3.2. PROCEDIMIENTOS BIOQUÍMICOS.....</b>	<b>77</b>
3.2.1. Procedimiento de disección de las diferentes regiones cerebrales.....	77
3.2.2. Proceso de obtención de sinaptosomas por centrifugación diferencial.....	78
3.2.3. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.....	81
3.2.4. Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona mediante radioinmunoensayo.....	82
3.2.5. Determinación de los niveles de moléculas de adhesión celular mediante la técnica de ELISA.....	84
3.2.5.1. Fundamento de la Técnica de ELISA.....	84

---

3.2.5.2. 1. Características de los anticuerpos empleados para la determinación de moléculas de adhesión celular mediante la técnica de ELISA, y ensayos de trititación de los anticuerpos:.....	85
3.2.5.2.1. Anticuerpos primarios:.....	86
• Anticuerpo policlonal dirigido contra NCAM.....	86
• Anticuerpo monoclonal contra la forma polisializada de NCAM.....	86
• Anticuerpo monoclonal contra L1.....	86
3.2.5.2.2 Anticuerpos secundarios:.....	87
• Anticuerpo secundario Anti conejo Ig G conjugado con peroxidasa.....	87
• Anticuerpo secundario Anti rata Ig G-OPD Fragmento Fab.....	87
• Anticuerpo secundario Ig M.....	87
3.2.5.3. Ensayos de trititación de los anticuerpos para moléculas de adhesión celular neural.....	87
• Trititación de la molécula de adhesión celular neural.....	88
• Trititación de la forma polisializada de NCAM, PSA-NCAM.....	89
• Trititación de la molécula de adhesión celular neural L1.....	91
3.2.6. Western blot o inmunoblots de las diferentes moléculas de adhesión celular.....	92



---

<b>3.3. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS CON LA DROGA INHIBIDORA DE LA SÍNTESIS DE CORTICOSTERONA METIRAPONA.....</b>	<b>108</b>
• Preparación e inyección de la metirapona.....	109
• Preparación del vehículo.....	109
<b>3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....</b>	<b>109</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>110</b>
<b>4.1. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL INDUCIDA POR EL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL CONTEXTO.....</b>	<b>111</b>
4.1.1. Efectos del condicionamiento del miedo al contexto evaluados 24 horas después del entrenamiento.....	111
4.1.1.1. Efectos conductuales.....	111
4.1.1.2. Niveles de corticosterona plasmática.....	113
4.1.1.3. Expresión de las distintas CAMs en diversas regiones cerebrales.....	114
4.1.1.3.1. Hipocampo:.....	114
• Expresión de NCAM.....	114
• Expresión de PSA-NCAM.....	115
• Expresión de L1.....	116
4.1.1.3.2. Corteza frontal:.....	118
• Expresión de NCAM.....	118
• Expresión de PSA-NCAM.....	119

---

4.1.1.3.3. Estriado:.....	120
• Expresión de NCAM.....	120
• Expresión de PSA-NCAM.....	121
4.1.1.3.4. Hipotálamo:.....	122
• Expresión de NCAM.....	122
• Expresión de PSA-NCAM.....	123
4.1.2. Efectos del condicionamiento del miedo al contexto evaluados 24 horas después del entrenamiento.....	124
4.1.2.1. Efectos conductuales.....	124
4.1.2.2. Niveles plasmáticos de corticosterona.....	125
4.1.2.3. Expresión de las distintas CAMs en diversas regiones cerebrales.....	126
4.1.2.3.1. Hipocampo:.....	127
• Expresión de NCAM.....	128
• Expresión de PSA-NCAM.....	102
• Expresión de L1.....	129
4.1.2.3.2. Amígdala:.....	130
• Expresión de NCAM.....	130
• Expresión de PSA-NCAM.....	131

---

4.1.2.3.3. Corteza frontal:.....	132
• Expresión de NCAM.....	132
• Expresión de PSA-NCAM.....	133
4.1.2.3.4. Estriado:.....	134
• Expresión de NCAM.....	134
• Expresión de PSA-NCAM.....	135
4.1.2.3.5. Hipotálamo:.....	135
• Expresión de NCAM.....	135
• Expresión de PSA-NCAM.....	136
<b>4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA CORTICOSTERONA EN LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN HIPOCAMPAL DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL, Y SU POLISIALIZACIÓN, INDUCIDA POR EL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL CONTEXTO</b> .....	<b>137</b>
4.2.1. Efectos de la metirapona en las acciones inducidas por el condicionamiento del miedo al contexto evaluados 12 horas después del entrenamiento.....	138
4.2.1.1. Efectos conductuales.....	138
4.2.1.2. Niveles plasmáticos de corticosterona.....	139
4.2.1.3. Expresión de las distintas CAMs en el hipocampo:.....	140
• Expresión de NCAM.....	141
• Expresión de PSA-NCAM.....	141



---

**4.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA PROFUNDIZAR EN LOS EFECTOS DEL  
CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL CONTEXTO EN LA POLISIALIZACIÓN DE  
NCAM EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO.....144**

4.3.1. Efectos del condicionamiento del miedo al contexto evaluados 12 horas después del  
entrenamiento.....144

4.3.1.1. Efectos conductuales.....145

4.3.1.2. Efectos en la polisialización de NCAM en el giro dentado.....146

**4.4. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO EN EL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL  
CONTEXTO EN LA MEMORIA PARA OTRO TIPO DE PROCESAMIENTO DE LA  
INFORMACIÓN EN RATAS ENTRENADAS EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE  
MORRIS.....150**

• Protocolo experimental.....150

4.4.1. Efectos conductuales.....151

4.4.1.1. Efectos conductuales en la fase de retención del condicionamiento del miedo al  
contexto.....151

4.4.1.2. Efectos conductuales en test del laberinto acuático de Morris.....152

4.4.1.2.1. Test de transferencia .....152

4.4.1.2.2. Curva de reaprendizaje de las ratas entrenadas en el laberinto  
acuático de Morris.....155

---

**4.5. EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO EN EL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL CONTEXTO Y EN LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL. ....159**

4.5.1. Efectos del estrés crónico sobre las variables de peso corporal y peso relativo del timo.....159

4.5.2. Efectos del estrés crónico sobre el condicionamiento del miedo al contexto.....161

4.5.3. Efectos del estrés crónico y del condicionamiento del miedo al contexto sobre los niveles plasmáticos de corticosterona.....162

4.5.4. Efectos del estrés crónico y del condicionamiento del miedo al contexto sobre la expresión de las moléculas de adhesión celular neural en diversas regiones cerebrales.....164

4.5.4.1. Hipocampo:.....164

- Expresión de NCAM.....165
- Expresión de PSA-NCAM.....165
- Expresión de L1.....167

4.5.4.2. Amígdala:.....168

- Expresión de NCAM.....169
- Expresión de PSA-NCAM.....170
- Expresión de L1.....171

4.5.4.3. Corteza frontal:.....171

- Expresión de NCAM.....171
- Expresión de PSA-NCAM.....172

---

4.5.4.4. Estriado:.....	174
• Expresión de NCAM.....	174
• Expresión de PSA-NCAM.....	175
• Expresión de L1.....	176
4.1.2.3. . Hipotálamo:.....	177
• Expresión de NCAM.....	177
• Expresión de PSA-NCAM.....	179
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
<b>5.1. EFECTOS DEL ESTRÉS INTRÍNSECO LIGADO A LA TAREA DE APRENDIZAJE SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL EN EL SISTEMA NERVIOSO.....</b>	<b>152</b>
5.1.1. Modulación de la expresión de moléculas de adhesión celular en el hipocampo.....	153
5.1.2. Expresión de la molécula de adhesión celular neural, y de su forma polisializada, en otras regiones cerebrales (amígdala, corteza frontal, estriado e hipotálamo) 12 y 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el CMC.....	157
5.1.3. Mecanismos implicados en la reducción en la expresión de NCAM observada en diferentes regiones cerebrales.....	159
5.1.4. Papel de los glucocorticoides.....	161
5.1.4.1. Efecto de la metirapona sobre la modulación hipocampal de CAMs inducida por el condicionamiento del miedo al contexto.....	163

---

<b>5.2. ESTRÉS CRÓNICO</b> .....	165
5.2.1. Efectos del estrés crónico sobre distintos parámetros fisiológicos.....	165
5.2.2. Efectos del estrés crónico en el condicionamiento del miedo al contexto.....	166
5.2.3. Expresión de moléculas de adhesión celular neural en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el modelo del CMC en diversas regiones cerebrales.....	167
5.2.3.1. Hipocamp.....	167
5.2.3.2. Amígdala. ....	170
5.2.3.3. Corteza frontal.....	170
5.2.3.4. Estriado.....	172
5.2.3.5. Hipotálamo.....	173
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	175
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	178

---

# **1. INTRODUCCIÓN**

---

- **1.1. INTRODUCCIÓN A LOS ESTUDIOS NEUROBIOLÓGICOS DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA**

La memoria es una función cognitiva gracias a la cual mantenemos los conocimientos adquiridos que pueden recordarse posteriormente. El aprendizaje es un proceso continuo, en el que intervienen factores internos y externos, que consiste en la adquisición de conocimientos que permiten al individuo adaptarse mejor al medio ambiente (Klauer y cols, 2000). Por tanto, ambos procesos (aprendizaje y memoria) están estrechamente interrelacionados, ya que para que se produzca memoria debe haberse aprendido previamente la información.

Para entender ambos conceptos, también es necesario definir el concepto de plasticidad sináptica, que fue introducido por Hebb (1949), y que se define como la capacidad de que se produzcan cambios plásticos en las sinapsis (reemplazadas, decrecidas o incrementadas) ante determinados estímulos ambientales (Hebb, 1976).

Por otra parte, los mecanismos cerebrales implicados en la organización de las funciones cognitivas, incluidos los procesos de aprendizaje y memoria, son procesos dinámicos y complejos, que implican cambios en el patrón de conectividad sináptica (Wood y cols, 2001). Por tanto, existe un cierto consenso en considerar que las memorias se almacenan como consecuencia de cambios en los patrones de actividad neural en las sinapsis (Fletcher y cols, 1996). De especial relevancia en el contexto de esta Tesis, son los hallazgos que indican que diversos factores, entre los que destaca la carga emocional de la información y la experiencia previa, determinarán la fuerza con la que la información es adquirida y consolidada a largo plazo (McGaugh y Cahil, 1997; Cahil y cols, 2001). Así, se ha propuesto que la fuerza con la que la información es almacenada será mayor en situaciones que lleven implícito un fuerte componente emocional (Cahil y McGaugh, 1996; Sandi, 1998).

- **Fases de la memoria**

A grandes rasgos, se distinguen tres fases de la memoria, que se denominan memoria a corto plazo, memoria intermedia o a medio plazo, y memoria a largo plazo. La memoria a corto plazo, es lábil y retiene la información de manera temporal, mientras que la memoria intermedia, retiene la

---

información horas después del aprendizaje, siendo la memoria a largo plazo mucho más estable, y persistente (Izquierdo y cols, 1999; Medina y cols, 1999). No obstante, y a pesar de las controversias existentes sobre la interacción secuencial y consecutiva de las tres fases, se podría concluir a “*grosso modo*” que cualquier información que se almacene a largo plazo, debe almacenarse previamente a corto y medio plazo antes (Squire y cols, 1993; Zola-Morgan y Squire, 1993).

- **Consolidación de la memoria**

El concepto de consolidación es clave para entender los procesos de formación de la memoria a largo plazo (Nader y cols, 2000). Hace referencia a los procesos neurobiológicos que se producen desde el momento en que se inicia el aprendizaje hasta que la información se establece en un almacén persistente de información (Cahill y McGaugh, 1996; Eichenbaum, 1997). Se considera que la estabilización de los circuitos neurales que median determinados tipos de memoria es un proceso relativamente lento, y quizás, susceptible de ser modificado en función de la vulnerabilidad con la que se aprendió la información (McGaugh 1999, 2000b).

De hecho, se sabe que en los primeros minutos posteriores a la situación de aprendizaje, la memoria es más susceptible de ser interferida mediante tratamientos farmacológicos (McGaugh, 1989; McGaugh y Izquierdo, 2000a). Así, una gran variedad de agentes, de acción central y periférica, pueden modular la formación de la memoria en una fase post-entrenamiento, entre los que destacan la  $\beta$ -endorfina (Riga y cols, 1986), los glucocorticoides (Castellano y Pluglisi-Allegra, 1983), ACTH, adrenalina y noradrenalina (Cahill y McGaugh, 1996) y la serotonina (Kruglikov y cols, 1991) entre otras moléculas.

## **1.2. Modelos de aprendizaje en paradigmas conductuales de aprendizaje y memoria**

El estudio de los mecanismos neurales implicados en la formación de la memoria se ha evaluado en animales, utilizando diferentes paradigmas conductuales *in vivo*. En invertebrados, se han estudiado como modelo de aprendizaje y memoria, diversos procesos conductuales asociados a la retirada de la branquia del molusco *Aplysia californica* (Carew y Sahley, 1986), y que se ha utilizado para el estudio

---

de los cambios sinápticos que acontecen durante la memoria a corto y a largo plazo (Bailey y cols, 1992). Otro modelo muy utilizado en invertebrados es la capacidad que presenta *Drosophila melanogaster* para discriminar olores, y adquirir aprendizajes de tipo asociativo (Dudai y cols, 1976; Tully y cols, 1994). En vertebrados, los modelos conductuales utilizados son más complejos. A continuación, se describen, fundamentalmente, los más utilizados en roedores con relevancia para el presente trabajo.

- **Modelo de condicionamiento del miedo al contexto**

Este paradigma conductual ha sido ampliamente utilizado en esta Tesis. El condicionamiento del miedo al contexto constituye uno de los modelos animales más representativos en el estudio de la función hipocampal (LeDoux, 2000). Se basa en el condicionamiento clásico desarrollado por Pavlov en 1927, en el que si un estímulo condicionado neutro se presenta junto con un estímulo incondicionado, el estímulo neutro adquiere características de estímulo incondicionado (incluso en ausencia del estímulo neutro) una vez se ha producido el condicionamiento. Es decir, cuando se establece el condicionamiento del miedo (apareamiento de estímulo condicionado e incondicionado), el estímulo neutro (estímulo condicionado) es capaz de inducir respuestas condicionadas de tipo fisiológico y conductual, que normalmente se producirían en presencia del estímulo.

Por tanto, el condicionamiento del miedo consiste en la asociación de un estímulo incondicionado específico (descargas eléctricas) que produce miedo en el animal, junto con un estímulo neutro (contexto); de tal manera que una vez que el animal adquiere el condicionamiento en la fase de entrenamiento, cuando sea reexpuesto al contexto en que fue entrenado (sin estímulo incondicionado, es decir, sin recibir descargas eléctricas) el estímulo neutro (contexto), por si solo es capaz de generar la misma respuesta de miedo que generaría el estímulo incondicionado, adquiriendo la propiedad de un estímulo condicionado. En este caso, se produce una respuesta típica de congelamiento o de inmovilidad conductual, y que consiste en la inmovilización general del cuerpo, exceptuando los movimientos necesarios para la respiración (Fanselow, 1980; Rudy, 1993). Además, se producen una serie de respuestas autonómicas condicionadas como el aumento de la tasa cardiaca, y la activación del eje HHA, entre otras (LeDoux, 2000).



---

- **Aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris**

Este paradigma conductual, que constituye un test de aprendizaje espacial dependiente de hipocampo, es muy utilizado para el estudio de las bases neurobiológicas de la memoria (Morris y cols, 1982). Se trata de un test en el que las ratas tienen que aprender a encontrar una plataforma sumergida cuando se las introduce en una piscina circular de determinadas dimensiones (ver apartado 3.3.3.1 de materiales y métodos).

En dicho test cuando los animales se introducen en la piscina tienen que aprender a orientarse mediante claves espaciales, que se localizan en el entorno de la misma. En cada experimento, se incluyen normalmente varios ensayos, distribuidos en distintas sesiones de aprendizaje, y que a menudo se suelen realizar en días consecutivos. En nuestros estudios, el parámetro conductual a evaluar fue la latencia -o tiempo que tardan las ratas en encontrar la plataforma-, a lo largo de los diferentes ensayos de cada sesión. Así, en el entrenamiento se observa una curva progresiva de aprendizaje, que se caracteriza por latencias progresivamente menores (D'Hooge y Deyn, 2001).

- **Modelo de evitación pasiva**

El modelo de evitación pasiva suele realizarse colocando a los animales sobre una plataforma iluminada que da acceso a un compartimento cerrado y oscuro. Dada la natural preferencia de la rata por la oscuridad, cruza rápidamente al compartimento oscuro. En dicho momento, se cierra la puerta entre ambos compartimentos, y la rata recibe un choque eléctrico de intensidad variable (estímulo incondicionado). En el futuro (test de retención), los animales tardarán más tiempo en entrar en el compartimento oscuro (latencia). Se considera, por tanto, la latencia a entrar en dicho compartimento como índice de la memoria adquirida.

---

### **1.3. Áreas del lóbulo temporal medial implicadas en procesos de aprendizaje y memoria**

El lóbulo temporal medial está constituido por varias regiones entre las que destacan la formación hipocampal y la amígdala (Squire y Zola-Morgan, 1991, 1996), que han sido implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria (Alvarez y Squire, 1994). A continuación, se describen someramente las implicaciones del hipocampo y de la amígdala en la neurobiología de la memoria, haciendo especial hincapié en su participación en el paradigma conductual del condicionamiento del miedo al contexto.

- **Papel del hipocampo en procesos de aprendizaje y memoria**

Existe bastante controversia en la literatura sobre la función del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria (Eichenbaum, 1999; Anagnostaras y cols, 2001). Algunos autores consideran que el hipocampo constituye un almacén transitorio en la formación de la memoria (Eichenbaum y cols, 1996). Aunque participa, junto con otras áreas cerebrales, tanto en el almacenamiento como la recuperación de la memoria, una vez ha tenido lugar la consolidación de la memoria y con el paso del tiempo, la información puede ser recuperada mediante la participación de circuitos sensoriales y corticales, sin que se requiera la participación del hipocampo (Tulving y Markowitsch, 1997).

Mediante estudios de lesiones en ratas, se ha puesto de manifiesto que el hipocampo desempeña un papel importante tanto en la representación espacial de contextos (Winocur y cols, 1987; Penick y Solomon, 1991; Maren y Holt, 2000) -desempeñando un papel importante en el test de condicionamiento del miedo al contexto (Rudy y O'Reilly, 1999), como de mapas cognitivos (Shapiro y Eichenbaum, 1999). Además, también puede sustentar el procesamiento de información de carácter no espacial (Wallenstein y cols, 1999) y de tipo semántico (Lepage y cols, 2000).

Se ha visto que lesiones en el hipocampo de rata, previas al entrenamiento en el modelo de condicionamiento del miedo, impiden dicho condicionamiento cuando el estímulo condicionado es el contexto (Phillips y LeDoux, 1994; Maren y cols, 1997; Maren, 1999), pero dejan intacta la capacidad de condicionamiento del miedo a un estímulo sensorial (un sonido, por ejemplo) (LeDoux, 1992). Se ha sugerido que, cuando el estímulo condicionado es el contexto, el hipocampo forma una

---

representación de los elementos del contexto y envía proyecciones a los núcleos basal y basal accesorio de la amígdala. Éstos núcleos, a su vez, proyectan al núcleo central de la amígdala, el cual, mediante conexiones con el tronco encefálico y el hipotálamo, generará respuestas de miedo condicionado (Fendt y Fanselow, 1999; LeDoux, 2000).

- **Implicaciones de la amígdala en la formación de la memoria**

La amígdala está constituida por 13 núcleos heterogéneos, situados en el lóbulo temporal medial. El núcleo basolateral comprende los núcleos laterales, basolaterales, basal medial y basal accesorio, mientras que el núcleo central está constituido por el complejo periamigdalóide, el núcleo medial y el cortical (Lanuza y cols, 1999). Dichos núcleos se interrelacionan entre sí, y también con la formación hipocámpal, con la corteza cerebral y con estructuras diencefálicas, como el tálamo y el hipotálamo (Canteras y cols, 1992). Por tanto, la amígdala puede influir la actividad neural en otras áreas cerebrales en los procesos de aprendizaje y memoria (McGaugh y cols, 1996). Por otra parte, la amígdala puede recibir información sensorial altamente procesada, ya que actúa como integrador de estímulos complejos con un significado emocional (Cahill y cols, 1995), aunque también procesa información sensorial sin necesidad de que se produzca un procesamiento cognitivo cortical (LeDoux, 2000).

Se ha implicado a la amígdala en la adquisición, y consolidación de memorias, especialmente las memorias de miedo (Phillips y Le Doux, 1992; Cahil y cols, 1999, 2000), así como en la consolidación de memorias declarativas, cuando la información contiene una considerable carga emocional (Cahill y cols, 1995). No obstante, actualmente, existe bastante controversia sobre si ejerce un papel modulador sobre el almacenamiento de la información en otras áreas cerebrales o bien, en sí puede constituir un área donde se almacena la memoria (Le Doux, 2000). Estudios de lesiones, de estimulación eléctrica o el empleo de antagonistas de neurotransmisores, han puesto de manifiesto que la inhibición del funcionamiento de la amígdala, reduce la fuerza con la que se forman las memorias (Roosendaal y McGaugh, 1997a), pero no impide su formación en determinados test conductuales.

La amígdala desempeña un papel importante en la memoria implícita, y particularmente en el condicionamiento del miedo al contexto (Maren y Fanselow, 1996; Helmstetter, 1992). Así, lesiones en el núcleo central de la amígdala impiden el condicionamiento del miedo, independientemente del tipo de estímulo condicionado (bien sea el contexto o un sonido) (LeDoux, 2000). Dado que existen

---

proyecciones directas del hipocampo a la amígdala, algunos autores proponen la interacción conjunta de ambas regiones en el condicionamiento del miedo (Selden y cols, 1991), mientras que otros postulan un papel independiente de ambas en dicho paradigma conductual (Phillips y Le Doux, 1992).

#### **1.4. Memoria y plasticidad neural**

Hebb postuló, en 1949, que durante los procesos de formación de la memoria se producen cambios en el patrón de conectividad sináptica, que determinarán la fuerza con la que se almacena la información a largo plazo. Estudios de microscopía electrónica, realizados posteriormente, han confirmado la existencia de nuevas sinapsis excitatorias en asociación con procesos de aprendizaje y memoria (Andersen y Soleng, 1998).

- **Modelo de la LTP (Potenciación a largo plazo)**

Bliss y Lomo (1973) desarrollaron un modelo electrofisiológico que ejemplificaba *in vivo* los criterios de plasticidad sináptica que Hebb hipotetizó para explicar los procesos de aprendizaje y memoria (Bliss y Lomo, 1973). Estos autores, demostraron que la administración de estímulos eléctricos breves de alta frecuencia, en una de las vías del hipocampo –vía de la fibra perforante-, producía un aumento de la fuerza sináptica en dicha vía, que denominaron potenciación a largo plazo o LTP, que ha sido especialmente estudiada en el hipocampo (Bliss y Collingridge, 1993; Bennett, 2000), aunque también se puede inducir en otras áreas cerebrales (Kim y cols, 2001).

Existen varias similitudes entre los mecanismos celulares que acontecen en la LTP y los que se dan a nivel neural en ratas entrenadas en diversos paradigmas conductuales de aprendizaje y memoria (Maren y Braudry, 1995). Recientemente, Martin y cols. (2000) han propuesto que la LTP podría considerarse como un mecanismo idóneo para explicar la codificación y el almacenamiento de las "huellas iniciales de memoria" en las fases iniciales de la consolidación de la memoria (Eichenbaum y cols, 1996), pero no en los procesos de recuerdo o recuperación de la información (Martin y cols, 2000).

---

- **Mecanismos celulares implicados en los procesos de aprendizaje y memoria**

Como consecuencia del aprendizaje, se produce la activación transitoria de una serie de sinápsis, que da lugar a un conjunto de eventos bioquímicos, que producen cambios en la conectividad sináptica. Una revisión exhaustiva de dichos procesos excede, con mucho, el marco de esta Tesis, por lo que nos limitaremos, en este subapartado, a señalar las líneas generales más estudiadas en los últimos años, tanto en relación a diversos modelos de aprendizaje, como de la LTP.

Así, se sabe que entre los mecanismos principales se encuentran: la liberación de glutamato, junto con la activación de los receptores de NMDA, el influjo de  $Ca^{2+}$  en la neurona postsináptica, la activación de cascadas de enzimas quinasas (Izquierdo y Medina, 1997; Vianna, y cols, 2000), así como la de determinados factores de transcripción inducibles y constituibles (CREB) (Yin y Tully, 1996; Viola y cols, 2000).

Por otra parte, durante la adquisición y consolidación de la memoria se requiere la síntesis de proteínas, entre ellas las glicoproteínas denominadas moléculas de adhesión celular neural, que desempeñan un importante papel en la adquisición y consolidación de la información en procesos de aprendizaje y memoria (Rose, 1996; Regan, 1998). Dado que dichas proteínas son objeto principal de estudio en esta Tesis, a continuación dedicamos un tratamiento especial al papel de éstas moléculas de adhesión celular en el sistema nervioso, reseñando de forma especial sus implicaciones en los procesos de aprendizaje y memoria.

## **1.5. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL**

### **1.5.1. Clasificación de las moléculas de adhesión celular neural**

Las moléculas de adhesión celular neural se clasifican, de forma general, en varias familias (Uyemura y cols, 1996), según sus similitudes estructurales y funcionales en: (i) familia de las superinmunoglobulinas, entre las que destacan la molécula de adhesión celular neural NCAM (Linnemand y Bock, 1989), y el antígeno L1 (Bock y cols, 1985), (ii) la familia de las cadherinas (Redies, 2000) (iii) la familia de las integrinas (Reichardt y cols, 1989), y (iv) la familia de las

---

selectinas (Yee y cols, 1999). A continuación, se presenta una clasificación esquemática de las moléculas de adhesión celular en el sistema nervioso.

*1/ Familias de las Superinmunoglobulinas:*

*1A/ Subclases de NCAM:    1B/ Subclases de L1:*

NCAM (D2)	L1 (G4, NILE)
Fascilina II	Contactina
MAG	NgCAM
	Nr-CAM
	Ng-NCAM
	F3 (F11)
	TAG-1
	Neuroglianina

*2. Familia de las cadherinas:*

N-Cadherina

P-Cadherina.

V-Cadherina.

*3. Otras familias:*

Selectinas.

(Adaptado de Edelman y Crossin, 1991).

## **1.5.2. Molécula de adhesión celular neural, NCAM**

### **1.5.2.1. Regulación de la expresión génica de NCAM**

NCAM es la molécula de adhesión celular más estudiada en procesos de reconocimiento celular. Esta glicoproteína, perteneciente a la familia de las superinmunoglobulinas, fue originariamente denominada con el término D2 en rata (Jorgensen y cols, 1977; Lyles y cols, 1984), NS-4 o BSP-2 en

---

ratón (Goridis y cols, 1978) y, posteriormente, con la denominación de molécula de adhesión celular neural –NCAM- (Bock y cols, 1987). El gen de NCAM mapea en el cromosoma 9 en ratón (D'Eustachio y cols, 1985), mientras que en humanos se sitúa en la banda q23 del cromosoma 11 (Nguyen y cols, 1986). NCAM está sujeta a varias modificaciones post-traduccionales (para revisión consultar Krog y Bock, 1992). Por otro lado, la eficacia de la transcripción génica de NCAM está controlada por una región 5' del promotor del gen (Chen y cols, 1990). La regulación transcripcional es responsable de los cambios cuantitativos de la expresión de NCAM, mientras que el *splicing* alternativo contribuye a las variaciones cualitativas, y genera el patrón de isoformas de NCAM (Thompson y cols, 1989).

El gen de NCAM se piensa que es transcrito en un pre-RNA mensajero que, por *splicing* alternativo (Murray y cols, 1986), y junto con una combinada poliadenilación diferencial (Barbas y cols, 1986), genera las tres isoformas principales de NCAM: de 120, 140 y 180 KDa (para revisión consultar Cunningham y cols, 1987; Small y cols, 1988).

Por otra parte, el número de exones de NCAM está más o menos conservado en diferentes especies animales, de tal manera que la inserción de 30 pares de bases (designado como VASE, *variable domain alternatively spliced exon*) entre los exones 7 y 8, confiere importantes características funcionales a NCAM (Chen y cols, 1994). En neuronas, el exón VASE está presente en el 50 % de todos los transcritos que codifican para las tres isoformas de NCAM (Saffell y cols, 1994). Por otro lado, como veremos más adelante, las modificaciones post-traduccionales en las moléculas de adhesión celular neural, especialmente la polisialización de NCAM (para revisión consultar Regan, 1991), desempeñan un papel importante en la capacidad de adhesión y de plasticidad neural inducida por NCAM (para revisión consultar Doherty y cols, 1995a), y L1 en el sistema nervioso (Doherty y cols, 1995b).

### **1.5.2.2. Estructura molecular de NCAM y de sus isoformas**

NCAM consta de 5 dominios estructurales de tipo inmunoglobulina y dos dominios fibronectina tipo III repetidos (Brümmendorf y Rathjen, 1995). El dominio extracelular constituye una estructura globular compuesta por aproximadamente 70-110 aminoácidos. Cada dominio inmunoglobulina G consta de dos laminas  $\beta$  interconectadas por puentes disulfuro entre residuos de cisteína altamente conservados, que estabilizan los dominios estructurales de NCAM (Hunkapiller y Hood, 1989).

---

Tal como se reseñó en el apartado anterior, NCAM tiene varias isoformas (NCAM 120, 140 y 180 Kda) (Gegelashvili y cols, 1993; Olsen y cols, 1993, Kramer y cols, 1997), generadas por *splicing* alternativo de un único gen (Walsh, 1989), y que difieren en la longitud de su dominio citoplasmático, así como también en el modo de unión a la membrana, presentando diferente movilidad en la membrana (para revisión consultar Jacobson y cols, 1997). NCAM 120 carece de un dominio intracelular y está anclada a la membrana plasmática a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Haitao y cols, 1987). NCAM 140 contiene un dominio citoplasmático adicional de 30 Kda (Doherty y cols, 1992), mientras que NCAM 180 tiene el dominio citoplasmático más largo (Barthels y cols, 1988). A diferencia de NCAM 140, muestra una movilidad lateral reducida, debido a que NCAM 180 es capaz de interactuar con proteínas del citoesqueleto (Probstmeier y cols, 1989), como la espectrina (Pollerberg y cols, 1987), y ankirina (Davis y cols, 1993). A partir de estas observaciones, se ha sugerido que NCAM 180 es capaz de estabilizar los contactos celulares y modular la comunicación de patrones pre- y post-sinápticos en las sinápsis (Persohn y Schachner, 1990).

Por otro parte, las glicoproteínas conjugadas en la superficie celular pueden estar asociadas formando agrupaciones en localizaciones específicas en la membrana celular (Rusakov y cols, 1995). Así, la formación de complejos, constituiría un mecanismo de modificación funcional rápida, que permitiría la inducción de cambios en las sinapsis a nivel local mediante diversos patrones de reorganización.

#### **1.5.2.2.1. Estructura y función de los diferentes dominios estructurales de NCAM**

A continuación, se describen brevemente, los determinantes estructurales más importantes en cada dominio de NCAM, así como la función de los mismos (Baldwin y cols, 1996). Estudios en la estructura tridimensional de NCAM, mediante técnicas de cristalografía y de resonancia magnética nuclear (Kasper y cols, 1999, 2000) han puesto de manifiesto que el primer dominio puede interactuar con el segundo dominio inmunoglobulina de NCAM (Atkins y cols, 1999) y además, el dominio Ig I es capaz de interactuar con heparina (Nybroe y cols, 1989; Kiselov y cols, 1997). Se ha descrito que cuando el dominio inmunoglobulina I actúa como sustrato, es capaz de promover la adhesión de cuerpos neuronales y de modificar la migración celular en explantes de células cerebelares (Frei y cols, 1992).



---

Por otro lado, el dominio II puede unirse a heparina con una afinidad mayor que la propia molécula de NCAM completa, debido a que presenta un motivo de unión a heparina constituido por agrupaciones de aminoácidos básicos (Reyes y cols, 1990). Cuando el dominio Ig II actúa como sustrato, también es capaz de promover la adhesión de cuerpos neuronales, aunque en menor medida que el dominio I (Frei y cols, 1992).

Existen controversias en la literatura sobre la función del tercer dominio estructural, aunque se le ha implicado en los mecanismos de unión homofílica (Rao y cols, 1994, Atkins y cols, 2001). Además, en la región carboxilo terminal existen residuos de serina y treonina, sensibles, por tanto, a modificaciones post-traduccionales por fosforilación (Sorkin y cols, 1984).

Por otra parte, la presencia del exón VASE en el cuarto dominio de NCAM, que se localiza próximo al sitio putativo de glucosilación, constituye un regulador de las interacciones celulares (Chen y cols, 1994), y decrece la actividad neuritogénica de NCAM (Lahrtz y cols, 1997), ya que tiene un efecto reductor sobre la polisialización de NCAM (Arce y cols, 1996). También, se ha identificado un subdominio que puede ser reconocido por otras CAMs -como L1-, ya que una secuencia consenso de tipo lectina en el dominio Ig IV parece ser responsable de la interacción en *cis* entre NCAM y L1 (Horstkorte y cols, 1993).

La característica más importante del quinto dominio estructural radica en que se trata del lugar de unión del ácido polisialílico (Finne y cols, 1983), que constituye la modificación post-traduccionales más importante de NCAM (ver apartado 1.5.4.1.1). Este tipo de modificación post-traduccionales es bastante inusual en el sistema nervioso y confiere a NCAM la capacidad inductora de plasticidad neural (para revisión consultar Kiss y Rougon, 1997).

Por otra parte, los dominios fibronectina de tipo III repetidos, confieren a NCAM, principalmente, la capacidad inductora de crecimiento neuronal y, en menor medida, de adhesión celular (Skaladchikova y cols, 1999). Es importante señalar que se ha identificado un sitio de unión para ATP en dichos dominios (Dzhandzhugazyan y Bock, 1997), que confiere a NCAM una actividad ATPásica (Dzhandzhugazyan y Bock, 1993).

Desde un punto de vista funcional, las moléculas de adhesión celular desempeñan un papel importante en la histogénesis. Se ha implicado a NCAM en la formación de axones (Rathjen y cols, 1987, 1992; Walsh y Doherty, 1997) y en importantes eventos morfogenéticos durante el desarrollo del nervioso (para revisión consultar Edelman y Jones, 1998).

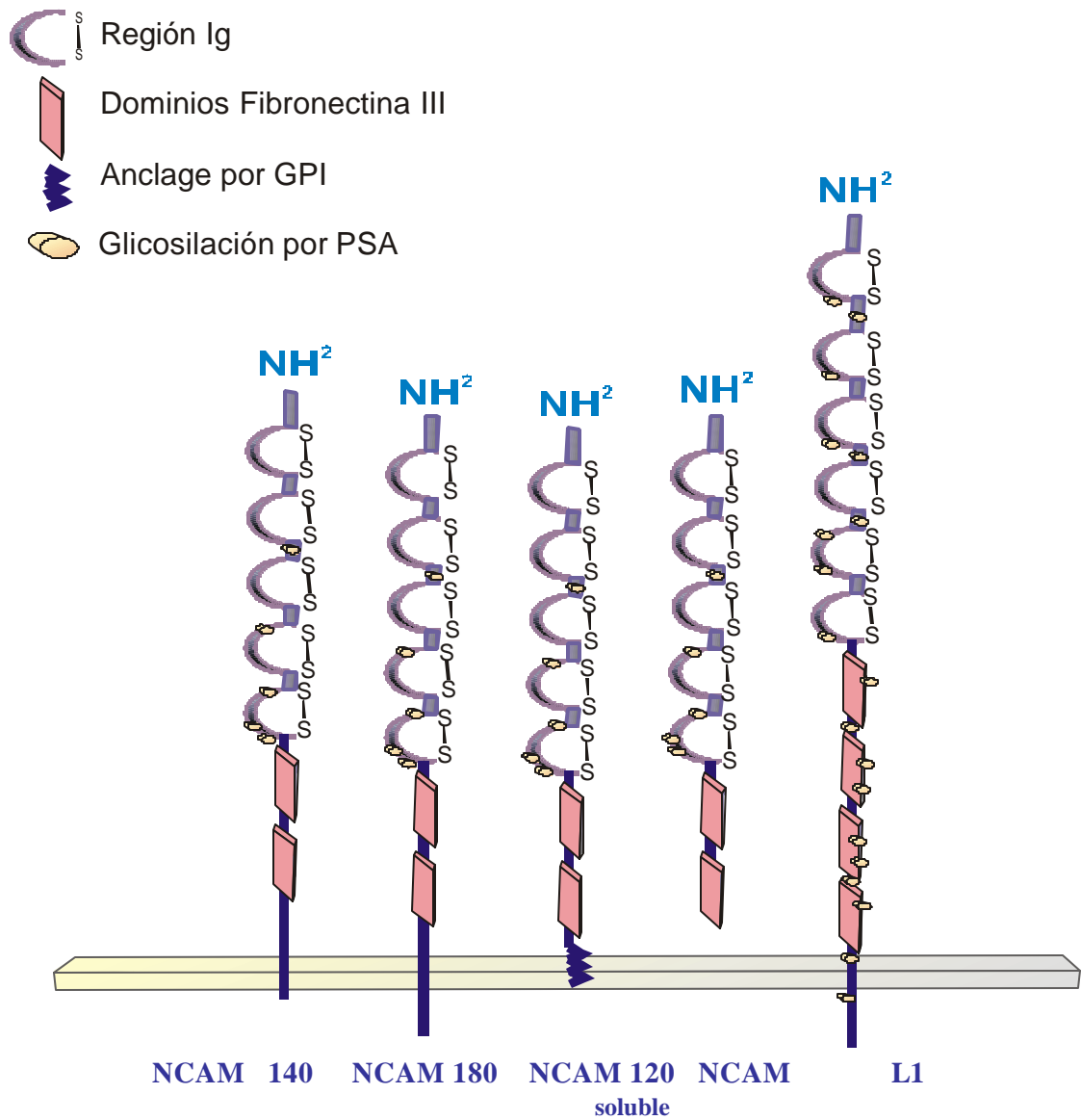
---

### **1.5.3. Estructura molecular de L1**

Como ya se mencionó con anterioridad, L1 es otra glicoproteína de membrana perteneciente a la familia de las superinmunoglobulinas (Sadoul y cols, 1988), sujeta también a *splicing* (Coutelle y cols, 1998). Esta glicoproteína consta de 6 dominios inmunoglobulina, seguidos de 5 dominios fibronectina de tipo III repetidos (Moos y cols, 1988; Holm y cols, 1996) y un corto dominio citoplasmático de 85-147 aminoácidos. Los fragmentos de la parte citoplasmática de L1 se encuentran especialmente conservados a lo largo de la escala filogenética, lo que sugiere que pueden estar involucrados en importantes funciones celulares (Hortsch, 1996, 2000; Brümmendorf y cols, 1998).

Por otra parte, se ha visto que los diferentes dominios estructurales de L1 están implicados en los mecanismos de unión homofílica de L1 (Ranheim y cols, 1996).

También se expresa *in vivo* por proteólisis una forma soluble de L1, que potencia el crecimiento neuronal (Sugawa y cols, 1997). Parece ser que los dominios Ig III- IV (Appel y cols, 1993) y los dominios de tipo fibronectina III repetidos 1 y 2 están implicados en el crecimiento neuronal, cuando se unen a un sustrato adecuado (Stallcup, 2000). Además, se ha identificado un sitio de actividad proteolítica, localizado en agrupaciones de aminoácidos en el tercer dominio fibronectina, que genera fragmentos complementarios de 140 y 80 Kda (Holm y cols, 1995).



**Figura 1** Isoformas de las moléculas de adhesión celular neural, NCAM y L1 en el sistema nervioso (**GPI**= Glicosilfosfatidilinositol, **PSA**= Ácido polisiálico, **Ig**= Inmunoglobulina, adaptado de Edelman y Crossin, 1991).

---

Por otra parte, al igual que NCAM, L1 se organiza en agrupaciones, que pueden estabilizar los contactos celulares con otras proteínas del citoesqueleto (Kadmon y cols, 1990a,b).

#### **1.5.4. Modificaciones post-traduccionales de las moléculas de adhesión celular neural**

A continuación, se indican las modificaciones postraduccionales de NCAM y de L1, que otorgan importantes funciones a las moléculas de adhesión celular en el sistema nervioso (Krog y Bock, 1992).

##### **1.5.4.1. Modificaciones post-traduccionales de NCAM**

Varias modificaciones post-traduccionales controlan la funcionalidad de NCAM, siendo la fucosilación (Rose, 1995), y sobre todo la polisialización (Regan, 1991) las dos más importantes en procesos de plasticidad sináptica y de aprendizaje y memoria (Murase y Schuman 1999). También existen otras modificaciones como la presencia del epitopo HNK-1, así como la sulfatación y la fosforilación, que desempeñan un papel menos importante en procesos de aprendizaje y memoria, por lo que prácticamente nos centraremos en la polisialización de NCAM como modificación post-traduccional más importante en el contexto de esta Tesis.

##### **1.5.4.1.1. Polisialización de NCAM**

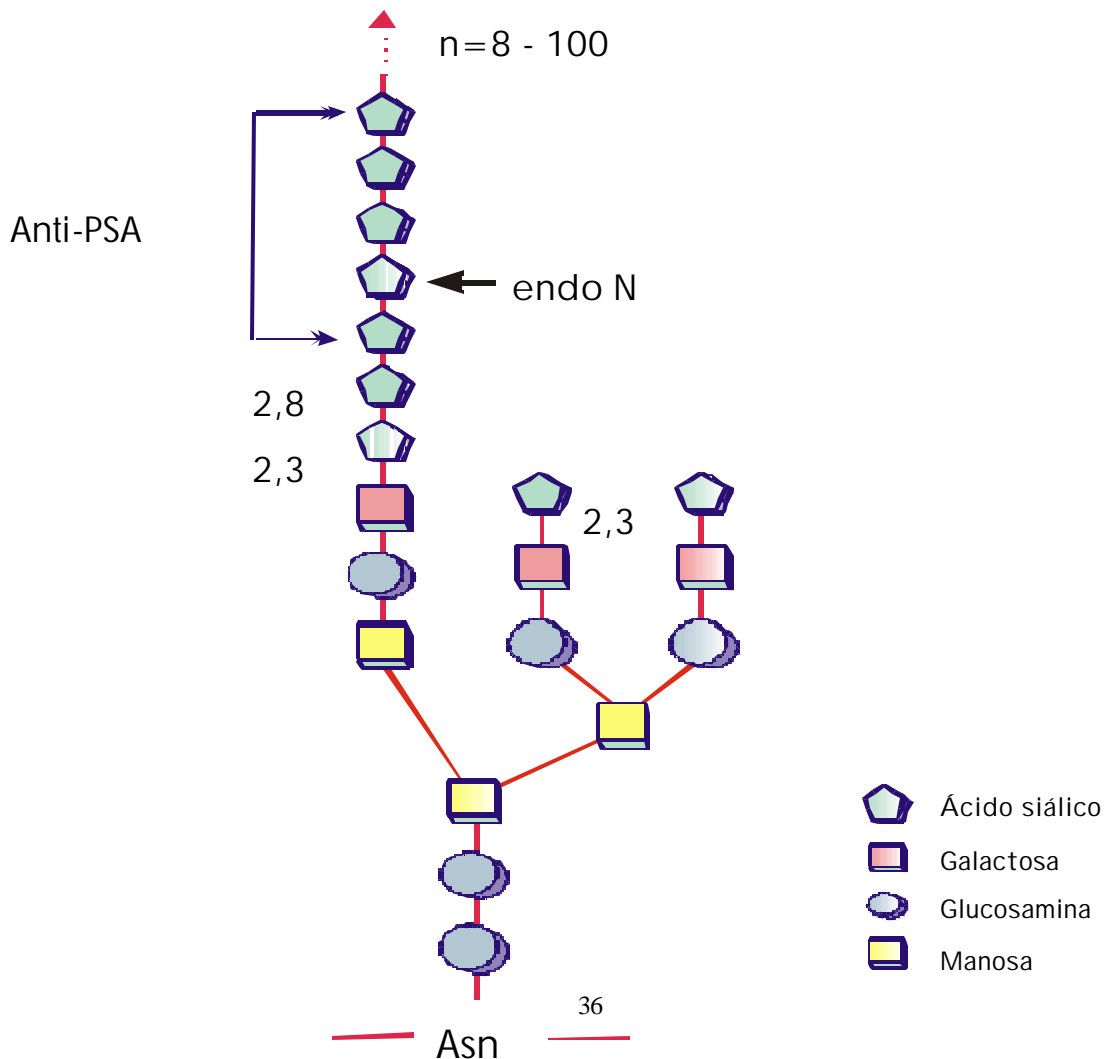
La polisialización de NCAM constituye una de las modificaciones post-traduccionales más importantes de NCAM desde un punto de vista funcional y desempeña un papel importante en procesos de aprendizaje y memoria (Murase y Schuman 1999; Regan, 1998). A continuación se describen brevemente los mecanismos celulares que están implícitos en la adición del ácido polisiálico (o neuramínico) a NCAM en el sistema nervioso por la acción de polisialiltransferasas específicas, indicándose las características estructurales y funcionales que otorga la presencia del ácido polisiálico a NCAM (Regan, 1991).

---

- **Características estructurales del ácido polisiálico en la célula**

El ácido polisiálico es un homopolímero de residuos de ácido N-acetil-neuramínico, que está presente en glicoproteínas de la superficie celular (Kudo y cols, 1996), tales como NCAM o L1. Los residuos de ácido polisiálico se unen a núcleos centrales N-oligosacáridos de manosa por la acción de polisialiltransferasas específicas (Nakayama y cols, 1998). Se ha identificado a NCAM, como el principal portador de ácido polisiálico (Kiss y Rougon, 1997).

En neuronas, NCAM porta cadenas al menos 55 residuos de N-acetilneuramínico y se estima una media aproximada de 130 a 150 residuos de ácido siálico (Varki, 1998). La longitud de la cadena de PSA es regulada según el estado de desarrollo embrionario. Así, NCAM está altamente polisializado en una etapa postnatal temprana, con pesos moleculares superiores incluso a 200 Kda, debido a su alto grado de sialización. Sin embargo, el grado de polisialización va decreciendo gradualmente conforme se alcanza la etapa adulta del individuo (Edelman y cols, 1983).



---

**Figura 2.** En la gráfica adjunta se indica la disposición de los residuos oligosacáridos de PSA-NCAM, y la zona por la que la enzima Endoneuraminidasa o Endo N rompe PSA-NCAM (**Endo N**= Endoneuraminidasa N, **Anti-PSA**= Anticuerpos de PSA-NCAM (adaptado de Regan, 1991).

- **Síntesis de ácido polisiálico**

En eucariotas el ácido polisiálico se sintetiza en el aparato de Golgi por la acción de polisialiltransferasas específicas, que muestran un complejo patrón de regulación en el sistema nervioso (Breen y Regan, 1988a,b). Aunque no se conoce demasiado acerca de la iniciación y de la terminación de la síntesis de PSA, se propone la necesidad de una cierta longitud de cadena -iniciador-, el cual estaría unido a la membrana, sobre la que se irán añadiendo sucesivos y nuevos residuos de ácido neuramínico o polisiálico (PSA) por polisialiltransferasas específicas (Nakayama y cols, 1998) en posiciones 2,3 (Kiss y Rougon, 1997) 2,6 alfa (Georgopoulou y Breen, 1999) y 2,8  $\alpha$  respectivamente (Hildebrandt y cols, 1998).

- **Localización y distribución de las polisialiltransferasas en el sistema nervioso.**

Aunque las tres isoformas de NCAM pueden portar PSA, NCAM 180 es la más susceptible de ser polisializada (Wood y cols, 1997). La síntesis de ácido polisiálico que porta NCAM es catalizada en el sistema nervioso por dos tipos de enzimas polisialiltransferasas (Angata y cols, 1998), como son ST8SiaII (o STX) (Kojima y cols, 1996) y ST8Sia IV (o PST) (Muhlenhoff y cols, 1996), que muestran un grado alto de homología estructural entre ellas. ST8Sia II es la forma predominante en el desarrollo embrionario (Kojima y cols, 1996), mientras que ST8SiaIV persiste a niveles relativamente elevados en el desarrollo postnatal (Hildebrandt y cols, 1998; Ong y cols, 1998). Aunque ambas enzimas pueden participar en la polisialización de NCAM, PST parece desempeñar un papel predominante (Seidenfaden y cols, 2000).

Por otra parte, la expresión más elevada del RNA mensajero de PST se localiza en regiones con una expresión permanente de PSA-NCAM a lo largo de la vida del individuo, que se mantiene elevada y se restringe al hipocampo, la zona subependimal, el bulbo olfatorio, la capa II de la corteza

---

entorrinal, y al cerebelo (Close y Colley, 1998). Sin embargo, no siempre va asociada una coexpresión del mRNA de PST y de PSA-NCAM en el sistema nervioso, ya que se ha visto la existencia de niveles de PSA-NCAM elevados sin un aumento concomitante en la actividad polisialiltransferasa en la zona marginal del bulbo olfatorio (Chung y cols, 1991).

- **Regulación del estado de polisialización de NCAM**

Se han propuesto varios mecanismos en la literatura que modulan la polisialización de NCAM en el sistema nervioso (Regan, 1991; Nelson y cols, 1995), que se indican a continuación. Entre ellos:

(i) La regulación de la actividad de las polisialiltransferasas (Alcaraz y Goridis, 1991).

(ii) La presencia del epitopo HNK-1, que constituye un modulador negativo de la polisialización de NCAM (Martini y Schachner, 1995).

(iii) Aunque existen datos contradictorios en la literatura, la presencia del exón VASE en el cuarto dominio de NCAM parece ser un modulador negativo de la polisialización de NCAM (Saffel y cols, 1994; Bruses y Rutishauser, 1998; Bruses y cols, 1995).

(iv) Estudios farmacológicos en líneas celulares PC12 de rata y de neuroblastoma N2A, han puesto de manifiesto que un aumento en la actividad proteína quinasa C  $\delta$  correlaciona inversamente con el grado de polisialización de NCAM (Gallagher y cols, 2000, 2001).

(v) Varios trabajos muestran que algunos mecanismos relacionados con la actividad en determinados circuitos neurales (posiblemente, a través de la despolarización de la membrana) pueden estar implicados en la polisialización de NCAM (Fredette y cols, 1993; Muller y cols, 1996; Fields y Itoh, 1996). Así, se ha descrito la regulación de la polisialización de NCAM por glutamato (Hoffman y cols, 1997).

(vi) Además, se ha visto una regulación hormonal de la polisialización de NCAM por glucocorticoides en el hipocampo de rata (Rodríguez y cols, 1998). También, las hormonas tiroideas son capaces de producir un aumento en la polisialización de NCAM en el desarrollo de invertebrados (Becker y cols,

---

1994), así como de modular la expresión de polisialiltransferasas en ciertos cultivos celulares (Grollman y cols, 1993).

#### **1.5.4.1.2. Fucosilación**

La fucosilación es una modificación post-traducciona que consiste en la adición de restos de fucosa a NCAM, y que desempeña un papel importante en los procesos de plasticidad sináptica dependientes de actividad y en los mecanismos subyacentes al aprendizaje y la memoria (Rose, 1995; Sandi y cols, 1995).

Se han detectado actividades ectogalactosil transferasas y fucosiltransferasa –enzimas claves en el proceso de fucosilación- en las sinápsis en cultivos neuronales, lo que sugiere la existencia de procesamientos post-Golgi en glicoproteínas de las sinapsis (Krug y cols, 1994).

- **1.5.4.2. Modificaciones post-traduccionales de L1**

L1 está sujeto a modificaciones postraduccionales como la sulfatación y la fosforilación (Sadoul y cols, 1989), aunque el significado funcional de esas modificaciones permanece incierto (Coutelle y cols, 1998). Otros determinantes estructurales similares a los encontrados en NCAM, como la polisialización o la adición del epítipo HNK-1, regulan la orientación relativa de L1 en la membrana plasmática (Faissner y cols, 1985). Todos los miembros del subgrupo L1 portan ácido polisialílico, pero sólo el 35 % de L1 contienen el epítipo HNK-1 (Kucherer y cols, 1987).

#### **1.5.5. Localización y distribución de las moléculas de adhesión celular neural de la familia de las superinmunoglobulinas en el sistema nervioso (NCAM, PSA-NCAM y L1)**

Parece ser que, en el sistema nervioso no existen diferencias sexodimórficas respecto a la inmunoreactividad de PSA-NCAM. Por otra parte, es importante destacar que regiones con plasticidad



---

permanente en el sistema nervioso -hipocampo, corteza piriforme, sistema neurohipofisario, y bulbo olfatorio-, muestran una continua expresión de PSA-NCAM, que acompaña a las reorganizaciones sinápticas en dichas áreas (Bonfanti y cols, 1992). A continuación, se indica brevemente la localización y distribución de NCAM, su forma polisializada y L1 en el sistema nervioso.

- **Localización y distribución de NCAM en el sistema nervioso**

A continuación, se indica la localización y distribución de NCAM en el sistema nervioso (Lahr y cols, 1993). Se ha detectado la presencia del mRNA de NCAM en células piramidales de la formación hipocampal, desde el desarrollo temprano al estado adulto en ratón (Goldowitz y cols, 1990). En roedores, existe una fuerte inmunoreactividad para NCAM a través de la formación hipocampal (Persohn y Schachner, 1990), que es especialmente intensa en la capa interna molecular del giro dentado, en el hilus y en las fibras musgosas (Seki y Arai, 1993a). También existe un marcaje intenso e uniforme para anticuerpos policlonales de NCAM en el *stratum radiatum* y *stratum oriens* de CA1, pero existe un escaso marcaje en el *stratum lacunosum molecular* (Miller y cols, 1993). Además, en estudios realizados con anticuerpos monoclonales para NCAM 140 y NCAM 180, se observó un marcaje para dichos monoclonales muy similar al que muestra el policlonal de NCAM (y en las mismas áreas de la formación hipocampal comentadas para dicho policlonal). Por tanto, se ha visto un intenso marcaje para NCAM 140 y NCAM 180 en la capa polimórfica granular interna del giro dentado, en el hilus y en las fibras musgosas, existiendo además una inmunoreactividad para los monoclonales de NCAM 140 y NCAM 180 muy reducida en CA2 y CA3 (Miller y cols, 1993)

Por otra parte, también se ha evidenciado inmunoreactividad para NCAM 180 en el área preóptica medial en el sistema neurohipofisario, así como también en el hipotálamo anterior, y mediobasal, localizándose NCAM 140 en el hipotálamo anterior (Lee y cols, 1995).

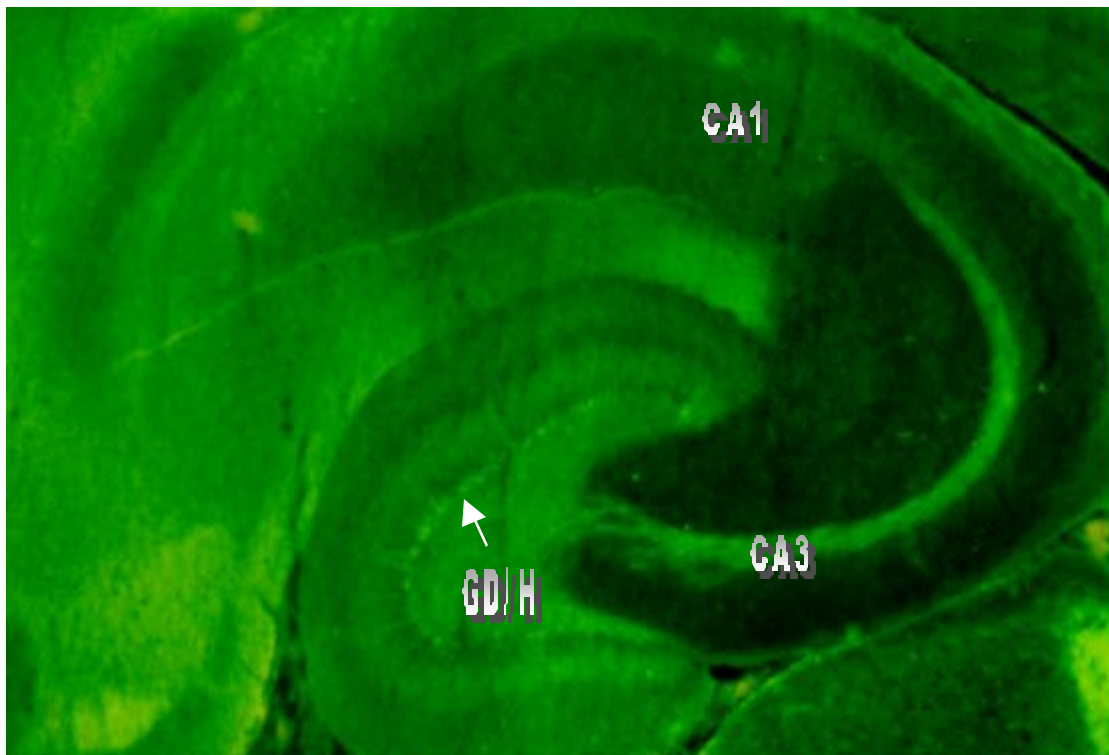
Además, NCAM contribuye de forma importante a la maduración y estabilización final de las sinapsis en el estriado en roedores (DiFligia y cols, 1989). También, se ha detectado la presencia de NCAM tanto en el bulbo olfatorio (Miragall y cols, 1989), como en el cortex cerebral de ratón (Chung y cols, 1991), así como también a lo largo del desarrollo del cerebelo (Goldowitz y cols, 1990).

---

- **Localización y distribución de PSA-NCAM**

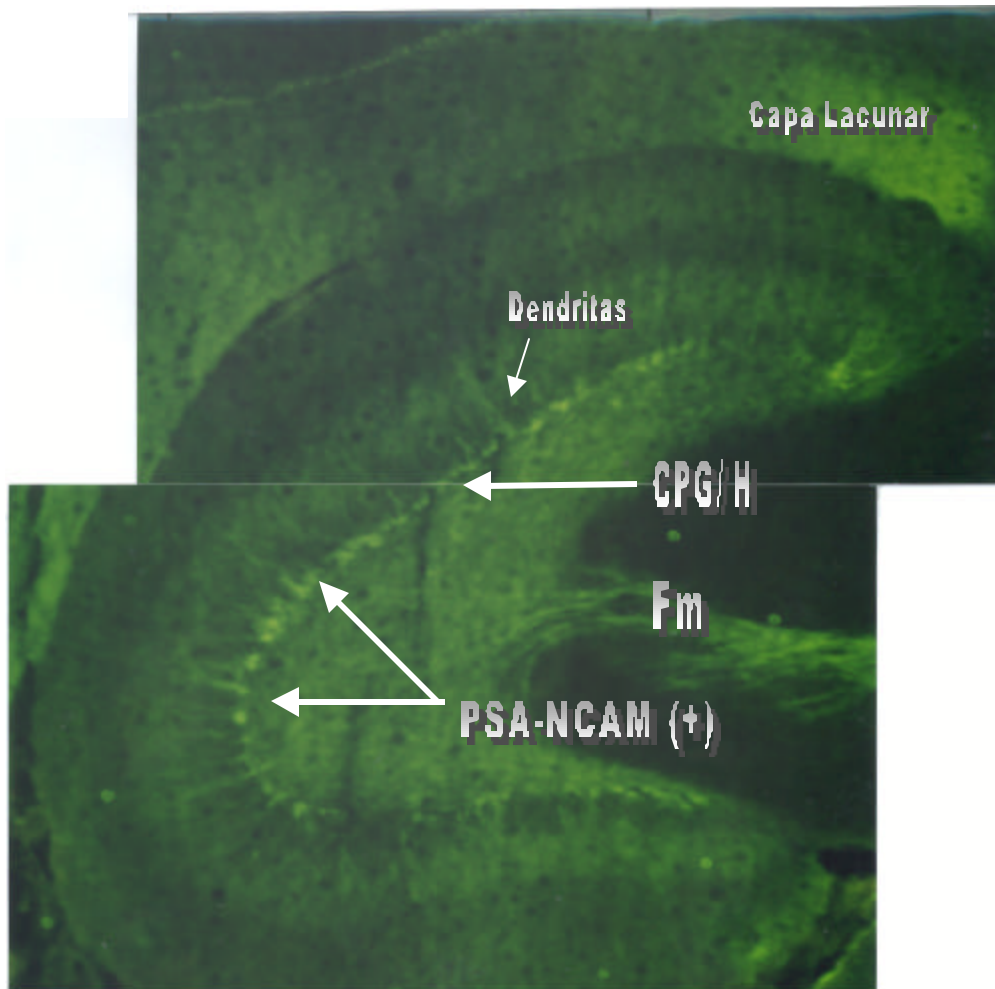
Uno de los hechos más destacados del hipocampo es su permanente neurogénesis, incluso en la fase adulta, ya que la zona interna de la capa polimórfica granular del giro dentado continúa produciéndose a lo largo de la vida del individuo (Seki y Arai, 1991).

En el hipocampo de la rata adulta, la mayor expresión de PSA-NCAM se localiza en la primera capa polimórfica granular del giro dentado, siendo la mitad de dichas células inmaduras (Seki y Arai, 1999b). El hecho de que mediante la inyección de 5bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) en ratas (día postnatal 35), se haya detectado marcaje para BrdU en el núcleo de las células que expresaban PSA-NCAM (12 días después de la inyección de BrdU, pero no 80 días post-inyección), indica que las nuevas células granulares sintetizadas expresan PSA-NCAM transitoriamente (Seki y Arai, 1993b). Además del fuerte marcaje observado en las fibras musgosas (Seki y cols, 1999a), que inervan a CA3, también se ha encontrado inmunoreactividad para PSA-NCAM en CA2, así como un discreto marcaje en la capa lacunar y un débil marcaje en CA1 (Seki y Arai, 1991; Bonfanti y cols, 1992) (Ver figuras 3 y 4). Por otra parte, las células colaterales de Schaffer muestran inmunoreactividad para PSA-NCAM en la superficie de sus cuerpos celulares, y fibras asociadas, las cuales se extienden a través de la capa piramidal (Bonfanti y cols, 1992).



---

**Figura 3.** Observése el marcaje del anticuerpo monoclonal utilizado para PSA-NCAM en la formación hipocampal (**GD/ H**= Giro Dentado/ Hilus, **CA1, y CA3**= Áreas CA1 y CA3 del hipocampo).



**Figura 4.** En la gráfica se observa la inmunoreactividad para PSA-NCAM en el borde de la capa polimórfica colindante con el hilus del giro dentado (**CPG/ H**). También se observan las dendritas marcadas, y la inmunoreactividad para PSA-NCAM en las fibras musgosas (**FM**) y en la capa lacunar.

---

En lo que respecta a la amígdala, la inmunoreactividad para PSA-NCAM depende del núcleo que se estudie. Los núcleos central y medial exhiben una fuerte inmunoreactividad. Sin embargo, la inmunoreactividad para PSA-NCAM es prácticamente ausente en los núcleos basolateral y lateral de la amígdala (Murphy y cols, 2000).

En el hipotálamo de ratas adultas, existe una marcada inmunoreactividad para PSA-NCAM en el núcleo supraóptico y, en menor grado, en el núcleo paraventricular, que se localiza en axones, dendritas y en terminales de astrocitos y neuronas (Theodosis y cols, 2000; Pierre y cols, 2001). También existe inmunoreactividad para PSA-NCAM en el núcleo supraquiasmático, en el núcleo arcuado (Hoyk y cols, 2001), la eminencia media y en el área preóptica medial (Bonfanti y cols, 1992).

En cuanto al estriado, la inmunoreactividad para PSA-NCAM, en roedores, es muy intensa en las dos primeras semanas del desarrollo (Aaron y Chesselet, 1989), de forma que aparece durante el desarrollo de las sinápsis corticoestriatales, y decrece una vez los contactos corticoestriatales llegan a ser funcionales (Butler y cols, 1997).

Por otra parte, en el bulbo olfatorio, región con plasticidad constante, existe una fuerte inmunoreactividad para PSA-NCAM en las células globosas -precursores de las neuronas del bulbo olfatorio- así como en la zona marginal, en el epitelio del órgano vomeronasal y en el glomérulo del bulbo olfatorio (Miragall y cols, 1988). Además, se ha visto que células generadas en la zona subventricular de la porción anterior del ventrículo lateral, migran hacia el bulbo olfatorio debido a la presencia de PSA-NCAM (Ono y cols, 1994).

- **Localización y distribución de L1 en el sistema nervioso**

En el sistema nervioso central, L1 se expresa en la porción neuronal postsináptica, localizándose, junto a NCAM 180, en los sitios de contacto neurona-neurona y neurona-glia (Keilhauer y cols, 1985; Martini y cols, 1994). L1 también está presente en las interacciones dinámicas existentes entre las células de Schwann del sistema nervioso periférico (Faissner y cols, 1984) y se expresa en axones durante el desarrollo y la regeneración de nervios periféricos denervados, donde desempeña, junto con PSA-NCAM, un papel importante en la regeneración (Schachner, 1994).

---

En el hipocampo, la inmunoreactividad para L1 es dependiente del estado de desarrollo (Persohn y Schachner, 1990). En roedores, aparece un discreto marcaje en axones de las células granulares en las capas interna y externa de la capa polimórfica granular del giro dentado (también en el hilus), con un tenue marcaje a lo largo del *stratum radiatum* en CA1 y del *stratum oriens*, siendo muy discreto en las fibras musgosas (Persohn y Schachner, 1990; Miller y cols, 1993). Sin embargo a diferencia del marcaje evidenciado por los anticuerpos para NCAM, existe un intenso marcaje en el *stratum lacunosum moleculare*. Por otra parte, se ha evidenciado marcaje para L1 en células granulares del cerebelo de ratón (Bjerregaard y Jorgensen, 1990). También se ha detectado inmunoreactividad para L1 en otras regiones cerebrales, como en el tálamo, en el núcleo supraquiasmático, en el estriado, en la corteza frontal, en la corteza entorrinal, o el bulbo olfatorio, así como en el sistema nervioso periférico (Demyanenko y cols, 1999).

### **1.5.6. Mecanismos de señalización celular mediados por NCAM y L1**

Como consecuencia de la interacción sináptica entre las moléculas de adhesión celular, se ha descrito la activación de una cascada de señalización celular mediada por una serie de segundos mensajeros, que se describe a continuación de forma conjunta para NCAM y L1 (Crossin y Krushel, 2000).

Existen numerosas evidencias en la literatura, que ponen de manifiesto que la señalización celular mediada por moléculas de adhesión en los conos de crecimiento es absolutamente dependiente de la activación del receptor de FGF (Safell y cols, 1995, 1997; Ronn y cols, 2000 b).

Así, mediante estudios bioquímicos y farmacológicos realizados en los conos de crecimiento y en células PC12, se ha puesto de manifiesto que como consecuencia de la interacción de NCAM con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGF (Hall y cols, 1996), se produce la dimerización del receptor (Plotnikov y cols, 1999) y la activación de la actividad tirosina quinasa del mismo (Doherty y cols, 1996a). Como consecuencia de la autofosforilación del receptor FGF, es capaz de interactuar con la proteína fosfolipasa gamma. Este evento desencadena la activación de una cascada de señalización celular mediada a través de un sistema de segundos mensajeros, que se comenta esquemáticamente (ver figura 5, Walsh y cols, 1997).

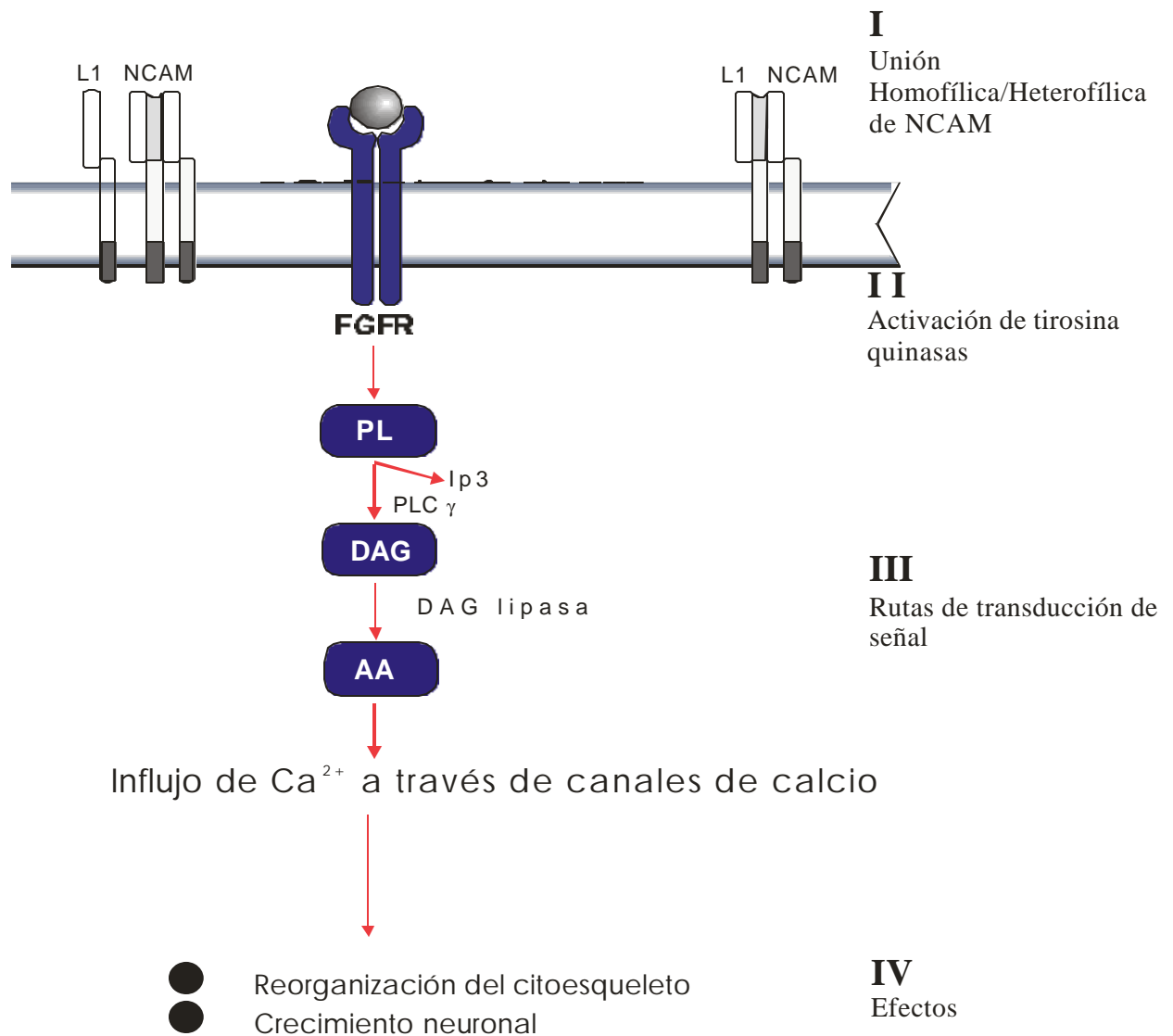
---

En dicha cascada de señalización celular, que acontece en los conos de crecimiento, el paso clave es la generación de ácido araquidónico. Así, por la acción de la fosfolipasa C gamma (PLC  $\gamma$ ) sobre el  $\text{PIP}_2$  se genera  $\text{IP}_3$  y DAG. A su vez, a partir del DAG generado por la acción de la enzima diacilglicerolipasa se genera ácido araquidónico. El ácido araquidónico, a su vez, estimula canales de calcio de tipo N y L, con lo que se produce el consiguiente influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Willians y cols, 1994a,b) que, en ultima instancia, va a constituir el evento clave para promover plasticidad sináptica (Ver figura 5).

Parece ser que aunque la activación de proteínas G no es un componente lineal de la ruta de señalización mediada por NCAM en los conos de crecimiento, el hecho de que cuando se añade toxina pertusis al medio (inhibidor de proteínas G) se bloquee el crecimiento neuronal, sugiere que las proteínas G desempeñan un papel importante en la cascada de segundos mensajeros promovida por NCAM y L1 en los conos de crecimiento (Willians y cols, 1994b).

Recientemente, se ha otorgado un papel a las MAP quinasas en el crecimiento neuronal mediado por NCAM en los conos de crecimiento. Se sabe que tanto NCAM (Miñana y cols, 2001), como L1 (Kamiguchi y cols, 1998), pueden ser endocitados a través de un mecanismo dependiente de clatrina. Así, la activación de la cascada de señalización celular mediada por la enzima MAP quinasa (MAPK) por L1 requiere la internalización de L1 (Schaefer y cols, 1999).

Se ha demostrado (i) que el crecimiento neuronal depende de la activación de la cascada de MAP quinasas y la fosforilación de CREB en cultivos células neuronales (Schmid y cols, 1999). (Kolkova y cols, 2000a), (ii) y que NCAM 140 es capaz de estimular MAP quinasa-Ras (Kolkova y cols, 2000a), (iii) y que NCAM 140 es capaz de estimular MAP quinasa-Ras y la fosforilación de CREB en cultivos de células neuronales (Schmid y cols, 1999).



**Figura 5.** En el esquema adjunto, se indica la cascada de señalización celular mediada en los conos de crecimiento, como consecuencia de la actividad del receptor de FGF por unión con NCAM o L1, cuyo efecto final es el crecimiento neural o la reorganización del citoesqueleto entre otros procesos (adaptado de Hall y cols, 1996).

(**FGFR**= Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, **PKC**= Proteína quinasa C, **PL**= Fosfatidilinositoldifosfato – PIP<sub>2</sub> -, **IP<sub>3</sub>**= Inositol Trifosfato, **DAG**= Diacilglicerol, **AA**= Ácido araquidónico, **PLC g** = Fosfolipasa C  $\gamma$ , **DAG lipasa**= Diacil glicerol lipasa.

- (i) Activación de la actividad tirosina quinasa del receptor de FGF por NCAM.

- 
- (ii) Generación de DAG por activación de PLC  $\gamma$ .
  - (iii) La enzima DAG lipasa convierte DAG a AA.
  - (iv) El AA generado activa los canales de calcio de tipo N y L, y provoca el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$

(Adaptado de Hall y cols, 1996).

- **1.5.7. Funciones de las CAMs en el sistema nervioso**

Las moléculas de adhesión celular están implicadas en muy diversas funciones, que van desde los procesos de sinaptogénesis que acontecen durante el desarrollo, hasta su participación en los mecanismos implicados en los procesos de aprendizaje y memoria en el adulto (Murase y Schuman, 1999).

Así, en lo que respecta a NCAM, sus funciones son variadas, interviniendo, de forma destacada, en las interacciones célula-célula (Rutishauser y Landmesser, 1996), la migración neuronal (Hu y cols, 1996), la defasciculación axonal (Landmeser y cols, 1990) y en los procesos de plasticidad sináptica (Cremer y cols, 1998; Ronn y cols 1998).

L1 desempeña funciones muy similares a las que desempeña NCAM en el sistema nervioso, participando en varios aspectos del desarrollo neuronal, incluidas la migración celular y la fasciculación de axones (Stallcup, 1985, 2000), y está implicada en la maduración de oligodendrocitos (Itoh y cols, 2000) y en la mielinización (Martini y Schachner, 1997), así como en el patrón de adquisición de la morfología de los conos de crecimiento (Rathjen y cols, 1992; Rutishauser, 2000a).

- **1.5.7.1. Funciones de adhesión y de reconocimiento celular**

Las interacciones adhesivas en la superficie celular son de vital importancia durante el desarrollo del sistema nervioso. Estas interacciones mediadas entre moléculas de adhesión celular, se pueden producir entre moléculas idénticas (unión homofílica) o diferentes (unión heterofílica); así



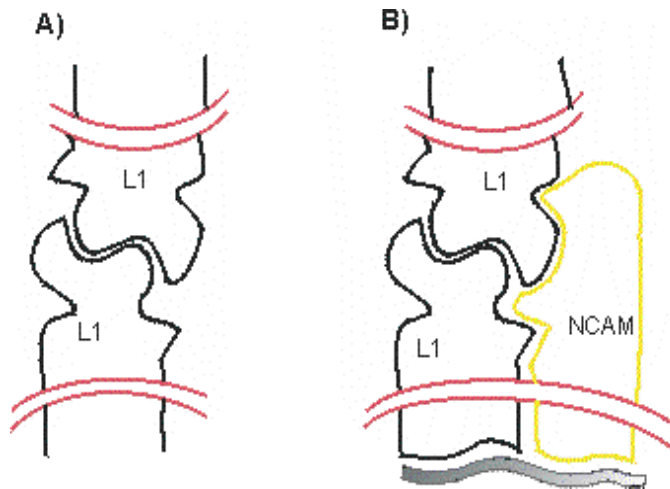
---

como en el mismo lado de la membrana -interacción en *cis*- (Brummendorf y Lemmon, 2001) o en diferentes planos en las membranas en aposición -interacción en *trans*-, (Schachner, 1997). Se trata de un mecanismo (la adhesividad a nivel de la sinapsis) que parece participar en los cambios inducidos por determinados patrones de actividad neural, que promueven plasticidad sináptica (Hoffman y Edelman, 1984).

En lo que respecta a la función de reconocimiento celular, mediada por CAMs, también se ha otorgado un papel importante a las CAMs durante la formación, el mantenimiento y el remodelamiento sináptico durante el desarrollo del sistema nervioso (Edelman y Crossin, 1991). Se ha implicado a NCAM en procesos de reconocimiento célula-célula, tanto en las interacciones neurona-neurona (Edelman, 1984), como neurona-glia (Grumet y Edelman, 1988), neurona-músculo (Grumet y cols, 1982), músculo-músculo (Covault y Sanes, 1985) y en las interacciones de las células con proteínas de la matriz extracelular (Probstmeier y cols, 1989; Rutishauser, 2000b) y con determinados sustratos (Grumet y cols, 1993a,b; Nybroe y cols, 1989).

Tanto los procesos de unión homofílica, como heterofílica, se caracterizan por su baja afinidad (Moran y Bock, 1988), lo que indica que la adhesión *per se* no es la única función de NCAM. Así, la extensión y el crecimiento de neuritas que promueve NCAM, se debe más a la señalización celular que a los procesos de adhesión. Sin embargo, la adhesión puede ser un evento necesario para que otras CAMs mantengan conexiones estables en las células, así como para la interacción de moléculas de adhesión celular con determinados componentes del citoesqueleto (Werz y cols, 1988).

Además del mecanismo de unión homofílico de NCAM con heparina (Reyes y cols, 1990), también se puede unir por mecanismos de unión heterofílica con otros tipos de moléculas, entre las que se incluyen: proteoglicanos condroitinsulfatos 3F8 (Grumet y cols, 1993a) y laminina (Grumet y cols, 1993b), entre otras. También se ha visto una interacción heterofílica de NCAM con otras glicoproteínas, como es el caso de L1 (Kadmon y cols, 1990a,b).



**Figura 6.** En la gráfica, se indican esquemáticamente en **(A)** los mecanismos de unión homofílica y en *trans*, así como **(B)** de unión heterofílica y en *cis* en membranas en aposición (adaptado de Kadmon y cols, 1990b).

Existen varios factores que modulan la adhesión celular y los eventos dependientes de reconocimiento celular mediada por NCAM, tanto a través de la unión homofílica, como heterofílica, que se indican a continuación:

- (i) Cambios en la densidad celular de NCAM, que alterarían el número de uniones homofílicas de NCAM en las membranas en aposición, los cuales dependen del control transcripcional de NCAM (Hoffman y cols, 1884).
- (ii) La redistribución celular de las diferentes isoformas (Pollerberg y cols, 1987; Persohn y cols, 1989)
- (iii) La regulación por modificaciones post-traduccionales, fundamentalmente la polisialización (Rutishauer 1996), pero también la presencia del epítipo HNK-1-que dificulta la adhesión celular- (Miura y cols, 2001).

En lo que respecta a L1, sus mecanismos de unión son similares a los de NCAM. Los procesos de unión homofílica son independientes de calcio (Kadmon y Altevogt, 1997). Varios dominios estructurales de L1 han sido implicados en el mecanismo de unión homofílica. En humanos, la capacidad de unión homofílica para L1 radica en el segundo dominio inmunoglobulina (De Angelis y

---

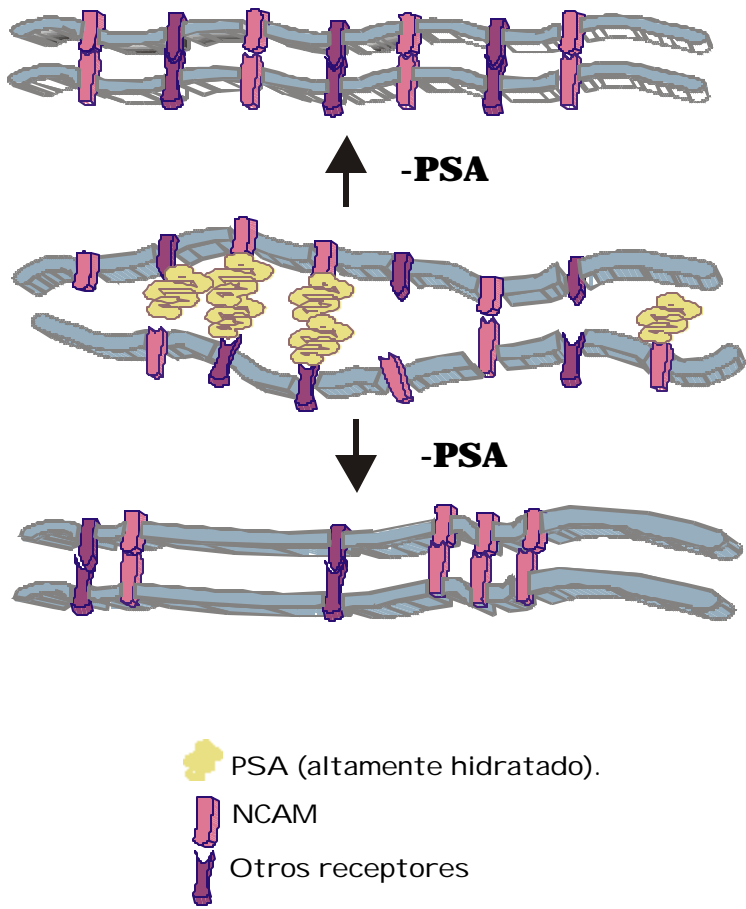
cols, 1999). A diferencia de otras moléculas de adhesión celular, la función de adhesión para los miembros de la familia de L1 es relativamente independiente de los dominios citoplasmáticos y de su interacción con elementos del citoesqueleto (Wong y cols, 1995a). No obstante, estudios "in vivo", han mostrado una capacidad de unión homofílica diferente en los distintos dominios estructurales, ya que tanto los dominios Ig I e Ig II, como el dominio fibronectina tipo III, son fuertemente homofílicos, a diferencia los dominios II-IV y fibronectina 15 repetidos que muestran una discreta capacidad de unión homofílica, que es prácticamente ausente en los dominios Ig V-VI (Holm y cols, 1995).

Por otra parte, L1 puede presentar unión heterofílica con la molécula de adhesión celular DM-GRASP (DeBernardo y Chang, 1996), con las proteínas ancladas a GPI denominadas F3/F11 (Morales y cols, 1993) y con axonina-1/TAG-1 (Kuhn y cols, 1991). Otros ligandos que también interaccionan con miembros de la familia L1 son la proteínas de la matriz extracelular laminina (Berardi y cols, 1999) y ankirina (Needham y cols, 2001) y los proteoglicanos de tipo condroitin sulfatos neurocan y fosfocan (Friedlander y cols, 1994).

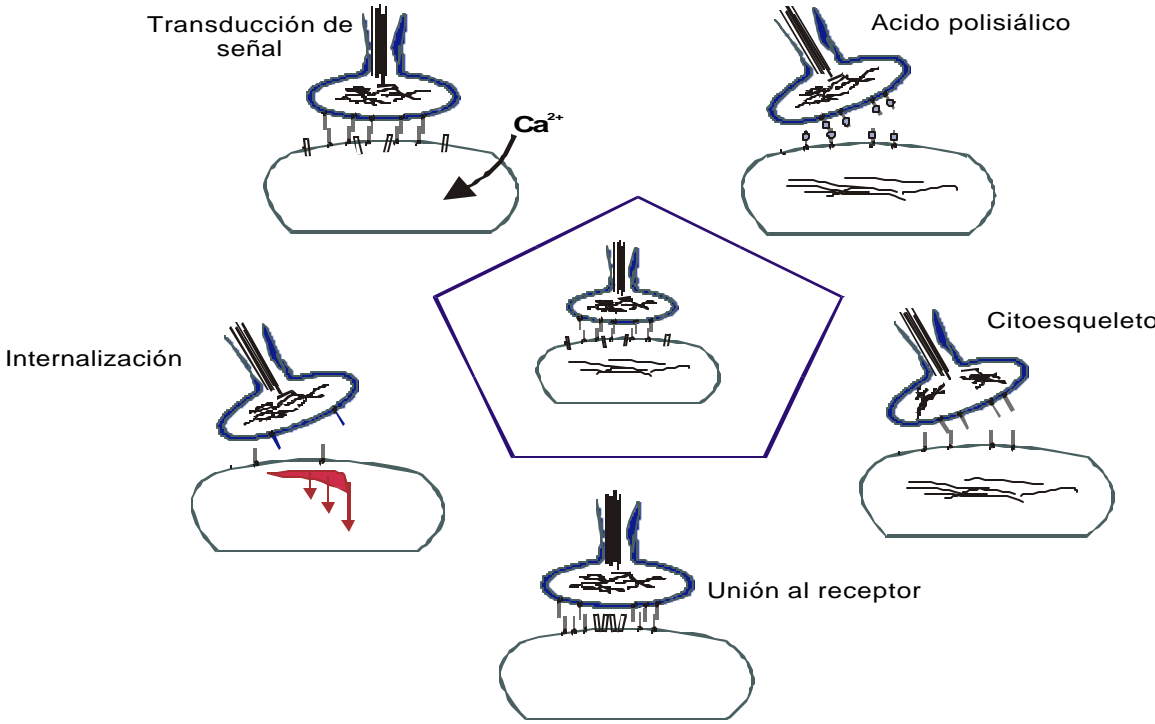
Se sabe que las interacciones heterofílicas de NCAM con L1 en *cis* potencian la eficacia de unión homofílica de L1 (Kadmon y cols, 1990b; ver figura 6). Parece ser que la unión heterofílica entre ambas moléculas se realiza a través de una secuencia de residuos de serina y treonina presentes en los oligomanósidos que porta L1 (Horstkorte y cols, 1993; Heiland y cols, 1998). Por otra parte, se ha visto que la eliminación de los restos de ácido polisiálico de NCAM -mediante tratamiento con la enzima Endo N-, parece potenciar la adhesión mediada por L1 (Acheson y cols, 1991).

#### **1.5.7.1.1. PSA-NCAM como modulador de la adhesión celular**

PSA-NCAM inhibe la adhesión celular interfiriendo con la unión homofílica y/o heterofílica de las CAMs (Rutishauser, 1996). Ello es debido a la impedancia estérica que provoca la presencia del ácido polisiálico (Rutishauser y Landmesser, 1996), siendo la adhesión celular inversamente proporcional al grado de polisialización de NCAM (Rutishauser, 1996, ver figura 7). Por tanto, la presencia de restos de ácido polisiálico en la parte extracelular de NCAM actúa como elemento regulador de los mecanismos de adhesión de dos maneras diferentes: (i) regulando la adhesión en las membranas en aposición (Rutishauser, 1996, ver figura 7) y, (ii) regulando la habilidad de las células para transducir una cascada de segundos mensajeros acoplada a NCAM en respuestas de crecimiento neuronal -como consecuencia de la adhesión- (Aplin y cols, 1999, ver figura 8).



**Figura 7.** En la figura adjunta se indica gráficamente el mecanismo por el cual PSA-NCAM modula la adhesión celular, adaptado de Kiss y Rougon, 1997, **PSA=** Ácido polisiálico).



---

**Figura 8.** En la figura adjunta se indican los procesos de de-adherencia sináptica, así como las interacciones con el citoesqueleto y la señalización celular como consecuencia de la adhesión mediada por CAMs (adaptado de Fields e Itoh, 1996).

### **1.5.7.2. Papel de las CAMs en los procesos de crecimiento neuronal**

Las diferentes isoformas de NCAM difieren en su capacidad inductora de crecimiento neuronal (ver figura 9). A diferencia de NCAM 180, que muestra una pobre capacidad neuritogénica (Doherty y cols, 1990), las isoformas presinápticas de NCAM 120 y, sobre todo, NCAM 140, estimulan el crecimiento de neuritas (Doherty y cols, 1992). Así, se ha identificado una secuencia de aminoácidos en el dominio citoplasmático de NCAM 140 kDa que es esencial para la actividad neuritogénica (Kolkova y cols, 2000b).

Por otra parte, la presencia del exón VASE en NCAM reduce dramáticamente la capacidad neuritogénica de esta molécula (Walsh y cols, 1992; Saffell y cols, 1994), sobre todo de NCAM 140 (Doherty y cols, 1992), mientras que la presencia de PSA en NCAM constituye un promotor de plasticidad neural (Ronn y cols, 1997; Cremer y cols, 2000).

Por otro lado, en cultivos de neuronas de hipocampo, se ha visto que el ATP extracelular puede inducir también crecimiento neuronal, a través de un mecanismo de señalización celular mediada por la interacción homofílica de NCAM con el receptor de FGF (Skladchikova y cols, 1999). Además, el ATP extracelular previene la secreción de NCAM desde las membranas sinápticas, protegiendo, de este modo, a NCAM de la proteólisis extracelular (Dzandzhugayan y Bock, 1993).

<b>Isoforma de NCAM</b>	<b>de</b>	<b>Crecimiento de Neuritas</b>
<b>NCAM 120</b>		++++
<b>NCAM 140</b>		++++
<b>NCAM 140+VASE</b>		+

- 
- ++++ Máxima capacidad de crecimiento neuronal.
  - + Mínima capacidad de crecimiento neuronal.

**Figura 9.** Las isoformas de NCAM muestran una diferencial capacidad inductora del crecimiento de neuritas, de forma que la presencia de VASE produce un decremento de la capacidad inductora de crecimiento neuronal (adaptado de Doherty y cols, 1995a).

- **1.5.8. Papel de las CAMs en procesos de plasticidad sináptica**

A continuación, se describen las implicaciones de las moléculas de adhesión celular neural, NCAM, PSA-NCAM y L1, en procesos de plasticidad sináptica.

- **Papel de las CAMs en el remodelamiento sináptico**

El reconocimiento y la adhesión celular desempeñan un importante papel durante la formación, el mantenimiento y la regeneración del sistema nervioso ante daño tisular. Las CAMs se consideran importantes marcadores de remodelamiento sináptico en el adulto (Jorgensen, 1995). Incluso en el cerebro adulto, sinapsis viejas son continuamente reemplazadas por nuevas sinapsis en un proceso de remodelamiento sináptico, que puede ser potenciado bajo situaciones de daño tisular (Aubert y cols, 1998; Fox y cols, 2001). Si se compara el contenido de NCAM en las sinapsis, las nuevas sinapsis están enriquecidas en NCAM y deplecionadas en proteína D3 (sinaptofisina 25), a diferencia de las sinapsis viejas, que tienen más D3 y menos NCAM (Jorgensen, 1995). Por otra parte, se ha visto que la expresión de NCAM 180 en el hipocampo y de NCAM 140 en el telencéfalo está reducida en ratones envejecidos (Bahr y cols, 1993; Ronn y cols, 2000a), lo que podría estar relacionado con una capacidad de remodelamiento sináptico reducida (Linnemann y cols, 1993).

Se sabe que la forma polisializada de NCAM constituye un marcador de plasticidad sináptica, siendo PSA-NCAM necesario para el mantenimiento y/o reorganización de sinapsis (Kiss y Rougon, 1997). A lo largo del desarrollo, la pérdida de formas ricas en ácido polisialílico en NCAM, a formas con bajo contenido en PSA, refleja una pérdida de la capacidad de plasticidad sináptica y, por tanto,

---

supone el establecimiento de sinapsis relativamente estables (Doherty y cols, 1995a). Por otra parte, se ha observado un decremento en los niveles de PSA-NCAM en neuronas y en glia del giro dentado de ratas envejecidas (Fox y cols, 1995b). Numerosos trabajos en la literatura han puesto de manifiesto que la presencia de PSA en NCAM es necesaria para que se produzca el crecimiento neuronal y la extensión de neuritas (Wang y cols, 1994, 1996). Por otro lado, se ha visto que una forma soluble de L1 es capaz de promover el crecimiento neuronal (Sugawa y cols, 1997).

- **Implicación de las CAMs en la LTP**

En la LTP se produce un remodelamiento sináptico en el que participan las moléculas de adhesión celular neural (Muller y cols, 1996; Bliss y cols, 2000), habiendo sido implicadas tanto en la inducción como en el mantenimiento de dicho fenómeno de potenciación sináptica (Muller y cols, 1996).

Así, estudios con preparaciones hipocampales *in vitro*, han puesto de manifiesto que la administración de anticuerpos contra NCAM (Ronn y cols, 1995) o L1 (Bliss y cols, 2000) reduce significativamente la LTP en CA1 de hipocampo, sin alterar los parámetros de transmisión basal (Luthi y cols, 1994, 1996). Es interesante señalar que, recientemente, se ha demostrado que ratones transgénicos deficientes en NCAM muestran alteraciones en la LTP en cultivos de preparaciones organotípicas de hipocampo, que pueden ser revertidas mediante la administración de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) en el área CA1 hipocampal, pero no por otras neurotrofinas, como la NT-4/5 (Muller y cols, 2000). Por otra parte, ratones mutantes deficientes para L1, muestran una LTP reducida en CA1, sin mostrar alteraciones en las propiedades sinápticas basales (Bliss y cols, 2000).

Otras evidencias indican que, tras la inducción de la LTP en la capa molecular del giro dentado de ratas adultas, la expresión de NCAM 180 se ve aumentada en los sitios de contacto postsinápticos (Schuster y cols, 1998). Otra serie de estudios con ratones transgénicos con una delección del gen que codifica para NCAM muestran una LTP alterada en CA3 y en CA1 (Eckhardt y cols, 2001).

Por otra parte, se ha observado que la inducción de la LTP en el giro dentado, está asociada con una aparición transitoria de un fragmento de NCAM de 115 Kda en el espacio extracelular, con lo que se sugiere una actividad proteolítica potenciada (Fazeli y cols, 1994). El significado funcional del incremento en la actividad proteolítica estriba en que podría eliminar NCAM de la sinapsis, con lo que se provocaría la de-adherencia de las sinapsis.

---

Por otro lado, también se ha otorgado un papel importante a las modificaciones post-traduccionales de NCAM, como la fucosilación y la polisialización, en la inducción y el mantenimiento de la LTP. Parece ser que, tanto la L-fucosa, como la 2'-fucosil-lactosa prolongan el mantenimiento de la LTP, mientras que la 2-deoxy-galactosa (inhibidor de la fucosilación) inhibe tanto el mantenimiento de la LTP, como la consolidación de la memoria a largo plazo (Krug y cols, 1994).

Respecto a la polisialización de NCAM, se ha visto en el hipocampo que la eliminación enzimática del ácido polisialílico, mediante tratamientos con la enzima Endo N, bloquea la LTP en el área CA1 (Muller y cols, 1996), lo que confirma un importante papel de PSA en la LTP. Recientemente, mediante el empleo de animales transgénicos para la polisialiltransferasa ST8SiaIV/PST-1, se ha puesto de manifiesto que la presencia de PSA en NCAM es necesaria para que se induzcan procesos de plasticidad sináptica en las fibras colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1, ya que dichos animales muestran tanto una LTP, como un LTD alterada en tales circuitos (Eckhardt y cols, 2000).

Dado que los receptores de NMDA son requeridos para la inducción de la LTP y que residuos de ácido siálico modulan las propiedades de unión de receptores de glutamato de tipo AMPA (Hoffman y cols, 1997), se ha sugerido que podría existir una relación entre la activación de receptores de NMDA durante la inducción de la LTP y la modulación de la adhesión celular a nivel de la sinapsis (Hoffman y cols, 1998). Por otra parte, el promotor de NCAM puede ser regulado por glutamato, ya que la estimulación de receptores de AMPA por ampakinas activa el promotor de NCAM en preparaciones de tejidos (efecto que es reducido por la administración del antagonista de AMPA denominado CNQX) (Holst y cols, 1998).

- **1.5.9. Implicación de las CAMs en los procesos de aprendizaje y memoria.**

Estudios realizados *in vivo*, mediante la administración intracerebroventricular de anticuerpos, han puesto de manifiesto que las CAMs participan de forma crítica en los procesos de consolidación de la memoria en roedores entrenados en diversos paradigmas conductuales. A continuación se indica el papel de dichas CAMs en procesos de aprendizaje y memoria.



---

- **NCAM**

Así, por ejemplo, en lo que respecta a NCAM, la administración de anticuerpos para esta molécula, entre 6-8 horas después de haber entrenado a las ratas en el test de evitación pasiva, inhibe la retención de dicho aprendizaje (Doyle y cols, 1992b), cuando se evalúa 48 horas post-entrenamiento, pero no a las 24 horas, ni en períodos más tempranos después del aprendizaje (Doyle y cols 1992b; Scholey y cols, 1993). Por otra parte, el mismo tipo de resultados se ha obtenido en pollos, utilizando también el test de evitación pasiva (Rose, 1995).

Recientemente, se ha demostrado que, en ratas entrenadas en el modelo de evitación pasiva, la adquisición del test es seguida por la internalización de NCAM. Además, 3-4 horas post-entrenamiento, NCAM 180 se regula a la baja en el giro dentado, como consecuencia del aumento de la proteólisis de NCAM producida por su ubiquitinización (Foley y cols, 2000).

Ratones transgénicos para NCAM muestran deficiencias de aprendizaje espacial en el paradigma del laberinto acuático de Morris. Sin embargo, no se sabe si este déficit es debido a deficiencias en la plasticidad sináptica o a defectos del desarrollo (Cremer y cols, 1994). Por otra parte, también se ha implicado a las modificaciones post-traduccionales de NCAM, en concreto, la fucosilación, (Rose, 1995) y la polisialización (Regan, 1998), en la consolidación de la memoria tal como se ha comentado con anterioridad

- **PSA-NCAM**

En lo que respecta a la polisialización de NCAM, son diversos los hallazgos que apoyan su papel en la consolidación de la memoria. Así, Regan y cols, han evidenciado cambios en la polisialización de NCAM después del aprendizaje en ratas, que muestran un aumento en la frecuencia de neuronas polisializadas (PSA-NCAM) en las células granulares del giro dentado de ratas adultas, que se produce fundamentalmente 12 horas después del entrenamiento en los modelos de evitación pasiva (Doyle y cols 1992a, 1996; Fox y cols, 1995a) y del laberinto acuático de Morris (Murphy y cols, 1996, Murphy y Regan, 1999). Además, también se ha observado un aumento transitorio en la polisialización de NCAM en la corteza perirrinal y entorrinal, en el periodo de tiempo comprendido entre 10-12 horas después del entrenamiento (Murphy y cols, 1996; Fox y cols, 2000). Este hecho,

---

sugiere que durante la consolidación de la memoria, se produce la activación de una ruta corticohipocampal bidireccional (Murphy y Regan, 1998). La idea derivada de estos trabajos es que la polisialización de NCAM promueve el remodelamiento estructural subyacente a la consolidación de la memoria a largo plazo (Murphy y cols, 1996; Murphy y Regan, 1998).

Además, estudios interventivos en los que se eliminaron enzimáticamente los residuos de ácido polisialico con Endo N, han puesto de manifiesto que las ratas presentaban déficits en la adquisición y en la consolidación de memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Becker y cols, 1996). Sin embargo, otra serie de trabajos no han mostrado relación alguna entre los déficits de aprendizaje espacial evidenciados en ratas entrenadas en el laberinto acuático de Morris y los cambios en la polisialización de NCAM en el hipocampo de ratas envejecidas (Abrous y cols, 1998).

- **L1**

Diversos estudios han mostrado un papel de la molécula de adhesión L1 en procesos que implican la formación de la memoria en varias especies animales, como pollos de 1 día de edad (Scholey y cols, 1995), ratas (Arami y cols, 1996), e incluso peces (Pradel y cols, 2000), ya que la administración intracerebral de anticuerpos contra L1 dificulta la consolidación de la memoria en diversos paradigmas conductuales (Luthi y cols, 1994).

En esta línea, se ha visto en el modelo de evitación pasiva en pollos que la administración intracerebral de la fracción Ig HIV de L1, 30 minutos preentrenamiento, -pero no 5,5 horas post-entrenamiento- produjo amnesia cuando se evaluó la consolidación de memoria 24 horas post-entrenamiento (Rose, 1995). Sin embargo, la inyección intracerebroventricular del dominio fibronectina sólo produjo amnesia 5,5 horas después del entrenamiento, pero no cuando se inyectó 30 minutos preentrenamiento (Rose, 1995; Scholey y cols, 1995). Por tanto, se sugiere que los dominios inmunoglobulina de L1 participan en la adhesión, mientras que los de tipo fibronectina III repetidos están implicados en la adquisición de la memoria de corto a medio plazo (Rose, 1995).

Por otra parte, se ha demostrado que ratones transgénicos que expresaban ectópicamente L1 en sus astrocitos, desarrollaban estrategias de aprendizaje espacial más eficientes en el laberinto acuático de Morris, ya que aprendían mejor (más rápido) la localización de la plataforma sumergida (Wolfer y cols, 1998). Además, se ha visto que ratones envejecidos (de casi 2 años de edad) que sobreexpresaban

---

ectópicamente L1 aprendían mucho mejor la tarea de aprendizaje espacial que los controles (Arami y cols, 1996).

- **1.6. Fisiopatología asociada a la expresión alterada de las CAMs en el sistema nervioso**

A continuación, se indican las consecuencias que ocasiona la deficiencia de NCAM y de L1 en situaciones patológicas y de daño tisular, en las que se produce una disregulación en la expresión de las moléculas de adhesión celular neural en el sistema nervioso.

- **Fisiopatología relacionada con la expresión de NCAM**

Se han observado alteraciones en la expresión génica de NCAM en varias patologías del sistema nervioso, incluidos diversos desórdenes bipolares y en esquizofrenia (Vicente, 1997; Vawter, 2000). En el hipocampo de pacientes con desordenes bipolares, esquizofrénicos y personas que murieron por suicidio, se ha visto un incremento del exón VASE en NCAM 140 (Wawter y cols, 1998). Otros estudios han evidenciado un aumento de una isoforma de NCAM soluble en el hipocampo de pacientes esquizofrénicos, junto con una disminución en la polisialización de NCAM en la corteza prefrontal (Ni Dhuill y cols, 1999), lo que sugiere la hipótesis de que, en la esquizofrenia, se produzca un patrón de expresión de NCAM alterado en el desarrollo embrionario. También se ha observado una expresión de NCAM decrecida en el autismo (Plioplys y cols, 1990)

Por otra parte, se ha evidenciado una desorganización en las fibras inmunoreactivas para PSA-NCAM en pacientes con Alzheimer en el subículo, en CA1 y en la corteza entorrinal (Mikkonen y cols, 1999). También se ha demostrado la existencia de un remodelamiento en los circuitos neuronales en el lóbulo temporal medial de pacientes con epilepsia, donde existe un aumento en la expresión de PSA-NCAM en el hipocampo y en el corteza entorrinal (Mikkonen y cols, 1998). Además, una isquemia provocada en gergos también produce un aumento en la polisialización de NCAM (Fox y cols, 20001).

---

- **Fisiopatología relacionada con la expresión de L1**

Se han descrito varias patologías parcialmente solapantes en humanos como consecuencia de la deficiencia en la expresión de la molécula de adhesión L1 (Kenwrick y cols, 2000). Las alteraciones neurológicas provocadas por éstas patologías son consecuencia de mutaciones en el gen de L1, localizado en el cromosoma X en humanos (Bateman y cols, 1996) y en roedores (Dahme y cols, 1997). Así, bajo la denominación de *CRASH* se engloba el conjunto de manifestaciones clínicas provocadas por la deficiencia de L1, que se caracterizan por hipoplasia del cuerpo caloso, retraso mental (Wong y cols, 1995b), e hidrocefalia (Kenwrick y Doherty, 1998) y que se solapan con las manifestaciones que sufren neonatos con el síndrome alcohólico fetal (FAS), donde se ha visto que el alcohol inhibe la función de L1 (Ramanathan y cols, 1996). Por otra parte, también, se ha visto un aumento en los niveles de L1 soluble en patologías como la esquizofrenia (Vawter, 2000).

- **1.7. FISIOLOGÍA DEL ESTRÉS**

Los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos y sistemas adaptativos que les permiten mantener la homeostasis y adaptarse ante las condiciones fluctuantes del medio externo (Johnson y cols, 1992). A continuación, se indican los dos principales sistemas fisiológicos implicados en la respuesta de estrés: sistema nervioso autónomo y el eje hipotalámico-hipofisario adrenal.

- 1.7.1. Sistema nervioso autónomo**

El hipotálamo constituye un área cerebral clave en el control del sistema nervioso autónomo, ya que integra la información sensorial y visceral, y modula la actividad de éste. No obstante, otra serie de estructuras también participan en su control. Consta de dos divisiones principales: el sistema nervioso simpático, que excita los órganos, y el parasimpático, que los inhibe. El sistema nervioso autónomo se activa, entre otras circunstancias, ante una respuesta de estrés o excitación, un estado de alerta o alarma, o la exposición a un ambiente novedoso (Schafer y Stein, 1998). Se trata, fundamentalmente, de un sistema noradrenérgico, aunque también puede activar las glándulas suprarrenales, liberando

---

adrenalina y noradrenalina al torrente circulatorio. Mediante la liberación de adrenalina, se movilizarán las reservas energéticas para obtener energía.

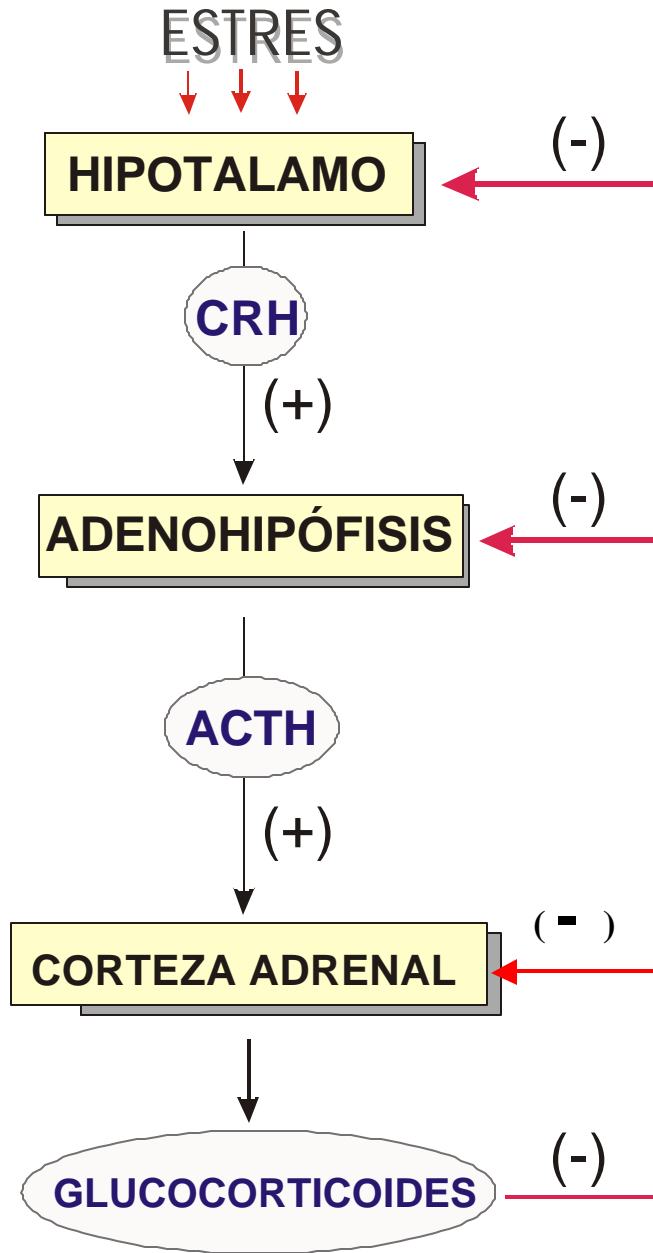
### **1.7.2. Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal**

El eje hipotalámico hipofisario adrenal (HHA) participa de forma crucial en la respuesta de estrés (Herman y Cullinan, 1997). El eje HHA es un sistema que integra tres estructuras diferentes: el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas suprarrenales, que liberan diferentes hormonas: CRH, ACTH y corticosteroides, respectivamente.

La activación de este eje HHA, ante una respuesta de estrés, comienza con la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF), por neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo. El CRH se libera a los vasos portales, atraviesa la eminencia media, y llega de la hipófisis anterior, donde estimula la secreción de la hormona adenocorticotropa o ACTH (Rivier y Vale, 1983). La hormona ACTH se sintetiza a partir de la molécula denominada proopiomelanocortina, alcanzándose un pico en los niveles de ACTH entre 10-15 minutos después de la respuesta inductora de estrés. La hormona ACTH, liberada al torrente sanguíneo, es capaz de estimular en las glándulas suprarrenales la liberación de corticosterona (ratas), o de cortisol (humanos). Por ello, la consecuencia final de la activación del eje HHA es la liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo (para revisión consultar De Kloet y cols, 1998; Garcia y cols, 2000).

Por otra parte, el eje HHA se regula por un mecanismo de retroalimentación negativa, que se ejerce fundamentalmente a tres niveles: el hipocampo (Jacobson y Sapolsky, 1991) el núcleo paraventricular del hipotálamo y la adenohipófisis, siendo la actividad del eje HHA inhibida por los propios glucocorticoides (Sapolsky y cols, 1984, 1986; Ver figura 10). No obstante, otras áreas cerebrales, como la amígdala, también pueden controlar la reactividad del eje HHA ante la respuesta de estrés (Feldman y Weidenfeld, 1996).

A continuación, se describen brevemente las características estructurales y funcionales de los glucocorticoides, como principal hormona implicada en la respuesta de estrés.



**Figura 10.** Esquema que muestra el mecanismo de retroalimentación negativa que ejercen los glucococorticoides sobre el eje HHA, para modular la actividad del eje y regular su propia liberación (**CRH**= Factor liberador de corticotropina, **ACTH**= Hormona Adrenocorticotropa, (+) **HHA**= Eje Hipotálamo-Hipofisis-adrenal, estimula, (-) Inhibe, adaptado de de Kloet y cols, 1998).

---

- **1.7.3. Los glucocorticoides**

Junto con los mineralocorticoides (aldosterona, por ejemplo), los glucocorticoides se liberan por la acción de la ACTH sobre las glándulas adrenales. Los glucocorticoides son hormonas de naturaleza esteroidea sintetizadas en la zona *fasciculata* y *reticularis* de la corteza suprarrenal (Ganong y cols, 1974), a partir del colesterol. Las células de la corteza suprarrenal son estimuladas por la hormona ACTH, que induce a la enzima desmolasa, y forma pregnenolona, que se metaboliza a progesterona. Finalmente, la progesterona, según la especie animal, se convierte a 11-deoxicorticosterona (Feder, 1981), que forma corticosterona, y ésta se transforma en aldosterona, o bien 11-deoxicortisol que da lugar al cortisol en primates y humanos. La corticosterona es sintetizada en roedores, aves, y reptiles.

Los glucocorticoides, dado su carácter lipofílico se transportan en plasma ligados a la proteína denominada globulina ligante de corticosterona (CBG) o transcortina, aunque una mínima parte es transportada por la albúmina (Dhabhar y cols, 1993). Así, en humanos, el 70% del cortisol circulante es transportado por la transcortina (proteína plasmática), mientras que la albúmina transporta el 20% del cortisol plasmático restante (Tinnikov y cols, 1999).

Los glucocorticoides intervienen en la regulación del eje, en la glucogenolisis hepática, en el metabolismo energético de la glucosa para la movilización de recursos, activan numerosas enzimas y proteínas (Munck y cols, 1986), y son inmunosupresores de la respuesta inmune (McEwen y cols, 1997).

### **1.7.3.1 Receptores de glucocorticoides**

Existen dos tipos de receptores de glucocorticoides: los receptores de mineralocorticoides o de tipo I (para revisión consultar Reul y cols, 2000) y los receptores de glucocorticoides o de tipo II (Reul y de Kloet, 1986). Ambos receptores son el producto de genes diferentes y pertenecen a la familia de receptores nucleares, actuando como factores de transcripción (para revisión consultar Gilner y cols, 1987). Presentan un dominio de unión al DNA y una zona de activación transcripcional, y muestran una

---

alta homóloga en el dominio de unión a la hormona (57 %), (Evans y Arriza, 1989), pero no en el dominio de activación transcripcional (Arriza y cols, 1987).

Se ha estudiado ampliamente la localización y distribución de las hormonas glucocorticoideas y de sus dos tipos de receptores en diversas áreas cerebrales (Reul y de Kloet, 1985), si bien de modo especial en el hipocampo (Jacobson y Sapolsky, 1991). El receptor de glucocorticoides se localiza abundantemente en estructuras del sistema límbico (Meaney y cols, 1985a,b), como el hipocampo, la amígdala (núcleo central), así como en el núcleo paraventricular, supraóptico y arcuado del hipotálamo, tanto en neuronas como en glia (Cintra y cols, 1994a,b). Regiones con niveles más moderados de receptores de tipo II son la zona basolateral de la amígdala, la corteza cerebral, el tálamo y el tronco cerebral (Fuxe y cols, 1987; Spencer y cols, 1991). El receptor de mineralocorticoides se localiza más confinadamente en ciertas áreas cerebrales, siendo también abundante en el hipocampo, encontrándose niveles considerables también en la amígdala central, el hipotálamo anterior (Alexis y cols 1982, 1983) y en áreas circunventriculares (Reul y de Kloet, 1986; De Kloet, 1990). Por tanto, el hipocampo, especialmente, es el área con la proporción más abundante tanto de receptores de mineralocorticoides, como de glucocorticoides (Van Eekelen y cols, 1988).

Los receptores de glucocorticoides o de tipo II muestran una baja afinidad para la corticosterona, y solamente están máximamente ocupados durante una situación de estrés y en el pico circadiano, cuando los niveles de corticosterona son elevados (Reul y cols, 1987a,b)

Los receptores de tipo I o de mineralocorticoides, además de su afinidad por la aldosterona, muestran de 10 a 20 veces más afinidad por la corticosterona que los de tipo II (Reul y cols, 1985), por lo que el receptor de mineralocorticoides se encuentra saturado durante los picos de secreciones circadianos (Reul y cols, 1987a), y en una situación estrés (Deak y cols, 1999).

### **1.7.3.2. Mecanismo de acción de los glucocorticoides**

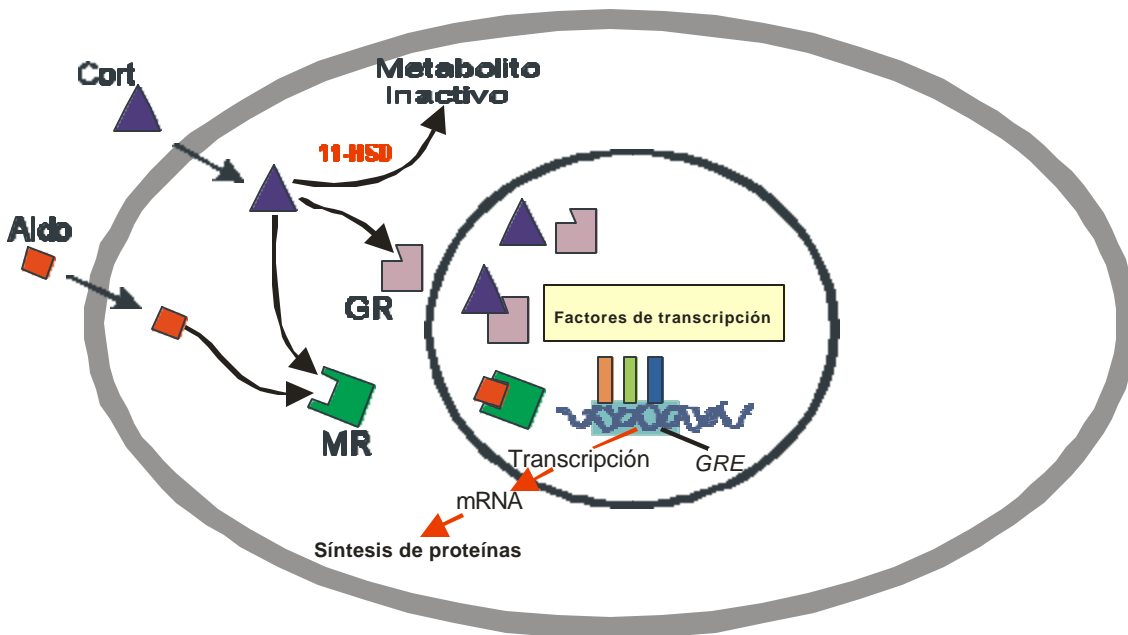
Clásicamente, las acciones de los glucocorticoides se desarrollan a través de sus mecanismos genómicos, pero también se han descrito algún tipo de acciones no genómicas, que se describen a continuación.



- **Acciones genómicas**

Los glucocorticoides, dado su carácter lipofílico, atraviesan fácilmente la membrana plasmática de la célula, y se unen a receptores intracelulares específicos, formando un complejo hormona-receptor, que es capaz de modular la expresión de determinados genes. Estos receptores forman parte de un complejo multiproteico de receptores denominados proteínas de choque térmico o HSP (del inglés, *heat shock protein*) (para revisión consultar Feder y Hoffman, 1999). Por tanto, los receptores de glucocorticoides están inactivos en condiciones basales, ya que están unidos a las proteínas de choque térmico.

Cuando un agonista (como la corticosterona) accede al cerebro y se une a un receptor, se provoca la disociación de la proteína HSP y se produce una fosforilación múltiple, que en el núcleo incrementa la afinidad del complejo receptor-ligando por dominios nucleares -denominados elementos de respuesta a glucocorticoides o secuencias GRE- (Slater y cols, 1994). De esta forma, se modula (aumenta o disminuye) la transcripción de determinados genes (O'Malley y Tsai, 1992, ver figura 12).



**Figura 12.** En la figura adjunta se muestra el mecanismo de acción genómico de los glucocorticoides, que promueve la transcripción de genes importantes en la respuesta de estrés (adaptado de O'Malley y Tsai, 1992).

---

**Cort**= Corticosterona, **Aldo**= Aldosterona, **11-HSD**=11  $\beta$  hidroxilasa.  
**MR**= Receptores de mineralocorticoides. **GR**=Receptores de glucocorticoides.  
**GRE**=Elementos de respuesta a glucocorticoides.

- **Acciones no genómicas**

Acciones no genómicas rápidas y transitorias se han evidenciado en anfibios (Rose y cols, 1993; Moore y Orchinik, 1994), donde la corticosterona reduce la conducta reproductiva, probablemente a través de un mecanismo dependiente de proteínas G. Se sugiere que los glucocorticoides ejercen sus acciones no genómicas mediante la interacción con proteínas de membrana (Orchinik y cols, 1991, 1994). En ratas, se ha visto que la administración de corticosterona, también reduce la liberación de vasopresina en el hipotálamo (para consultar las acciones no genómicas de la corticosterona en vertebrados revisar Borski y cols, 2000).

- **1.8. ESTRÉS Y MEMORIA**

El mero hecho de someter a los animales a una situación de aprendizaje novedosa puede constituir en si una situación ya estresante, debido a que el simple manejo de los animales y la exposición a un ambiente novedoso, puede producir tanto la activación del sistema nervioso simpático, como la liberación de corticosterona. Así pues, se plantea la siguiente cuestión: ¿hasta que punto el estrés ligado a la tarea de aprendizaje podría interaccionar con los mecanismos neurales que son responsables del almacenamiento y la consolidación de la memoria en la rata? (Sandi, 1998).

Diversos estudios han mostrado que la activación de los sistemas fisiológicos del estrés puede modular la fuerza con la que la memoria se retiene a largo plazo (Roozendaal y cols, 1997b; Sandi, 1998, Sandi y Rose 1994b). Así, son diversas las evidencias indicativas de que los sistemas adrenérgico y noradrenérgico, así como las hormonas glucocorticoides, ejercen un importante papel sobre la modulación de la memoria (Roozendaal, 1999).

---

### **1.8.1. Sistemas adrenérgico y noradrenérgico**

La liberación de adrenalina y noradrenalina, como consecuencia de la activación del sistema nervioso simpático en situaciones de estrés, puede ejercer un efecto potenciador sobre la memoria (Roosendaal y cols, 1993; Hatfield y McGaugh, 1999). Mediante el estudio de la memoria en diversos paradigmas conductuales, se ha demostrado que la adrenalina ejerce un efecto bifásico en la formación de memoria (Dalmaz y cols, 1993). Dado que la adrenalina, es una hormona que no atraviesa la barrera hematoencefálica, parece ser que los efectos facilitadores de la adrenalina sobre la memoria, podrían deberse a la liberación de glucosa o a la activación de noradrenalina en determinadas áreas cerebrales (Hall y Gold, 1986).

Una serie de evidencias otorgan un papel a la noradrenalina como neurotransmisor potenciador de la memoria en la amígdala (Ferry y McGaugh, 2000), ya que (i) la administración post-entrenamiento de noradrenalina en la amígdala modula la memoria según un patrón de U invertida (es decir, dosis bajas no producen efecto, dosis intermedias son facilitadoras de la memoria, y dosis altas son inefectivas e incluso perjudiciales (ii) la administración de noradrenalina, o de agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la amígdala, potencia la memoria, de forma dosis-dependiente, en varios paradigmas conductuales, incluidos el test de evitación pasiva y el laberinto acuático de Morris (Martynov y Bessonova, 1984; Roosendaal y cols, 1993; Quirarte y cols, 1997).

### **1.8.2. Glucocorticoides: plasticidad sináptica y memoria**

Hallazgos en animales y humanos han puesto de manifiesto que los glucocorticoides desempeñan efectos importantes sobre los procesos cognitivos (para revisión consultar de Kloet y cols, 1999). En particular, se ha propuesto que los glucocorticoides, secretados ante una situación de estrés o como consecuencia del estrés ligado a la tarea de aprendizaje, pueden modular los mecanismos neurales de formación de la memoria (Sandi y Rose, 1994b; Sandi, 1998). En esta línea, varios estudios han puesto de manifiesto una correlación directa entre los niveles circulantes de corticosterona plasmática (posteriores al entrenamiento) y la persistencia con la que se establece la memoria en distintos paradigmas conductuales, como la evitación pasiva, el laberinto acuático de Morris, o el condicionamiento del miedo al contexto (Sandi y Rose, 1994b; Sandi y cols, 1997; Cordero y cols, 1998). Además, inyecciones post-entrenamiento de agonistas de glucocorticoides pueden potenciar los

---

procesos de consolidación de la memoria (Sandi y Rose, 1994b, 1997a; Sandi y cols, 1997; Cordero y Sandi, 1998). Ahora bien, parece ser que niveles intermedios de glucocorticoides favorecerían la memoria, mientras que bajos o elevados niveles podrían dificultarla (para revisión consultar Lupien y McEwen, 1997).

Por otra parte, se ha evidenciado que la corticosterona actúa como potenciadora de la memoria en el hipocampo y en la amígdala (Quirarte y cols, 1997; Roozendaal y McGaugh, 1996, Roozendaal y cols, 1999), ya que (i) la administración de agonistas y de antagonistas de receptores de glucocorticoides en la amígdala basolateral (pero no en la amígdala central), es capaz de modular la consolidación de la memoria (Roozendaal y McGaugh, 1997b) y (ii) ratas a las que se lesionó la amígdala basolateral no muestran efectos potenciadores de la memoria, cuando se les administran glucocorticoides en el hipocampo dorsal (Roozendaal y McGaugh, 1997a).

Por otra parte, otros estudios han puesto de manifiesto que la exposición de las ratas a un ambiente novedoso (que induce la liberación de corticosterona), inhibe la expresión de LTP a largo plazo (Garcia, 2001), mientras que se observó una facilitación de la LTD (Pavlidis y cols, 1993, 1995). Además, una ocupación óptima de los receptores de glucocorticoides de tipo II facilita la LTP (Pavlidis y McEwen, 1999).

### **1.8.3. Efectos del estrés y de los glucocorticoides sobre la expresión de moléculas de adhesión celular neural en procesos de aprendizaje y memoria**

A continuación se plantea la siguiente cuestión: ¿A través de qué mecanismos producirían sus efectos el estrés y/o los glucocorticoides sobre los procesos de formación de memoria? Entre otros mecanismos, varias evidencias han puesto de manifiesto que el estrés puede modular la expresión de moléculas de adhesión celular neural en el sistema nervioso (Sandi, 1998).

En particular, se ha mostrado que los glucocorticoides, liberados ante una situación de estrés intrínseco ligado a la tarea de aprendizaje, pueden modular la síntesis de CAMs (Sandi y cols, 1995) e influenciar sus modificaciones post-traduccionales: fucosilación (Sandi y Rose, 1997b) y polisialización (Rodríguez y cols, 1998).

---

Sandi y Loscertales, han puesto de manifiesto que tratamientos agudos con corticosterona (5 o 10 mg/Kg) inducen un aumento en la expresión de NCAM en la corteza frontal 8 y 24 horas después de la inyección subcutánea de corticosterona (Sandi y Loscertales, 1999).

Además, también existen evidencias de que la corticosterona puede modular la sialización de NCAM ya que (i) en cultivos celulares, la corticosterona es capaz de modular la expresión de determinadas sialotransferasas (Coughlan y Breen, 1998; Maguire y cols, 1998). En relación con este hecho, es interesante señalar que los niveles plasmáticos de 2,6- $\alpha$ -sialotransferasa están elevados en determinados desordenes psiquiátricos, en los que existe una disregulación del eje HHA y deficiencias de memoria (Maguire y Breen, 1995; Maguire y cols, 1997) (ii) Además, como se reseñó con anterioridad, se sabe que los glucocorticoides inhiben la polisialización de NCAM en el hipocampo (Rodríguez y cols, 1998). Sin embargo, la adrenalectomía no incrementó la expresión de PSA-NCAM en el giro dentado de ratas envejecidas (Montaron y cols, 1999).

- **1.8.4. Efectos neurales del estrés crónico y mecanismos implicados**

Tal como se reseñó con anterioridad, el hipocampo es una región rica en receptores de glucocorticoides, que está sujeta a procesos de plasticidad neural (para revisión consultar Fucks y Flugge, 1998) y es capaz de responder a la acción de diversas hormonas, incluidos los glucocorticoides (McEwen y Sapolsky, 1995). De hecho, el hipocampo es especialmente vulnerable a la acción de las hormonas glucocorticoides (para revisión consultar Sapolsky, 1996, 2000), sobre todo en una situación de exposición crónica a las mismas, donde se altera el mecanismo de retroalimentación negativa del eje (Sapolsky y cols, 1986).

Los glucocorticoides pueden contribuir a la atrofia dendrítica hipocampal que existe durante el envejecimiento normal (para revisión consultar McEwen y cols, 1999; Sapolsky, 2000), ya que se ha visto que, durante el envejecimiento, los niveles elevados de cortisol predicen la atrofia hipocampal y los déficits de memoria en humanos (Lupien y cols, 1998). Además, en patologías que cursan con hipercortisolinemia, como depresión, o síndrome de Cushing, se ha observado una reducción en el volumen del hipocampo, que correlaciona con los elevados niveles de cortisol plasmático (Brown y cols, 1999).

---

En este sentido, se ha visto que ratas sometidas a estrés crónico, o que se trataron con corticosterona durante 21 días, muestran una atrofia de las dendritas apicales en CA3 (Watanabe 1992a; Magariños y cols, 1996; McEwen, 1997). Varias evidencias proponen que los glucocorticoides podrían ejercer dicha atrofia dendrítica a través de la excitotoxicidad mediada por la activación permanente de los receptores de NMDA, por glutamato, ya que (i) el pico de corticosterona coincide con la elevación de los niveles de glutamato en el hipocampo (Stein-Behrens y cols, 1994; Venero y Borrel, 1999). Además, la adrenalectomía impide la liberación de glutamato (Lowy y cols, 1993; Moghadam y cols, 1994), y (ii) los esteroides adrenales modulan la expresión de receptores de NMDA en el hipocampo, ya que la exposición crónica a glucocorticoides aumenta la expresión de los mRNA del receptor de NMDA (tanto de NR2A, como NR2B) (Weiland y cols, 1997). (iii) Recientemente, estudios de microscopia electrónica, han demostrado que el estrés crónico altera la morfología de las fibras musgosas presinápticas, produciendo una reorganización de las mismas en el estrato lucido del área CA3 hipocampal (Magariños y cols, 1997), en las que se han identificando receptores presinápticos de kainato, que producen la liberación de glutamato (Malva y cols, 1998). Además, la atrofia de las dendritas apicales en CA3 inducida por estrés crónico y tratamientos crónicos con corticosterona, se previene mediante la administración tanto de antagonistas de receptores de NMDA - como la fenitoina- (Watanabe y cols, 1992b; Reagan y cols, 1999), como de agonistas de receptores de GABA -benzodiazepinas- (Magariños y cols, 1999) o de inhibidores de la recaptación de serotonina (McKittrick y cols, 2000).

Frente a la reversibilidad del daño hipocampal producido por situaciones de estrés en torno a 3-4 semanas, si la situación de estrés crónico mantenido es superior a 3 meses se produce, normalmente, una atrofia dendrítica y muerte neuronal irreversible (McEwen, 1998).

### **1.8.5. Implicaciones del estrés crónico en paradigmas conductuales de aprendizaje y memoria**

A continuación, se indican algunas de las evidencias existentes en la literatura sobre los efectos que ejerce el estrés crónico en ratas que se entrenaron en diversos paradigmas conductuales. Dichos efectos dependen, entre otros factores, del tiempo de exposición al estímulo estresor crónico. Parece ser que existe una vulnerabilidad diferencial al estrés crónico en dos test dependientes de hipocampo, como son el condicionamiento del miedo al contexto y el laberinto acuático de Morris. En esta línea,

---

ratas estresadas crónicamente muestran un aumento en el condicionamiento de miedo al contexto bajo estrés crónico, independientemente de la atrofia dendrítica que se produce en CA3 (Conrad y cols, 1999). Sin embargo, ratas estresadas crónicamente mostraban déficits de aprendizaje espacial para localizar la plataforma en una nueva ubicación en el laberinto acuático de Morris (Cordero y cols, 1999). De forma interesante, un reciente estudio ha puesto de manifiesto que la reorganización de sinapsis que acontece después del daño inducido por estrés crónico en el hipocampo correlaciona con una mejora del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (Sousa y cols, 2000).

Por otro lado, se ha visto que la exposición a elevados niveles de corticosterona durante 3 meses produce déficits de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris en ratas envejecidas, pero no en ratas jóvenes (Bodnoff y cols, 1995). Además, se ha visto que el estrés crónico dificulta el aprendizaje espacial en el paradigma del laberinto en Y, siendo dicho efecto revertido por la administración de tianeptina (Conrad y cols, 1996).

### **1.8.6 Efectos del estrés crónico sobre la expresión de moléculas de adhesión celular neural**

Sandi y Loscertales (1999) han puesto de manifiesto que cuando se inyecta subcutáneamente corticosterona durante 21 días (a una concentración de 10 mg/Kg), se observa un descenso significativo de la expresión de NCAM en la corteza prefrontal, cuando se evalúa dicha expresión 24 horas después de la última inyección (Sandi y Loscertales, 1999). Por otra parte, como consecuencia de la exposición subcrónica durante 7 días o crónica durante 21 días mediante pellets de corticosterona (a 150 mg/Kg) se ha puesto de manifiesto la existencia de un descenso en la fucosilación de glicoproteínas en el hipotálamo (Venero y cols, 1996).

---

## **2. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS**



---

- **2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

Básicamente, los experimentos de esta Tesis, se han planteado con objeto de estudiar la posible modulación que pudiera ejercer el estrés sobre la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) en las diferentes áreas cerebrales, en ratas que se entrenaron en el paradigma del condicionamiento del miedo al contexto (CMC), bajo un estrés intrínseco ligado a la tarea de aprendizaje. También se estudiaron los posibles efectos de un protocolo de estrés crónico por inmovilización sobre la expresión de CAMs (en diversas áreas cerebrales) en ratas sometidas a inmovilización y/o entrenadas en el CMC. A continuación, se detallan estas dos diferentes líneas de trabajo.

1/ Dado el importante papel que desempeña el estrés en la adquisición y en la consolidación de la memoria (Sandi, 1998), se estudió la posibilidad de que el estrés intrínseco, ligado a la tarea de aprendizaje en las ratas entrenadas en el CMC bajo diferentes grados de estrés (0,2, 0,4 y 1 mA de intensidad del choque eléctrico utilizado en el condicionamiento como estímulo incondicionado), pudiera ejercer una modulación sobre la expresión de diversas CAMs (NCAM, su forma polisializada PSA-NCAM y L1) en distintas áreas cerebrales (hipocampo, amígdala, estriado, corteza frontal e hipotálamo). Dado que el CMC es un paradigma conductual dependiente de hipocampo, se prestó especial interés al estudio en esta región. La expresión de dichas CAMs se estudió en sinaptosomas mediante la técnica de ELISA, y a los diferentes tiempos seleccionados de nuestro estudio, es decir, 12 y 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el CMC.

- 2/ Una vez conocidos los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA para el objetivo 1, que no mostraron el aumento esperado en la polisialización de NCAM 12 horas post-entrenamiento, como mecanismo general asociado a la consolidación de la memoria, se planteó un estudio inmunohistoquímico. El objetivo consistió en determinar si, mediante dicha técnica, podríamos detectar una frecuencia de polisialización incrementada como consecuencia del entrenamiento, cuando ésta se estudió en un población celular restringida al borde entre la capa polimórfica granular y el hilus del giro dentado, tal como se ha relatado en otros paradigmas conductuales (Murphy y cols, 1996; Murphy y Regan, 1999). En concreto, se estudió la posibilidad de que la expresión de la forma polisializada de NCAM, 12 horas después del

---

entrenamiento en el CMC, bajo diferentes grados de estrés intrínseco ligado a la tarea de aprendizaje (grupos de 0,2, 0,4 y 1 mA), pudiera modularse diferencialmente en la capa polimórfica granular del giro dentado/hilus.

- 3/ Con objeto de estudiar las posibles implicaciones cognitivas de los hallazgos obtenidos en los experimentos dirigidos a evaluar el objetivo 2 (en los que se mostró una polisialización diferencial en los grupos condicionados de 0,4 y de 1 mA), se diseñó un experimento, en el que las ratas se entrenaron en dos paradigmas conductuales diferentes –CMC y laberinto acuático de Morris-. Con dicho diseño, se pretendió evaluar si el entrenamiento en el condicionamiento del miedo al contexto a las intensidades de 0,4 y de 1 mA, podría afectar diferencialmente la memoria para otro tipo de procesamiento de la información, en ratas que acababan de ser entrenadas en el laberinto acuático de Morris.
- 4/ Además, se estudió la posibilidad de que la corticosterona, liberada como consecuencia del entrenamiento, pudiera modular (revertir) la expresión hipocampal de NCAM y de su forma polisializada, inducida por el condicionamiento de miedo, 12 horas post-entrenamiento. También, se abordó desde una perspectiva conductual, la posibilidad de que la metirapona pudiera atenuar la formación de la memoria del condicionamiento del miedo. Para ello, se diseñó un experimento, en el que se inhibió la liberación plasmática de corticosterona mediante la administración subcutánea de metirapona a 100 mg/Kg (90 min pre-entrenamiento), con objeto de evaluar (i) si las memorias de miedo condicionado eran atenuadas en ratas que se entrenaron en el CMC, bajo un estrés intrínseco intenso (a 1 mA de intensidad), así como (ii) la posible modulación por dicho tratamiento de la expresión de CAMs en el hipocampo.

También se midieron los niveles de corticosterona en todos los estudios para evaluar si existía algún tipo de relación entre los niveles de dicho esteroide y la expresión de moléculas de adhesión celular neural.

- 5/ En otra línea, dado que el estrés crónico induce una atrofia dendrítica en las neuronas apicales de CA3 en ratas (Magariños y cols, 1995a, Magariños y cols, 1999), que podría reflejarse en posibles alteraciones conductuales, se estudiaron los posibles efectos que el estrés crónico y/o el condicionamiento del miedo al contexto pudieran inducir sobre la expresión de moléculas de adhesión celular neural en las regiones cerebrales analizadas en nuestro estudio (hipocampo, amígdala, corteza frontal, estriado e hipotálamo). Para ello, seguimos un

---

protocolo de estrés crónico por inmovilización (21 días de duración y con una frecuencia diaria de 6 horas) y/o entrenamiento subsiguiente en el test de condicionamiento del miedo al contexto, evaluándose, 24 horas después del entrenamiento, la expresión de CAMs (NCAM, su forma polisializada, PSA-NCAM, y L1) en las diferentes regiones cerebrales analizadas. También se estudio el impacto del estrés crónico sobre las variables conductuales y fisiológicas (el peso corporal y el peso relativo del timo).

---

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Se utilizaron exclusivamente ratas macho de la cepa Wistar (*Ratus norvegicus albinus*), adquiridas tanto en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, como en la empresa Harlan Ibérica y se mantuvieron en el animalario del Dpto de Psicobiología de la UNED. Las ratas pesaron 150-170 gramos a su llegada al estabulario, y se mantuvieron en grupos de tres animales por jaula, en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (con el comienzo de la fase de luz a las 07:00 horas de la mañana), y a  $22 \pm 2$  °C de temperatura, con acceso libre a agua y comida. La alimentación consistió de una dieta sólida de pienso compuesto. El agua se administró de forma automática por succión de los biberones.

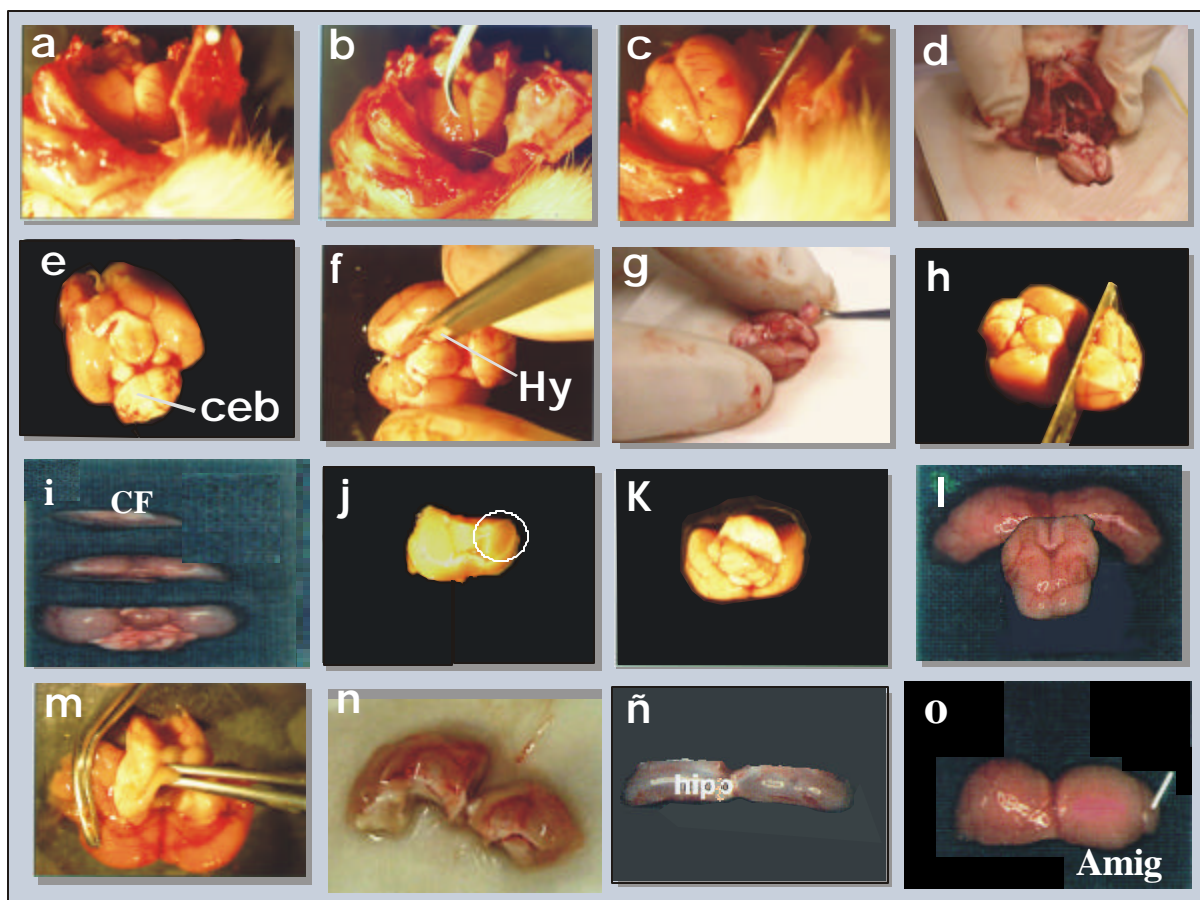
Las ratas se estabularon en grupos de 3-4 animales por caja, cuyo fondo se cubrió por una capa abundante de serrín con el objeto de proporcionar un buen grado de absorción de elementos líquidos. En el experimento en el que las ratas se sometieron a estrés crónico (estrés extrínseco), el procedimiento de estrés comenzó cuando las ratas tenían un peso aproximado de  $350 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$ . Las ratas se pesaron semanalmente. Aproximadamente cinco semanas después de su llegada al laboratorio, se sometieron a un corto período de manipulación durante los cuatro días previos al comienzo del experimento.

Los experimentos conductuales se realizaron en la mayoría de las ocasiones entre las 8:00 y las 14:30 horas (exceptuándose algunas de las pruebas realizadas para estudiar las consecuencias neurobiológicas y conductuales 12 horas después del entrenamiento), minimizándose en la medida de lo posible el sufrimiento de los animales en base a las directrices del Consejo de la Comunidad Económica Europea.

## 3.2. PROCEDIMIENTOS BIOQUÍMICOS

### 3.2.1. Procedimiento de disección de las diferentes regiones cerebrales

En el fotomontaje adjunto se indican los pasos seguidos en la disección de cada una de las regiones cerebrales estudiadas en esta tesis (Ver fotomontaje de la figura 1)



**Figura 1.** Tras extraer el cerebro completo de la caja craneana (pasos a-e), se obtiene el Hipotálamo (pasos f-g), la corteza frontal (pasos h-i), el estriado (paso i), así como el Hipocampo (pasos k-ñ) y la amígdala (paso o). Todas las regiones se almacenaron en eppendorfs a 80 ° C para su posterior procesamiento.

(**Ceb**= Cerebelo **Hy**= Hipotálamo, **CF**= Corteza frontal, **Hp**= Hipocampo, **Amig**= Amígdala).

---

### **3.2.2. Proceso de obtención de sinaptosomas crudos por centrifugación diferencial**

Se procedió a homogeneizar cada una de las regiones cerebrales diseccionadas con la ayuda de un homogeneizador manual de cristal, de 1 ml de capacidad. Para ello, se introduce el tejido *in situ* en el fondo del mismo con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico, y con el émbolo del homogeneizador se rompe -homogeneización en un volumen de tampón Krebs de lisis a pH=7 (de 0,5 a 1 ml según la muestra), que está constituido por sacarosa 0,32 M, HEPES 5 mM y un coctel de inhibidores de proteasas (Complete TM, Boehringer Mannheim España; 1 pastilla de inhibidor por cada 50 ml de tampón).

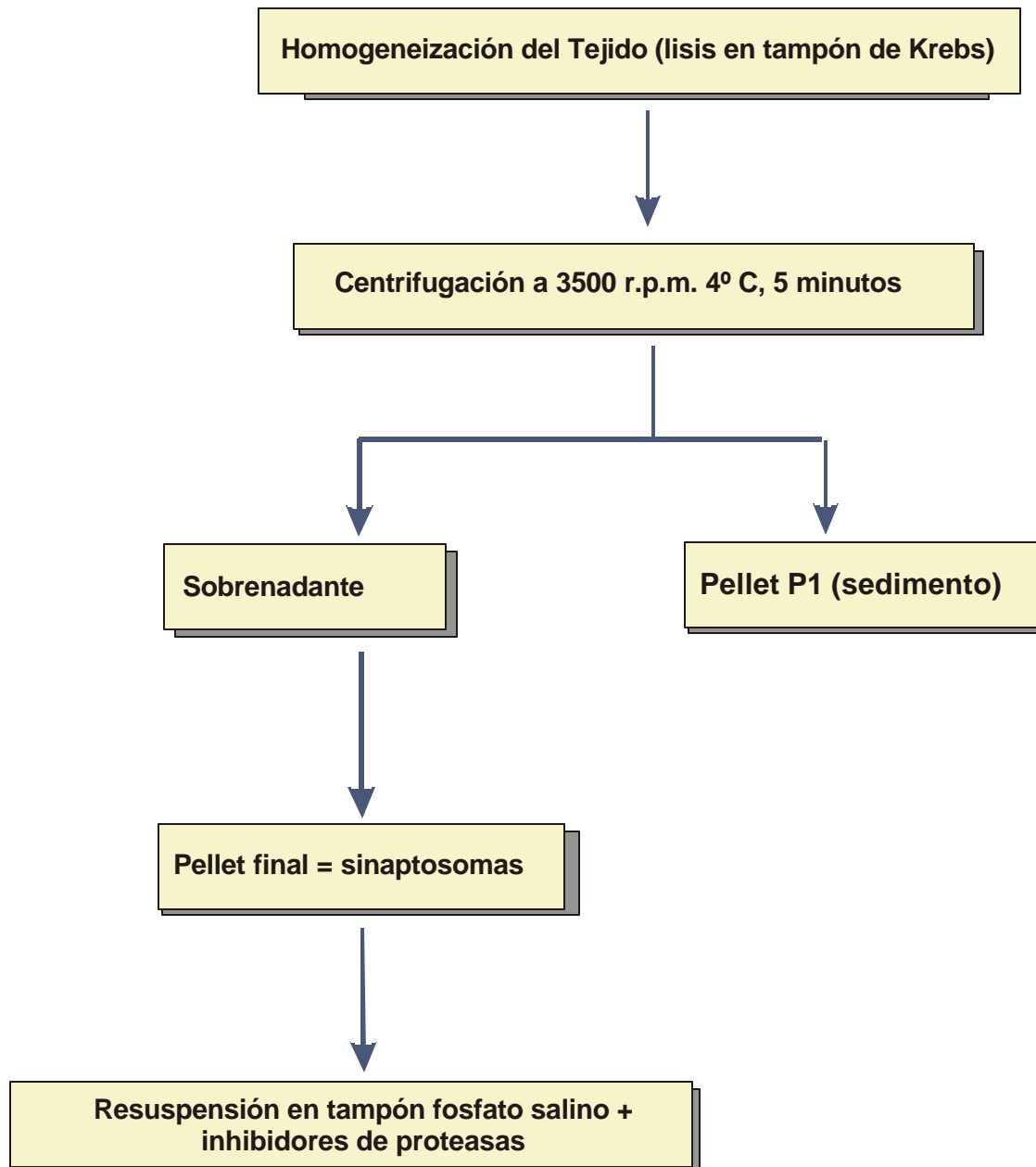
A continuación, se homogeneiza cada área cerebral en dicho tampón de lisis. Se reserva una alícuota de 50 µl del homogenado para posteriores determinaciones bioquímicas. Seguidamente, se añade el volumen de homogenado obtenido a un tubo de centrifuga Beckman con el tampón de lisis y se centrifugan los homogenados a 3500 r.p.m (1000 g) durante 5 minutos, y a 4 °C de temperatura. Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante en un nuevo tubo Beckman de centrifuga, que se vuelve a centrifugar a 20.000 r.p.m (32500 g) durante 15 minutos, a 4 °C. Después de este segundo centrifugado, se resuspende el sedimento final obtenido en tampón fosfato salino a pH=7, que lleva disuelto inhibidores de proteasas, y se almacena a -80 °C para posteriores determinaciones bioquímicas.

- **Reactivos e instrumentación utilizados:**

- Heparina 1 % (ROVI, referencia 20094-D 919).
- Sacarosa  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (sucrosa,  $\alpha$ -glucopranosil- $\beta$ -fructofuranósido, Sigma, referencia S-8501).
- Tampón Hepes (N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[ácido etanosulfónico], Sigma, referencia H-3375).
- Cóctel de inhibidores de proteasas (Complete TM, Boehringer Mannheim, referencia 1836 145).
- Tampón fosfato salino (1 ml de tampón fosfato salino contiene 2,67 g de  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ , 2,07 g de  $Na_2H_2PO_4 \times H_2O$ , y 7,02 g de NaCl).
- $Na_2H_2PO_4 \times H_2O$  (Panreac, referencia 141679).
- $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$  (Fluka, referencia 71645).
- Multipipeta dispensadora Eppendorf Plus (Eppendorf , referencia 10224900).

- 
- Pipetas automáticas Gibson de volumen variable p20 (1-20  $\mu$ l), p200 (1-200  $\mu$ l) y p1000 (1-1000  $\mu$ l).
  - NaCl (Panreac, referencia 141659).
  - Puntas desechables para pipetas automáticas Gibson (Daslab, España).
  - Homogenizador de cristal de 1 ml de capacidad (Gebson, U.K).
  - Pipetas Pasteur de 1 ml de plástico desechables (Panlab).
  - Multipeta dispensadora Eppendorf Plus (Eppendorf, referencia 10224900).
  - Placas Falcon de poliestireno y fondo plano (Beckton Dickinson referencia 353915).
  - Centrífuga Beckman (Beckman JA 20, rotor JA21-21).
  - Tubos de centrífuga Beckman.
  - Eppendorfs de 1 ml.





**Figura 2.** Esquema que muestra el proceso de obtención de sinaptosomas en las diferentes regiones cerebrales mediante centrifugación diferencial.

---

### **3.2.3. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford**

La concentración de proteínas se determinó antes de realizar los ELISAs, ya que se cargaron entre 5-10  $\mu\text{g/ml}$  de proteína total de los sinaptosomas en las placas Falcon de ELISA, en función del tipo de molécula de adhesión celular a determinar. El ensayo de Bradford se realizó mediante un Kit comercial de determinación de proteínas (BioRAD, Referencia Cat 500-0006), un ensayo de unión basado en el cambio diferencial de color en respuesta a concentraciones variables de proteína. Este ensayo se basa en el cambio diferencial de absorbancia producido cuando el compuesto azul brillante de Comasiee (G-250 o reactivo de Bradford), reacciona con los residuos aminoacídicos de las proteínas y se une, principalmente, a aminoácidos básicos y aromáticos, con lo que se produce un cambio de absorbancia de 465 nm a 595 nm. Bradford demostró que el coeficiente de extinción molar del complejo formado por la albúmina (patrón) es constante durante un rango de concentración de 10 veces, con lo que se asegura un apropiado ratio de concentraciones en la linealidad del patrón. Por tanto, la variación de color será directamente proporcional a la cantidad de proteína existente en nuestra muestra, hasta el rango de linealidad del ensayo (último punto del estándar).

Para la determinación de la concentración de proteínas se cargan 10  $\mu\text{l}$  de un estándar de concentraciones crecientes de albúmina en un rango de recta patrón de 50 a 500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 y 500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de un patrón de albúmina), o 10  $\mu\text{l}$  de las muestras a determinar en cada pocillo de la microplaca. A continuación, se añaden 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford (previamente diluido 1:5 en agua MiliQ, y filtrado con papel de filtro en un embudo). Se deja incubar a temperatura ambiente durante un tiempo máximo de 60 minutos, después del cual, se procede a la lectura densitométrica en un lector de microplacas (Digiscan 3.0, Biogen), utilizando un filtro de longitud de onda de 595 nm. En el aparato lector, las muestras son agitadas mecánicamente, durante 10 segundos y, a continuación, el espectrofotómetro mediante el software DigiWin 3.0 da la medida de la absorbancia para cada una de las muestras. Por tanto, la concentración de proteínas de las muestras problema se obtiene calculando la recta de regresión, e interpolando el valor de la absorbancia de las muestras que nos da el espectrofotómetro en dicha curva patrón. De esta manera, se calculará la concentración de proteínas existente en cada muestra, así como el volumen a cargar de las mismas en la placa de ELISA.

---

- **Compuestos e instrumentación utilizados:**

- Kit de proteínas de BIO-RAD (Bio-RAD Proteina Assay, Cat 500-0006).
- Estándares de albúmina (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 y 5000  $\mu\text{g/ml}$ ).
- Microplacas de plástico de fondo cóncavo (Daslab, España).
- Coctel de Inhibidores de proteasas libre de EDTA (Boeringher Manheim, referencia 1873580).
- Puntas desechables para pipetas automáticas Gibson p20, p200, p1000.
- Multipeta dispensadora Eppendorf Plus (referencia 10224900).
- Papel de filtro y embudo.
- Puntas para pipetas automáticas.
- Espectrofotómetro (Digiscan, Biogen Científica S.L), con el software acoplado Digiscan 3.0.
- Software Excel 7.0 (Microsoft Office 97).

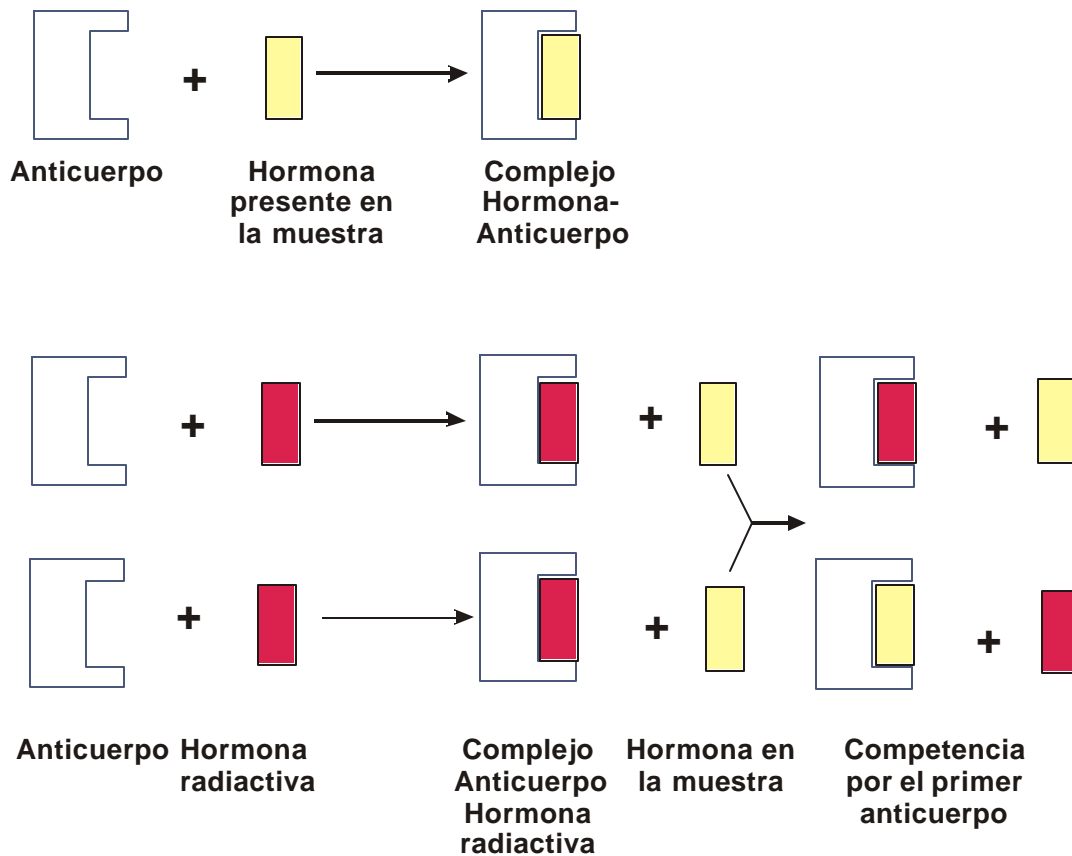
#### **3.2.4. Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona mediante radioinmunoensayo**

Tras el sacrificio de las ratas mediante decapitación con la gillotina, se recogió la sangre en tubos a los que se añade previamente heparina al 1 %. Tras equilibrar los tubos con una balanza, se centrifugan a 1600 g, con una temperatura de 4 °C, durante 10 minutos, y se recoge el sobrenadante resultante (plasma) con una pipeta Pasteur de plástico. A continuación, se almacena a -80 °C para posteriores determinaciones de los niveles plasmáticos de corticosterona mediante un kit comercial de radioinmunoensayo (Roat Coat A, Diagnosis Products Corporation, CA, USA).

Este kit para la determinación de corticosterona lleva fijado el anticuerpo en las paredes de los tubos de polipropileno. Se cargan 50  $\mu\text{l}$  de cada estándar o bien de plasma en cada tubo. A continuación, se añade 1 ml del antígeno radiactivo y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se decanta el sobrenadante para separar el antígeno ligado del libre. Se mide la radiactividad ligada ( $\text{I}^{125}$ ) en un contador gamma.

El fundamento de esta técnica radica en la adición a una muestra (en este caso plasma, cuya concentración de corticosterona queremos determinar) de una cantidad conocida de anticuerpo frente a dicha hormona y de una cantidad conocida de hormona marcada radiactivamente, que compete con la

hormona no marcada para unirse al anticuerpo (ver figura 3). Por tanto, el radioinmunoensayo (R.I.A) se basa en que la hormona de la muestra (antígeno a determinar) compite con la hormona marcada radiactivamente (antígeno marcado radiactivamente) por ocupar un número limitado de lugares de acoplamiento de un primer anticuerpo específico. Es decir, la cantidad de hormona presente en el plasma se determina en función de la cantidad de hormona radiactiva desplazada. Así, dadas las características de este ensayo, cuanto menor sea la radiactividad de la muestra, mayor es la cantidad de hormona no marcada presente en la muestra frente a la marcada, puesto que por ensayo de unión competitivo se une menor cantidad de hormona marcada con  $I^{125}$  al anticuerpo.



**Figura 3.** Esquema ilustrativo del fundamento del radioinmunoensayo, donde se muestra el ensayo de competición del primer anticuerpo.

---

El contador gamma nos da la emisión radiactiva en cuentas por minuto (c.p.m) de cada uno de los estándares y de las muestras problema. Mediante la representación de las c.p.m de cada punto del estándar en ordenadas frente al logaritmo de la concentración de hormona estándar, se obtiene una curva patrón de concentraciones crecientes. Mediante la interpolación del valor en cuentas por minuto de las muestras problema sobre la recta patrón, se obtiene la concentración de corticosterona de las muestras problema. A continuación se indica esquemáticamente el fundamento del RIA:

- **Compuestos e instrumentación utilizados:**

- Heparina sódica 1 % (referencia ROVI 20094-D 919).
- Tubos para la recogida de la sangre.
- Tubos de polipropileno.
- Estándares de corticosterona (Diagnosis Products Corp., U.S.A).
- Anti-corticosterona (Diagnosis Products Corp., U.S.A).
- <sup>125</sup>I-corticosterona (Diagnosis Products Corp., U.S.A).
- Pipetas de volumen variable entre 10 µl y 1000 µl.
- Puntas desechables para pipeta.
- Vortex (Selecta J.P, referencia 7000243).
- Congelador de – 80 ° C.
- Centrífuga Beckman JA21.
- Contador gamma.
- Gradillas y papel de filtro.
- Cloruro sódico al 0,9 % (Panreac, referencia C-4780).

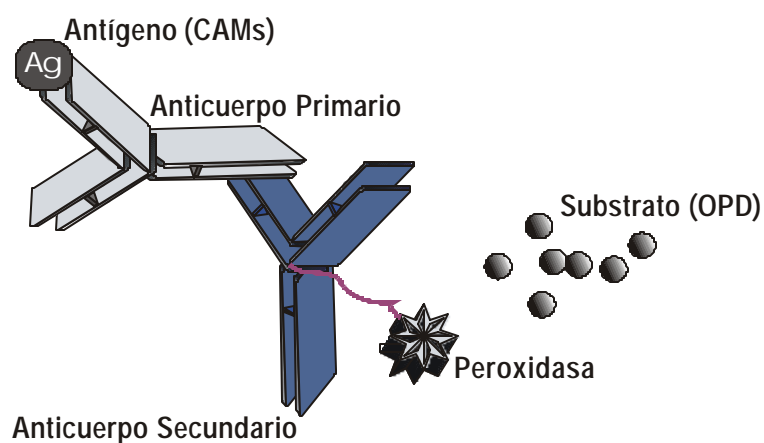
### **3.2.5. Determinación de los niveles de moléculas de adhesión celular mediante la técnica de ELISA**

#### **3.2.5.1. Fundamento de la Técnica de ELISA**

Existe una diversidad de técnicas de ELISA para la detección de antígenos solubles o proteínas de membrana (Vater y cols, 1995). La técnica de ELISA, se basa en que el antígeno a determinar (en este caso, moléculas de adhesión celular neural) es reconocido específicamente por un anticuerpo

---

primario. A su vez, este anticuerpo primario es reconocido por un anticuerpo secundario, que está conjugado con la actividad enzimática de tipo peroxidasa (POD); de tal manera que, mediante ésta actividad enzimática, el agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) presente en el tampón, se desdobra en  $H_2O$  y oxígeno molecular ( $O_2$ ), el cual produce una reacción colorimétrica, como consecuencia de la oxidación del sustrato ortofenilendiaminofosfato –OPD-. Esta reacción se ve favorecida por el pH ácido del medio, puesto que la actividad catalasa y peroxidasa es óptima en un rango de pH comprendido entre 4,5-5,2. Finalmente, la intensidad de la reacción colorimétrica, se cuantifica por espectrofotometría mediante la lectura de la absorbancia a 495 nm de longitud de onda en el lector de microplacas.



**Figura 4.** Representación esquemática del fundamento de las técnicas de ELISA (CAMS= Moléculas de Adhesión celular Neural, OPD= Ortofenildifosfato).

### **3.2.5.2. Características de los anticuerpos empleados para la determinación de moléculas de adhesión celular mediante la técnica de ELISA, y ensayos de trititación de los anticuerpos**

A continuación, se indican brevemente las características de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la determinación de moléculas de adhesión celular en esta tesis, así como los ensayos de trititación de los mismos.

---

### **3.2.5.2.1. Anticuerpos primarios:**

- **Anticuerpo policlonal dirigido contra NCAM:** Este anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, reconoce específicamente las tres isoformas de NCAM en rata (NCAM 120, NCAM 140 y NCAM 180 Kda), aunque también muestra una reactividad cruzada con NCAM murino y de humanos, así como con queratina. Para evitar esta unión inespecífica, se incubó con 1 µl de queratina (Sigma Aldrich, ref. K0253). El anticuerpo está purificado por precipitación en sulfato amónico, siendo más del 90% inmunoglobulina G, y dializado contra 0,1 M de ClNa, y de azida sódica 15 mM. El rendimiento que se obtiene por este método es de 15-30 mg de proteína/ml. Este anticuerpo fue generosamente donado por la Profesora Dra. E. Bock (Bock y cols, 1987; Ibsen y cols, 1983).
- **Anticuerpo monoclonal contra la forma polisializada de NCAM, PSA-NCAM:** Este anticuerpo se desarrolló en ratón por inyección de la cápsula de Meningococos B (clon Men B 1-2 β). Constituye un anticuerpo monoclonal de tipo inmunoglobulina M, que reconoce núcleos de ácido neuramínico -o ácido polisialico- superiores a 10 residuos. Este anticuerpo funciona en diversas especies, entre las que se incluyen el ratón y la rata. El anticuerpo fue diluido 1:2 en glicerol para preservar su estabilidad durante el almacenamiento a 80 °C. Este anticuerpo fue generosamente donado por la Profesora Dra G. Rougon (Rougon y cols, 1986; Dubois y cols, 1995).
- **Anticuerpo monoclonal contra L1** (Boehringer Mannheim, España): Este anticuerpo comercial reconoce específicamente el antígeno L1, y se obtiene por inmunización de cepas de ratas Sprague-Dawley con una fracción glicoproteica de cerebelo de ratones C57BL/6J (Lindner y cols, 1983). El anticuerpo, que se presenta liofilizado en el envase, se purificó por cromatografía de intercambio iónico, y está disuelto en un medio constituido por tampón fosfato salino, con 50 mmol/l de CaCl, rafinosa 5 mg/ml y azida sódica al 0,09 % (peso volumen), a pH=7,5.

---

### **3.2.5.2.2 Anticuerpos secundarios:**

- **Anticuerpo secundario Anti conejo Ig G conjugado con peroxidasa:** el antisuero se desarrolló en cabra utilizando Ig G como inmunógeno. Este anticuerpo, que está conjugado con peroxidasa se suministra en un tampón fosfato salino 0,01 M, a pH=7,4, y 0,01 % de trimerosal como preservante. Dicho anticuerpo se utilizó en los ensayos en los que se determinó NCAM.
- **Anticuerpo secundario Anti rata Ig G-OPD Fragmento Fab: (Boehringer Mannheim).** Este anticuerpo comercial se obtiene por inmunización en oveja con inmunoglobulina de rata, siendo purificada del suero de oveja por cromatografía de intercambio. Los fragmentos Fab, obtenidos por digestión con papainas, están acoplados con peroxidasa, y el conjugado está estabilizado en tampón Tris-Hepes, inmunoglobulina bovina 0,4 % (peso/volumen), a pH=7,2 y se presenta liofilizado en el envase, a una concentración aproximada de 0,5 mg/ml. Este anticuerpo reacciona con todas las clases y subclases de inmunoglobulina G, aunque muestra una ligera reactividad cruzada (menor del 0,1 %) con inmunoglobulina bovina, de conejo, y de cabra. Este anticuerpo se utilizó en los ensayos de determinación de L1.
- **Anticuerpo secundario Ig M (Sigma Aldrich).** Este anticuerpo se desarrolló en cabra, usando inmunoglobulina M de ratón como inmunógeno. Este anticuerpo lleva conjugado peroxidasa de tipo IV (Sigma, referencia P-8375) por una modificación del método de peryodato de Wilson y Nakane. Este conjugado se suministra en una solución 0,01 M de tampón fosfato salino a pH=7,4, y contiene un 1 % de albúmina bovina sérica y trimerosal como preservante. Este anticuerpo se utilizó en los ensayos de determinación de PSA-NCAM.

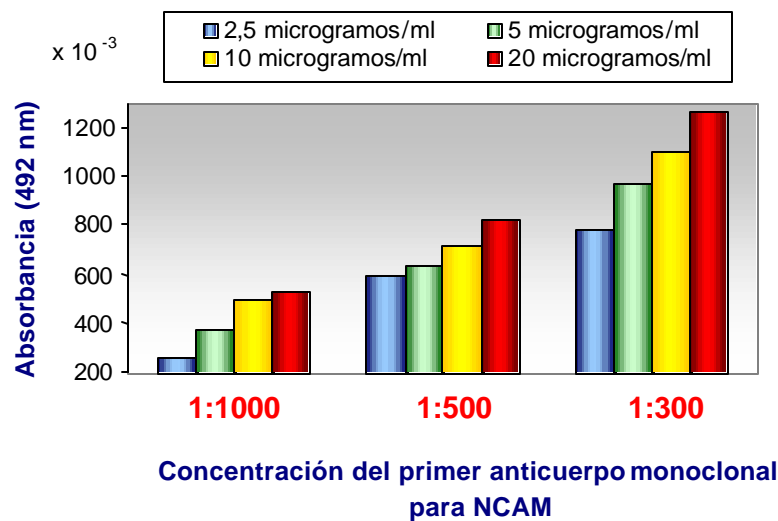
### **3.2.5.3. Ensayos de trititación de los anticuerpos para moléculas de adhesión celular neural**

A continuación, se indican los ensayos de trititación para cada una de las moléculas de adhesión celular neural, realizados en sinaptosomas de hipocampo, estudiadas en esta tesis:

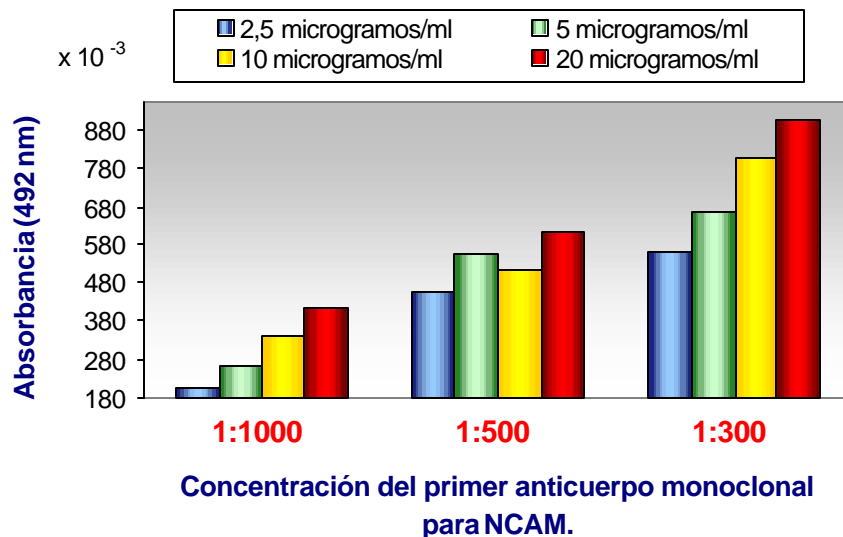


- **Tritiación de la molécula de adhesión celular neural, NCAM**

Para el ensayo de trititación del anticuerpo policlonal de NCAM, se utilizaron como condiciones de antígeno las concentraciones de 2,5, 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ , y las concentraciones de 1:1000, 1:1500, y 1:300 de anticuerpo policlonal de NCAM, así como dos concentraciones de anticuerpos secundario a 1:500 y 1:1000. En las figuras 5 y 6 se representan las absorbancias obtenidas para la trititación del anticuerpo policlonal para NCAM, con objeto de seleccionar la condición más idónea para la realización de los ELISAs.



**Figura 5.** En la figura adjunta se indican las absorbancias obtenidas en el ELISA para varias condiciones de trititación, con concentraciones de anticuerpo primario (1:1000, 1:500 y 1:300), cuando se utiliza una concentración para el anticuerpo secundario Ig G-OPD fragmentos Fab de 1:500.



---

**Figura 6.** En la figura adjunta se indican las absorbancias obtenidas para la trititación de NCAM con varias concentraciones de anticuerpo primario (1:1000, 1:500 y 1:300), cuando se utiliza una concentración 1:1000 de anticuerpo secundario de tipo fragmentos Fab Ig G-OPD.

Por tanto, en base a los experimentos de trititación del anticuerpo policlonal de NCAM, se seleccionaron las siguientes condiciones experimentales:

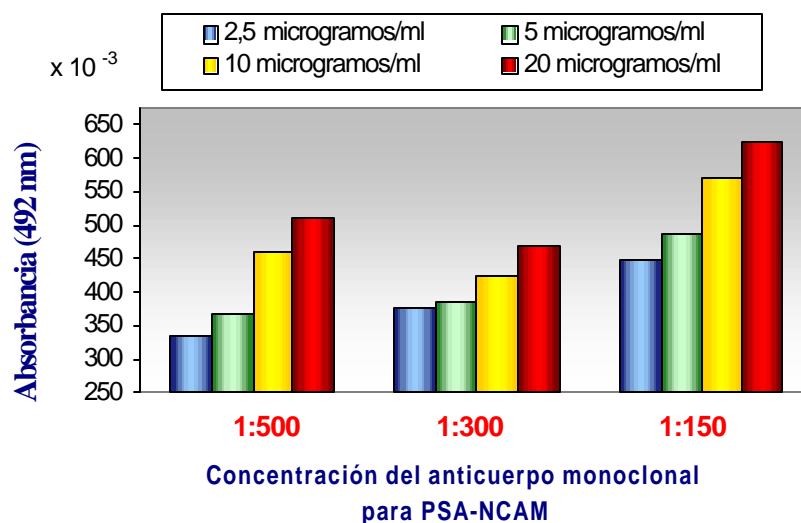
Antígeno= 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Anticuerpo primario= 1: 300.

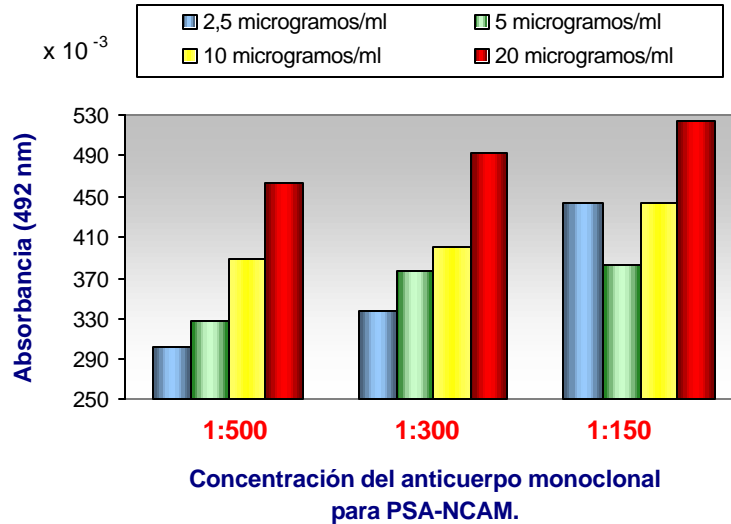
Anticuerpo secundario= 1: 500.

- **Trititación para la forma polisializada de NCAM, PSA-NCAM**

Para realizar el ensayo de trititación de la forma polisializada de NCAM, PSA-NCAM, se utilizaron cuatro concentraciones de antígeno: 2,5, 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína, con las condiciones de anticuerpo primario para PSA-NCAM de 1:500, 1:300 y 1:150, mientras que para el anticuerpo secundario de tipo inmunoglobulina M se trititaron las diluciones de 1:500 y 1:1000. Los valores obtenidos para los dos ensayos de trititación se representan en las figuras 7 y 8.



**Figura 7.** Ensayo de tritaci3n para el anticuerpo monoclonal de PSA-NCAM, cuando se utilizaron las concentraciones de ant3geno de 2,5, 5, 10 y 20 µg/ml, y diluciones de 1:500, 1:300 y 1:150 para el monoclonal de PSA-NCAM y de 1:500 para el anticuerpo secundario de tipo inmunoglobulina M.



**Figura 8** Ensayo de tritaci3n del anticuerpo monoclonal para PSA-NCAM en sinaptosomas de hipocampo, en el que se utilizaron concentraciones de 2,5, 5, 10 y 20 µg/ml de ant3geno, y concentraciones de 1:500, 1:300, 1:150 para el anticuerpo monoclonal de PSA-NCAM, utilizándose una diluci3n de 1:1000 para el anticuerpo secundario de tipo inmunoglobulina M.

Por tanto, a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de tritaci3n, se seleccionaron las siguientes condiciones para la realizaci3n de los ELISAs de PSA-NCAM:

Concentraci3n del ant3geno a cargar en la placa= 10 µg/ml.

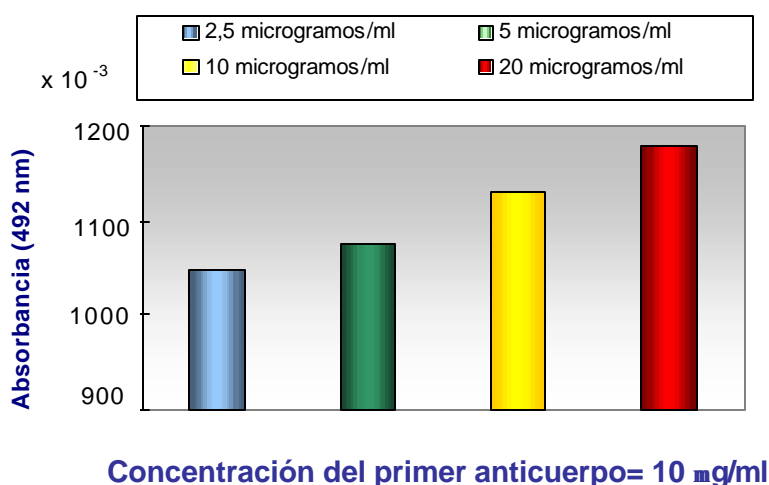
Concentraci3n del primer anticuerpo=1: 300.

Concentraci3n del segundo anticuerpo=1: 1000.

---

- **Tritiación de la molécula de adhesión celular neural L1**

La trititación para el anticuerpo monoclonal de L1 se realizó con concentraciones crecientes de antígeno (2,5, 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ ) en sinaptosomas crudos de hipocampo, y se eligió una concentración de anticuerpo primario de 10  $\mu\text{g/ml}$ , así como una dilución 1:500 de anticuerpo secundario Anti-rata Ig G-OPD, de acuerdo con las recomendaciones previas del fabricante. En la gráfica 9 se indican las absorbancias obtenidas a 492 nm.



**Figura 9.** En la figura adjunta se indican las absorbancias obtenidas a 492 nm para el ensayo de trititación de L1.

Por tanto, la concentración elegida para la realización de los ELISAs para L1 fue de 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno, 10  $\mu\text{g/ml}$  para el anticuerpo monoclonal, y de 1: 500 para el anticuerpo secundario.

Resumiendo, en la figura adjunta número 10 se indican las condiciones de antígenos y de anticuerpos seleccionadas a partir de los ensayos de trititación realizados para cada molécula de adhesión celular neural estudiada:

	Concentración de antígeno	Concentración de Anticuerpo primario	Concentración de anticuerpo secundario
<b>NCAM (Todas las isoformas):</b>	5 µg/ml	NCAM policlonal (E. Bock). Dilución 1: 300.	Anti conejo Ig G Peroxidasa conjugado. Dilución 1: 500 (Sigma aldrich, Ref. A-0545).
<b>PSA-NCAM</b>	10 µg/ml	Monoclonal para PSA-NCAM. (donado por Dr. Rougon). Dilución=1: 300	Ig M anti-ratón Peroxidasa conjugado (cadena mu). Dilución=1: 1000. (Sigma Aldrich, ref. A-8786.)
<b>Antígeno L1</b>	10 µg/ml	Monoclonal para L1 (10 µg/ml). (Boerhgher Manheim, Ref. 1450999).	Anti rata Ig G Peroxidasa conjugago. Dilución=1: 500. (Boeringher Manheim Ref. 1348 752).

**Figura 10.** Figura que muestra las condiciones de trititación seleccionadas para la realización de los ELISAs en base a los ensayos de trititación para cada una de las moléculas de adhesión celular neural estudiadas.

#### **3.2.5.4. Técnica de ELISA para la determinación de moléculas de adhesión celular neural, NCAM, su forma polisializada -PSA-NCAM-, y L1**

A continuación, se describe la técnica de ELISA utilizada para la determinación de moléculas de adhesión celular en esta Tesis. Inicialmente, se añaden 100 µl de tampón de "revestimiento" a cada pocillo de la placa Falcon (96 pocillos), constituido por carbonato sódico/bicarbonato sódico 0,1 M, a pH=9,6, y se deja a temperatura ambiente, al menos durante 90 minutos. A continuación, la placa se seca golpeándola vigorosamente sobre una mesa cubierta con papel de filtro, y se carga el antígeno (50 µl/pocillo) en la placa, disuelto en tampón fosfato salino a pH=7. El antígeno se carga en el placa Falcon a una concentración variable en función del tipo de molécula de adhesión celular a determinar

---

en la muestra de sinaptosomas (5  $\mu$ l/ ml para NCAM y 10  $\mu$ l/ ml tanto para PSA-NCAM como para L1 (Ver figura 10).

A continuación se deja incubar el antígeno toda la noche (de 20 a 24 horas) en una cámara humidificada a 4 ° C. Posteriormente, se realizan 3 lavados, sumergiendo la placa completamente en una solución de lavado a pH=7 (constituido por tampón fosfato salino 0,1M/ 0,05 % de Tween 20). Tras secar la placa, se añaden 100  $\mu$ l de solución de bloqueo en cada pocillo a pH=7, constituido por tampón fosfato salino 0,1 M, 25 % de Tween 20, y 3 % de albúmina bovina sérica (para eliminar la unión inespecífica), y se deja incubar durante 90 minutos en dicha cámara humidificada a temperatura ambiente.

Después, se realizan 3 lavados, se aclara la placa, y se añaden 50  $\mu$ l del primer anticuerpo a la concentración más óptima en tampón de lavado, según la molécula de adhesión a determinar (1:300 tanto para el anticuerpo policlonal de NCAM, como para el monoclonal de PSA-NCAM, y 10  $\mu$ l/ml para el anticuerpo monoclonal de L1 (Ver figura 10). A continuación, se carga la placa con 50  $\mu$ l del primer anticuerpo disuelto en tampón fosfato salino/ tween 0,05 %, a pH=7, y se incuba a 4 ° C en una cámara humidificada durante toda la noche (20-24 horas).

Posteriormente, se realizan 5 lavados de la placa en tampón de lavado a pH=7, y una vez seca, se añade el anticuerpo secundario disuelto en tampón fosfato salino/0,05 % de Tween 20, a pH=7, a la concentración más apropiada para cada molécula de adhesión (1:500 para el ensayo de NCAM, 1:1000 para el de PSA-NCAM y 1:500 para el de L1). Este anticuerpo se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Transcurrido este tiempo, se lava de nuevo la placa, sumergiéndola en el tampón de lavado (5 veces). Una vez seca, se añaden 50  $\mu$ l/pocillo de tampón citrato a pH=4,5 (tampón constituido por una proporción 2:1 de citrato sódico 0,1 M frente a ácido cítrico 0,1M), al que se le añade el sustrato de revelado OPD –ortofenilendiaminafosfato-, a la concentración de 1 mg/ml y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 ml de agua oxigenada al 30 % por cada 10 ml de tampón citrato). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se para mediante la adición de 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N a cada pocillo. A continuación, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm.

---

- **Reactivos e instrumentación utilizados:**

- Pipetas p10, p20, p100, p200, p1000 Gibson y puntas de pipetas.
- Agimatic AT-1 (Selecta J.P, referencia 7000243).
- Agitadores magnéticos Top Mixer agimatic AT-1.
- PH-metro GLP21, Crison.
- Sucrosa  $C_{12}H_{22}O_{11}$  tipo II (a-glucoronil- $\beta$ -fructofuranósido), de grado II (Sigma, Referencia, S-8501).
- Coctel de inhibidores de proteasas (Boehringer, referencia. 1873 580).
- Heppes tampón (N-[Hidroxietil] piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico], referencia H-3375).
- Tris-hidroximetilaminoetano (Prolabo, referencia 28.911.295).
- $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$  (Panreac, referencia 141678).
- $NaH_2PO_4 \times 12 H_2O$  (Fluka, referencia 385862/1 22789).
- Cloruro sódico (ClNa). (Panreac, referencia 141659).
- $HNaCO_3$  (Sigma, referencia S-8875).
- Carbonato sódico anhidro  $CaCO_3$  (Sigma, referencia S-2127).
- Agitador mecánico AT-1 (Selecta, J.P referencia 7000243).
- Hidróxido sódico en lentejas (NaOH) (Panreac, referencia 14168).
- Citrato sódico (sal trisódica dihidratada, Sigma, referencia C-3674).
- Ácido cítrico (sal trisódica anhidra, Sigma, referencia C-3674).
- Tween 20 (Polioxi-etilen sorbitan monolaurato, Sigma, referencia P-1379).
- BSA (Albúmina bovina sérica, Sigma, referencia P-1379).
- $H_2O_2$  (peróxido de hidrogeno al 30 % peso/ volumen, Sigma, referencia H-1009).
- OPD (ortofernildifosfato, Sigma, referencia P-1526).
- Ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  5N (Sigma, referencia 182106).
- Lector de microplacas Asys Hitech (Biotech), y software Digiscan 3.0 accesorio.
- Dispensador de multipipetas Eppendorf plus (Eppendorf, referencia 10224900).
- Placas Falcon de ELISA (Beckton Dickinson no estériles de poliestireno, referencia 353915).

---

### **3.2.6. Western blot o inmunoblots de las diferentes moléculas de adhesión celular**

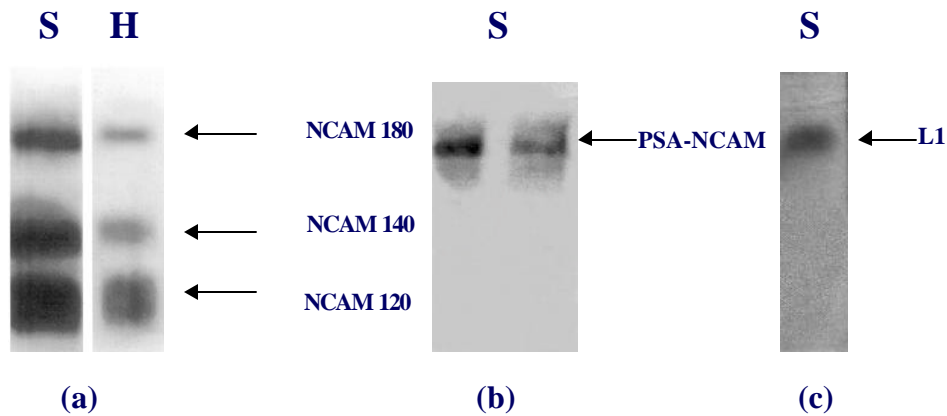
Puesto que NCAM tiene varias isoformas (NCAM 120, 140 y 180 Kda), se realizaron inmunoblots con objeto de comprobar la validez de los anticuerpos utilizados para la determinación de CAMs por la técnica de ELISA en los sinaptosomas de las diferentes muestras de moléculas de adhesión celular estudiadas (NCAM, PSA-NCAM y L1), con objeto de determinar si los anticuerpos utilizados en la técnica de ELISA reconocían todas las isoformas de las moléculas de adhesión celular estudiadas, tanto en homogenados como en sinaptosomas crudos de hipocampo. En estos inmunoblots, se mostró que el anticuerpo policlonal para NCAM reconoce las tres isoformas tanto en homogenados como en sinaptosomas crudos, siendo la concentración de NCAM mayor en los sinaptosomas que en los homogenados.

Para ello, las muestras de homogenados y de los sinaptosomas se separan en geles SDS-PAGE al 7 % basándonos en trabajos existentes en la literatura (Linnemann y cols, 1993). A continuación, se produce la transferencia de las proteínas del gel a la membrana hidrófoba de tipo PVDF en un dispositivo transferidor de tipo semiseco (Hoefer) -a 1 mA/cm<sup>2</sup> de superficie de membrana- con tampón de transferencia. Posteriormente, se incubaba con las concentraciones idóneas del anticuerpo primario y secundario en función de la molécula a estudiar (ver figura 11) y se revelan las bandas mediante un sistema de quimioluminiscencia (ECL +, Amershan Pharmacia)

<b>Molécula de adhesión</b>	<b>Antígeno</b>	<b>1<sup>er</sup> Ab</b>	<b>2<sup>o</sup> Ab</b>
<b>NCAM policlonal</b>	<b>15 mg</b>	<b>1:15000</b>	<b>1:25000</b>
<b>PSA-NCAM</b>	<b>15 mg</b>	<b>1:500</b>	<b>1:4000</b>
<b>L1</b>	<b>5 mg</b>	<b>1:100</b>	<b>1:5000</b>



**Figura 11.** En la figura adjunta se indican las concentraciones de los antígenos, y de los anticuerpos empleadas para la determinación de las diferentes moléculas de adhesión celular en el inmunoblot (1<sup>er</sup> Ab= Anticuerpo primario, 2<sup>o</sup> Ab= Anticuerpo secundario).



**Figura 12.** En los inmunoblots adjuntados, que se realizaron en sinaptosomas de hipocampo se aprecia:

- (a) que el anticuerpo policlonal de NCAM reconoce las tres isoformas, tanto en homogenados como en sinaptosomas.
- (b) que el anticuerpo monoclonal tanto para PSA-NCAM como para L1 (c) reconocen una banda de aproximadamente 200 KDa (S=Sinaptosomas H=Homogenados).

- **Productos empleados para los inmunoblots:**

- Tris-(hidroxietil) aminometano (Prolabo, referencia 28811295).
- Acrialmida (MERCK, referencia 1.10784.1000).
- N,N metilen Bisacrilamida (MERCK, referencia 1.10897.0010).
- Persulfato amónico (Prolabo, referencia 33603.267).
- SDS (Lauril dodecil sulfato sódico, Sigma, referencia L-4509).
- TEMED (N, N, N', N' -Tetrametiletilendiamina, Sigma, referencia 1.10732.0100).
- 2-Butanol (MERCK, referencia 1.09630.1000).
- Acido acético (MERCK, referencia 1.00063.10000).

- 
- $\beta$ -mercaptoetanol (MERCK, referencia 8.05740.1000).
  - Glicerol 87 % (Panreac, referencia 141339).
  - Glicina (MERCK, referencia 1.04201.1000).
  - NaCl (Panreac, referencia 141659).
  - Azul de Bromofenol (3', 3'', 5', 5'', tetrabromofenol sulfoneftalein, sal sódica, Sigma, referencia B-6131).
  - Azida sódica (Sigma, referencia 8032).
  - Puntas alargadas para carga de muestras en electroforesis (Bio-Rad, referencia 223-9915).
  - Etanol (Riedel, referencia 24103).
  - Hexano (Sigma, referencia H-9379).
  - Metanol puro (Panreac, referencia 141091).
  - Azul de Commasie R-250 (Bio-Rad).

- **Instrumentación y compuestos de Western blott:**

- Fuente de electroforesis (EPS 601, Amersham Pharmacia, referencia 18-1130-19).
- Conjunto de 5 cristales para la preparación del gel (Hoefel Pharmacia Biotech San Francisco, U.S.A, referencia, 80-6150-87, n° de serie: SE 262P-5).
- Peines Pharmacia Biotech: de: - 1 pocillo: referencia 7.5, código SE 211<sup>a</sup> -R-75.
  - 5 pocillos, Hoefel SE 211<sup>a</sup> -5-.75, referencia 80-6140-23.
  - 9 pocillos, Hoefel, referencia 80613871.
- Sistema de transferencia Hoefel Ssemiphor de tipo semiseco, AmershamPharmacia. TE Series 80-6264-68.
- Membranas hidrófobas PVDF de tipo Hybond P (Amersham Pharmacia, referencia RPNF L9/98/03).
- Sistema ECL + (Amersham Pharmacia, referencia RPN 2132 OL/AB).
- Rojo Ponceau (Sigma, referencia P3504).
- Tween 20 (Polioxietilen sorbitan monolaurato, Sigma, referencia P-1379).
- BSA (Albúmina bovina sérica, Sigma, referencia A-7030).
- Leche Esveltest en polvo libre de ácidos grasos poliinsaturados (Molico)
- Papel Watchmann 3 MM.
- Películas KODAK.

- 
- Cassette de revelado KODAK (KODAK Biomax, referencia KP 105755-A).
  - Solución de fijado y de revelado.

### **3.2.7. Técnicas de Inmunohistoquímica para la evaluación de PSA-NCAM**

#### **3.2.7.1 Preparación de los cerebros para criosección**

Tras extraer los cerebros de la caja craneana, se embebieron en componente OCT (*Optimal Cutting temperature*), se congelaron en N-Hexano, y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis por inmunocitoquímica. La función del OCT y del n-Hexano fue proporcionar una óptima congelación del tejido, ya que evitan la formación de grietas y de artefactos en la congelación, que pudieran interferir con el posterior procesamiento inmunohistoquímico de las muestras.

#### **3.2.7.2. Técnica de criosección de los cerebros**

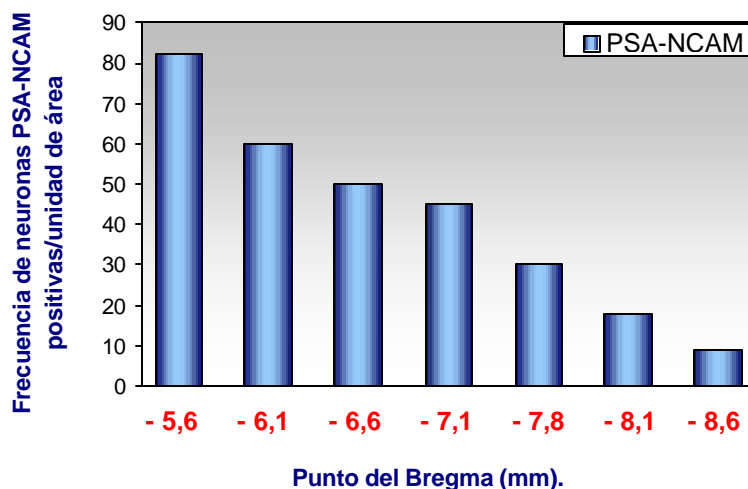
Para el análisis de la expresión de neuronas PSA-NCAM positivas en el hipocampo, 10 secciones alternativas de 12 micras, se cortaron en un criostato de la Serie Microm 500 (Paxinus y Watson, 1986), (Algen Laboratories, Inc, USA) tomadas en referencia al punto  $-5,6$  del Bregma para el hipocampo (Fox y cols, 1995a).

Los cerebros se cortaron en el punto  $-5,6$  mm del Bregma, debido a que en este punto del Bregma la polisialización de NCAM en el borde de la capa polimórfica granular del giro dentado/ hilus es máxima, mientras que decrece progresivamente según nos vamos alejando de este punto ( $-5,6$  mm) de referencia del Bregma. En la figura 13 se muestra la cuantificación del número de células PSA-NCAM positivas en el hipocampo en función del punto del Bregma considerado (Ver gráfica 13).

Las secciones se cubrieron con polilisina: agua destilada (1:1) para pegar los cerebros al portaobjetos, y se secaron en estufa durante 20 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$ . Las secciones para todos los estudios se tomaron manualmente o semimanualmente en el criostato, y se cortaron en una orientación horizontal, y se mantuvieron a  $-15^{\circ}\text{C}$  mientras se cortaban. Además, todas las secciones de cada

---

animal se procesaron el mismo día, para evitar posibles alteraciones del tejido, ya que se evita congelar/ descongelar varias veces la misma muestra.



**Figura 13.** Se muestra que la mayor frecuencia de células posializadas se da en el giro dentado del hipocampo en el punto  $-5,6$  mm del Bregma, y decrece progresivamente a partir de este punto en referencia del Bregma (Murphy y cols, 1995).

Tras calentar los portas con polilisina a  $60^{\circ}$  C, las muestras se fijan por inmersión en etanol al 70 %.

### **3.2.7.3. Procedimiento de marcaje: inmunofluorescencia**

Después de la inmersión en etanol al 70 % durante 30 minutos, las secciones se lavaron durante 10 minutos en tampón fosfato salino 0,1 M, se dejaron escurrir y se incubaron en una cámara humidificada a temperatura ambiente durante 20 horas con un anticuerpo monoclonal para PSA-NCAM –que reconoce específicamente restos de ácido polisialílico superiores a 10 residuos- (Rougon, y cols, 1985) diluido 1:500 en tampón fosfato salino 0,1 M, que contiene un 1 % -peso/ volumen- de BSA, y un 1 % volumen/ volumen de suero normal de cabra (NGS) para reducir así la unión inespecífica.

---

A continuación, las secciones se lavaron en tampón fosfato salino 0,1 M (2 veces), durante 10 minutos, se secaron, y se incubaron en la misma cámara humidificada con un anticuerpo secundario de tipo inmunoglobulina M ligado a isocianato de fluoresceína (Ig M-FITC, Calbichem, 401224), diluido 1:100 en tampón fosfato salino 0,1 M, que además, contiene un 1 % (peso/ volumen) de BSA y un 1 % suero normal de cabra o NGS (volumen/ volumen).

Tras dos nuevos lavados de 10 minutos con tampón fosfato salino 0,1 M, las muestras se secaron y se montaron con un medio potenciador de la fluorescencia denominado Citifluor AF-1 (Leica System R.B 1411). A continuación, los portas se introdujeron durante un tiempo de exposición breve (10 segundos) en tampón fosfato salino 0,1 M, que contiene yoduro de propidio (Sigma Chemical Co U.K), a una concentración de 40 ng/ml, con objeto de facilitar el conteo de las neuronas PSA-NCAM positivas en el giro dentado. Las secciones se observan en un microscopio de fluorescencia (Leitz DM RB), con una longitud de onda de excitación de 495 nm, y de 525 nm de emisión.

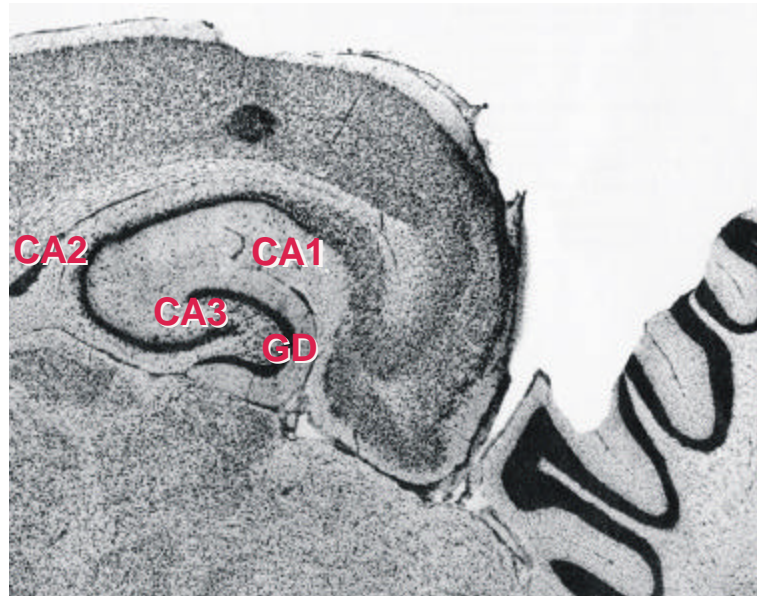
### **3.2.7.3.1. Cuantificación del número de neuronas PSA-NCAM positivas en el borde de la capa polimórfica granular/ hilus del giro dentado**

El análisis cuantitativo de imagen se desarrolló utilizando el sistema de análisis de imagen Quantimet Q-500, un software para PC. Para ello, se acopló al microscopio de fluorescencia una cámara de vídeo CCF de alta sensibilidad (Cohu, Lab. Instruments y Supplies, Irlanda). Cada lente del microscopio se calibró mediante la medida de la longitud y del área, usando una grátula de 1 mm. Esta operación se repitió en cada sesión de microscopía de fluorescencia, como paso previo a la cuantificación de neuronas PSA-NCAM positivas mediante el análisis de imagen Quantimet Q-500.

Para la cuantificación de la frecuencia de la polisialización de NCAM en el hipocampo, se calculó el número de neuronas PSA-NCAM positivas por unidad de área en el borde de la capa polimórfica granular del giro dentado. Para ello, se contó, en cada animal, el número de neuronas PSA-NCAM positivas en el borde de la capa polimórfica granular del giro dentado/ hilus del hipocampo. El número de neuronas PSA-NCAM positivas en esta capa, se dividió por el área total del giro dentado en cada sección alternativa, y se multiplicó el valor de dicho cociente por la media del área polimórfica granular en el punto  $-5,6$  del Bregma (que, para ratas P-80, es  $0,15 \text{ mm}^2$  a este nivel de referencia). A continuación, se obtuvo la media de las 10 secciones alternativas de cada animal. Este procedimiento,

---

se repitió para los dos hipocampos en cada rata, y se expresó la media total del número de neuronas PSA-NCAM positivas por unidad de área en cada uno de los grupos experimentales.



**Figura 14.** Gráfica que muestra las diferentes zonas de la formación hipocampal en el punto – 5.6 del Bregma (Paxinus y Watson, 1986).

**GD=** Giro Dentado, **CA1, CA2 y CA3=** Áreas de la formación hipocampal.

- **Instrumentación y compuestos:**

- Componente OCT (Optimal Cutting Temperature, Cutex, referencia 4583 00048).
- Criostato (Algen Laboratories, Inc, USA).
- Polilisina (Sigma, referencia P8920).
- Porta y cubreobjetos (BM Browne, LTD, Dublín, Irlanda).
- Tampón fosfato salino 0,1 M.
- Borax (Tetraborato sódico decahidratado, referencia B-9876).
- Azul de toluidina (Sigma, referencia T-3260).
- Suero normal de cabra o NGS (Suero normal de cabra, DAKO A/S Dinamarca, referencia X0907).

- 
- Albumina bovina sérica o BSA (Albúmina sérica bovina, Sigma, referencia A-7030).
  - Anticuerpo monoclonal para PSA-NCAM (Rougon y cols, 1986).
  - Anticuerpo secundario Anti-ratón, ligado a isocianato de fluoresceína (Calbichem, 401224).
  - N-Hexano (Sigma UK, referencia H-9379).
  - Etanol (Riedel, referencia 24103).
  - N-Hexano (Sigma, referencia H-9379).
  - Citifluor AF-1 (Leica System RB 1411).
  - Yoduro de propidio (Sigma, referencia P-4170).
  - Microscopio de fluorescencia Leitz DM RB.
  - Software Quantimet Q-500 de análisis de imagen (Leyca System).
  - Cámara de vídeo de alta sensibilidad.
  - Lámpara HBO de mercurio.
  - Image Supply System (Dublín, Irlanda).
  - HPS 400 & Delta 100 Ilford film.
  - Kodaflo.
  - Film Ekctacrome elite 400
  - Cubetas y gradillas para portaobjetos (Daslab, referencia 19361).

### **3.3. PROCEDIMIENTOS CONDUCTUALES: PARADIGMAS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DEL ESTRÉS EN LOS PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA**

A continuación, se describen los procedimientos conductuales empleados para el estudio de las interacciones entre el estrés y los procesos de aprendizaje y memoria sobre la expresión de moléculas de adhesión celular neural en el sistema nervioso.

#### **3.3.1. Modelo de condicionamiento de miedo al contexto**

El condicionamiento de miedo al contexto es un paradigma conductual idóneo para el estudio de los mecanismos neurobiológicos del estrés y de la memoria. Este paradigma conductual se desarrolla en el interior de una cámara de condicionamiento, que se describe a continuación, junto con el test.

---

- **Cámara de condicionamiento**

La cámara de condicionamiento de miedo al contexto tiene unas dimensiones de 30x37x25 cm (LEICA System), y está constituida por paredes metálicas, una de ellas con una trampilla transparente de metacrilato, por la que se introduce la rata. El suelo de la cámara de condicionamiento está constituido por 20 barros de acero inoxidable de 4 mm de diámetro, separados una distancia de 1,5 cm entre ellos. Se coloca una bandeja con serrín debajo de los barros. En cada observación experimental, se cambió el serrín del fondo, y se limpiaron los barros de acero inoxidable con una solución de ácido acético al 1 %. La cámara atenuadora de sonido se iluminó con una bombilla de luz blanca (20 W), que tenía un ruido basal medio de 68 decibelios (dB), producido por la ventilación de la cámara.



**Figura 14.** En la figura se observa la respuesta de inmovilidad conductual o *freezing* en inglés, desarrollada por las ratas en el condicionamiento de miedo, y que se define como la ausencia total de movimiento (excepto para la respiración) desarrollada por las ratas en la cámara de condicionamiento.

Al inicio de estos experimentos, el peso de las ratas oscilaba entre 250 y 320 gramos. El día del experimento, las ratas se transportaron, individualmente, desde el estabulario a una sala adyacente,



---

donde se realizaron los experimentos. Allí, se las introdujo en las cajas de Skinner para proceder al condicionamiento del miedo al contexto. La **fase de entrenamiento** tiene una duración total de 5,5 minutos. En ella, tras un periodo inicial de 3 minutos, el animal recibió tres descargas eléctricas, con un intervalo de separación de 1 minuto entre cada una (salvo en los animales controles, que no recibían descargas eléctricas). Transcurridos 30 segundos después de la última descarga, las ratas se devolvieron a sus respectivas jaulas en el estabulario. En este paradigma conductual, se utilizó como estímulo incondicionado una descarga eléctrica de 1 segundo de duración, que dependiendo de los experimentos y de los grupos experimentales, fue de 0,2, 0,4 o 1 mA de intensidad de choque eléctrico. La administración de las descargas eléctricas se realiza a través de un sistema automático mediante un generador de descargas eléctricas (LEICA I.C, modelo L1100-2, Cibertec, SA) con un software versión acoplado al ordenador (Skinner 1,2).

Las ratas controles se introdujeron en las cajas, pero no recibieron descarga alguna. En algunos experimentos conductuales, se añadió un grupo control no manipulado que recibía la misma manipulación experimental, pero sin ser expuesto a la cámara de condicionamiento de miedo al contexto y, por tanto, tampoco recibió descarga alguna.

Mediante una videocámara, se grabó la conducta de las ratas. La inmovilización conductual se evaluó en cada sesión en los diferentes grupos experimentales. Se define la conducta de *freezing* como la inmovilidad conductual total, excepto para aquellos movimientos necesarios para la respiración. Se evaluó la conducta, tanto durante los tres minutos previos a la administración de los choques eléctricos (período pre-shock), como durante los 2,5 minutos inmediatamente después de la presentación de la primera descarga eléctrica (periodo post-shock). Se excluyeron del estudio aquellos animales que mostraban valores de inmovilidad conductual superiores al 15 % durante el periodo de tiempo previo a la primera descarga eléctrica.

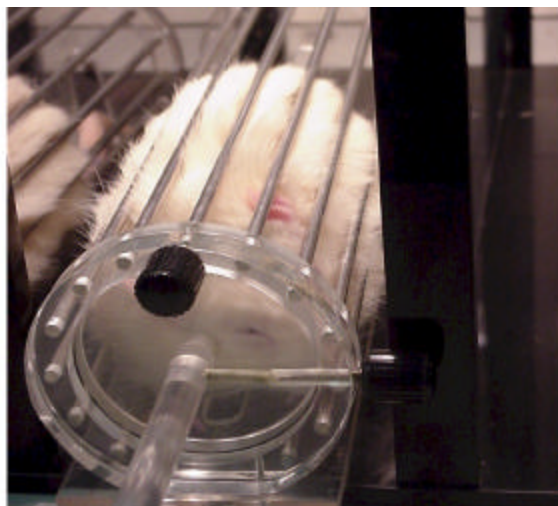
En la fase del **test de retención**, que generalmente se desarrolla 12 o 24 horas después del entrenamiento (o post-entrenamiento), dependiendo del experimento en cuestión, se evaluó la retención de la memoria mediante la medida de la media del porcentaje de inmovilización conductual que realizaron las ratas durante un tiempo total de 8 minutos, en el que se las reexpuso al contexto en el que se condicionaron, pero sin recibir en este caso descarga eléctrica alguna. Mediante una videocámara se grabaron también las sesiones de test en los diferentes grupos experimentales, para su posterior análisis. Una vez finalizado el test, cada rata fue sacrificada (aproximadamente 10 minutos después de la introducción de la rata en la caja de Skinner) recogiendo su sangre para la posterior determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona. También se diseccionaron diferentes regiones cerebrales

---

(hipocampo, estriado, corteza frontal, hipotálamo y amígdala), con objeto de determinar, posteriormente, la expresión de moléculas de adhesión celular neural.

### **3.3.2. Procedimiento inductor de estrés crónico**

A continuación, se indica el procedimiento seguido para la inducción de un estrés crónico en las ratas de nuestro estudio. Las ratas se sometieron diariamente a un procedimiento inductor de estrés crónico durante 21 días con una duración de 6 horas diarias (entre las 8:30 h y las 14:30 h) en unos aparatos inmovilizadores. En estos dispositivos de metacrilato, en forma de cilindros, se las inmoviliza mediante restricción de movimientos (Ver figura 15). Durante las sesiones de inmovilización, las ratas permanecieron en una habitación adyacente a la sala del estabulario. Cada día, al final de la sesión de inmovilización se las devolvió a sus respectivas jaulas. Durante la fase de inmovilización por estrés crónico, los animales controles permanecieron sin manipular en sus respectivas jaulas en el estabulario.



**Figura 15.** Dispositivo de inmovilización, constituido por un cilindro de metacrilato cubierto de barras metálicas donde la rata se inmoviliza por restricción de movimientos.

---

### **3.3.3. Paradigma conductual del laberinto acuático de Morris**

A continuación se describen las pruebas conductuales utilizadas en la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris.

#### **3.3.3.1. Instrumentación**

Las pruebas conductuales se realizaron en una piscina circular de PVC de color negro, cuyas dimensiones son 2 metros de diámetro, y 45 cm de profundidad. Se llenó parcialmente de agua hasta el nivel de 30 cm y se mantuvo a 25 °C. La piscina circular se dividió en cuatro cuadrantes imaginarios iguales. En la mitad de uno de los cuadrantes, y equidistante del muro y del centro de la piscina, se colocó una plataforma de escape (11 cm de diámetro) sumergida (1,5 cm bajo la superficie del agua) y, por tanto, invisible para las ratas. La sala donde se ubicó la piscina contiene numerosas claves visuales sobre la pared, que ayudan a la rata en su orientación espacial. La conducta de las ratas se monitorizó mediante una videocámara colocada en el techo, exactamente en el centro de la piscina. Entre otros, se analizó el parámetro conductual denominado latencia, que hace referencia al tiempo que tardan las ratas en encontrar la plataforma parcialmente sumergida. Para su análisis, se utilizó un sistema computerizado (Ethovision 1,90, Noldus IT, Holanda).

#### **3.3.3.2. Pruebas conductuales utilizadas en el laberinto acuático de Morris**

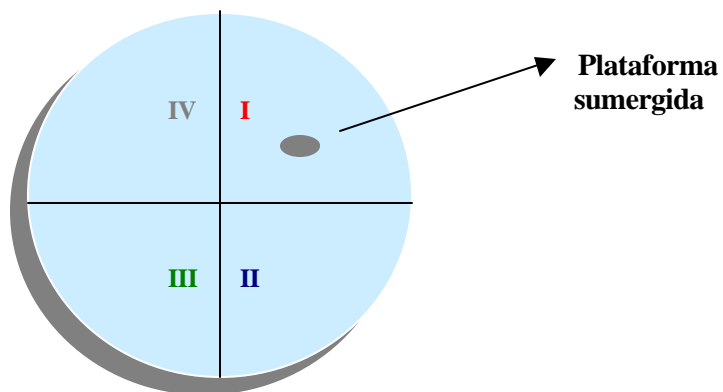
El aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris se evaluó mediante las pruebas conductuales, que se describen a continuación.

- **Fase de entrenamiento en el modelo del laberinto acuático**

En la fase de entrenamiento, se introdujo a las ratas por cuatro posiciones de comienzo alrededor del perímetro de la piscina (Ver figura 16). La primera sesión de entrenamiento, siempre consistió en 4 o 8 ensayos de aprendizaje. En dichos ensayos, se comenzó por situar la rata dentro del agua con la cabeza dirigida hacia la pared de la piscina. Si después de 120 segundos la rata no encuentra la plataforma sumergida, es guiada por el experimentador hacia la misma. Después de cada ensayo, se mantuvo la rata durante un tiempo de 30 segundos en la plataforma (periodo inter-ensayo), antes del comienzo del siguiente ensayo. Una vez los ensayos finalizaron, y tras un período de secado, las ratas

---

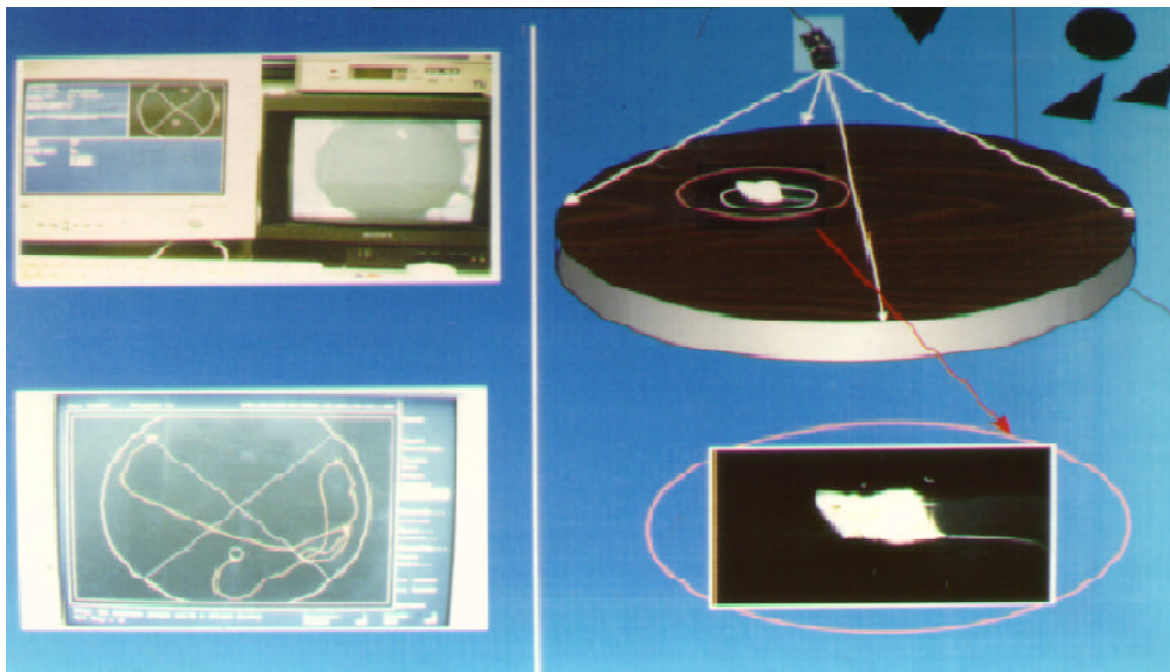
se devolvieron a sus respectivas jaulas en el estabulario. A lo largo de las sesiones de la fase de aprendizaje se midió la latencia o tiempo que tardan las ratas para encontrar la plataforma sumergida.



**Figura 16.** En el esquema adjunto se muestra la disposición de los cuadrantes imaginarios en el laberinto acuático de Morris. Las ratas fueron introducidas dentro del agua con su cabeza hacia la pared de la piscina, de forma aleatoria en cada uno de los cuadrantes, y la plataforma se situó en el cuadrante I de la piscina.

- **Test de transferencia**

En este test, cada rata se reintroduce en la piscina, en la que se ha retirado la plataforma, durante un tiempo total de 60 segundos. El parámetro conductual que se analiza es el tiempo de permanencia de las ratas en cada uno de los cuatro cuadrantes imaginarios en los que se dividió la piscina. Se midió el tiempo de permanencia desglosado en los primeros y los últimos 30 segundos del test.



**Figura 17.** Figura que ilustra el modelo del laberinto acuático de Morris, donde se indican los cuadrantes imaginarios en los que se dividió la piscina (parte izquierda), la trayectoria seguida por las ratas (extremo inferior izquierda), así como la localización de la plataforma (rodeada por un círculo rojo en la figura), y las claves espaciales externas al campo visual de la piscina que guían a las ratas en su orientación espacial (extremo superior derecha).

### **3.4. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS CON LA DROGA INHIBIDORA DE LA SÍNTESIS DE CORTICOSTERONA (METIRAPONA)**

- **Preparación e inyección de la metirapona**

La metirapona [2-metil-1.2-di (3 piridil)-1-propanona; Sigma] se disolvió en polietilenglicol (a una concentración final menor del 10 %), diluido con 0,9 % de suero salino estéril hasta alcanzar las concentraciones apropiadas. Las dosis del inhibidor de la síntesis de corticosterona empleada fue de 100 mg/Kg, y se administró subcutáneamente –s.c- en un volumen de 2 ml/rata). La droga se inyectó 90 minutos antes del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto en base a

---

previos estudios conductuales y neuroendocrinos (Loscertales y cols, 1997) a las concentraciones ya mencionadas.

- **Preparación del vehículo**

El vehículo se inyectó subcutáneamente al mismo volumen y a la misma concentración. Para la preparación del vehículo se disolvió polietilenglicol (a una concentración final menor del 10 %), diluido con suero salino estéril al 0,9 % .

### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Los datos experimentales obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media. Para el análisis estadístico de los resultados en cada uno de los experimentos realizados en esta Tesis, se utilizaron diferentes pruebas. En la mayoría de los casos, cuando los experimentos incluían tres o más grupos de animales, o medidas repetidas, las medias se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) factorial, bien de una o de dos vías en función del experimento.

También se realizaron análisis a posteriori mediante la prueba de t de Student para estudiar las posibles diferencias cuando se compararon dos grupos experimentales entre sí. Se aceptó que los datos son significativos cuando el nivel de significación estadística fue menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

---

## **4. RESULTADOS**

---

## **4.1. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL INDUCIDA POR EL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL CONTEXTO**

Se estudió la posibilidad de que el aprendizaje en el modelo del condicionamiento del miedo al contexto (CMC) con distintos niveles de estrés intrínseco, pudiera modular la expresión de moléculas de adhesión celular neural en las diferentes regiones cerebrales analizadas. Para ello, se seleccionaron dos tiempos diferentes de análisis después del entrenamiento: 24 horas (primer experimento) y 12 horas (segundo experimento). El estudio se realizó en ratas controles y ratas que fueron asignadas a distintos grupos experimentales en función de la intensidad de choque eléctrico que recibió cada rata en la sesión de condicionamiento: 0,2, 0,4 o 1 mA de intensidad.

También se evaluaron los niveles circulantes de corticosterona tras la exposición al test de retención, con el objeto de estudiar si podría existir alguna relación entre los niveles de este corticosteroide y los parámetros conductuales y neurales evaluados.

### **4.1.1. Efectos del condicionamiento del miedo al contexto evaluados 24 horas después del entrenamiento**

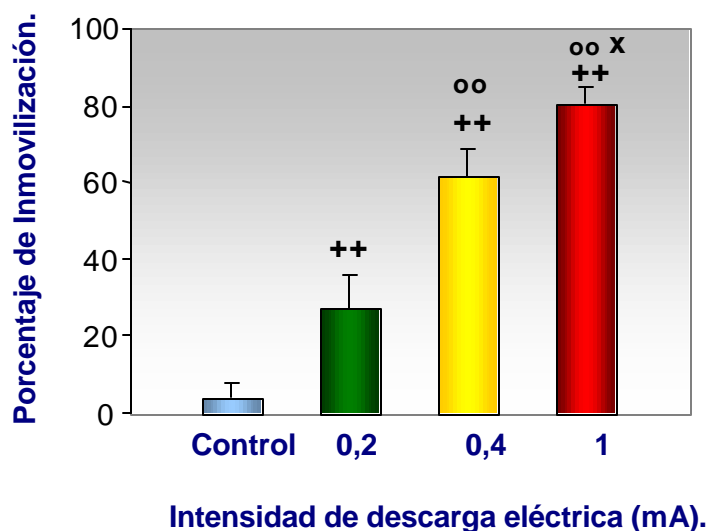
En este experimento, distintos grupos de ratas fueron entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto bajo distintas condiciones de choque eléctrico y, 24 horas más tarde, se procedió a la evaluación de los distintos parámetros (i) conductuales: retención de la conducta de inmovilización al reintroducir los animales en la caja de condicionamiento; (ii) endocrinos: niveles plasmáticos de corticosterona 10 minutos después del momento en el que se reintroduce a las ratas en la caja de condicionamiento; y (iii) moleculares: expresión de las distintas moléculas de adhesión celular neural estudiadas en este trabajo, en diversas áreas cerebrales.

#### **4.1.1.1. Efectos conductuales**

El entrenamiento en el condicionamiento del miedo al contexto utilizando distintas intensidades de choque eléctrico, indujo distintos niveles de retención de la conducta cuando se evaluó 24 horas post-entrenamiento (ver figura 1). El ANOVA de los datos correspondientes a la variable



inmovilidad conductual mostró un efecto significativo del factor grupo [ $F(3,45)=29,38$ ,  $p<0,0001$ ]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, indicó que el porcentaje de inmovilidad conductual fue significativamente más elevado en todos los grupos condicionados, comparados con el grupo control, que fue introducido en la caja de Skinner, pero no recibió descarga eléctrica alguna ( $p<0,05$  en todos los casos analizados). Además, el grupo que se entrenó a 1mA de intensidad mostró niveles de inmovilidad conductual significativamente más elevados que los grupos entrenados con un choque eléctrico de 0,2 y 0,4 mA de intensidad ( $p<0,005$  y  $p<0,05$ , respectivamente). A su vez, el grupo entrenado a 0,4 mA de intensidad mostró valores de inmovilidad conductual significativamente más elevados que los del grupo entrenado a 0,2 mA ( $p<0,005$ ).



++  $p<0,005$  vs grupo control manipulado.

oo  $p<0,005$  vs grupo que se entrenó a 0,2 mA en el CMC.

x  $p<0,05$  vs grupo que se entrenó a 0,4 mA en el CMC.

Control= Grupo control manipulado.

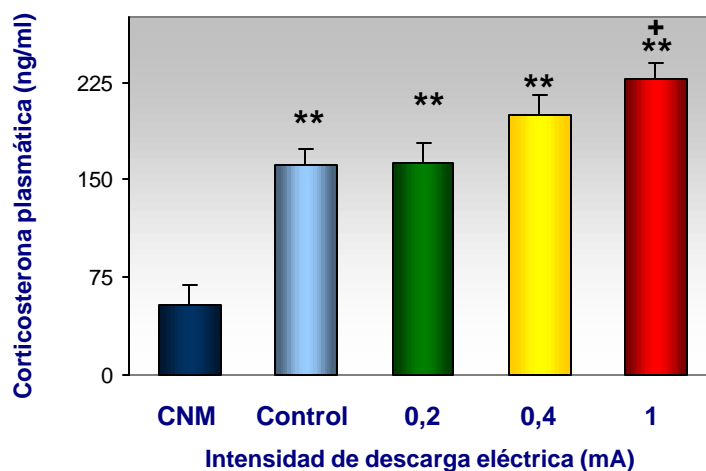
0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

---

**Figura 1.** En la gráfica se muestra la media del porcentaje de inmovilidad conductual en la fase de retención, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

#### 4.1.1.2. Niveles de corticosterona plasmática

El ANOVA de los datos correspondientes a los niveles plasmáticos de corticosterona, medidos en la fase de retención, 24 horas después del entrenamiento en el CMC, mostró un efecto significativo de grupo [ $F(4,57)=13,12$ ,  $p<0,0001$ ], ver figura 2]. La realización de análisis t de Student *a posteriori* indicó que todos los grupos condicionados mostraban niveles de corticosterona plasmática incrementados significativamente como consecuencia del entrenamiento, en comparación con el grupo control no manipulado ( $p<0,005$  en todos los casos analizados). Además, el grupo control que recibió manipulación experimental, pero no descarga eléctrica, mostraba niveles de corticosterona plasmática significativamente más elevados que los del grupo control no manipulado ( $p<0,05$ ). Por otro lado, el grupo entrenado en el CMC con choque eléctrico de 1 mA de intensidad también mostró niveles de corticosterona significativamente más elevados que el grupo manipulado ( $p<0,05$ ).



\*\*  $p<0,005$  vs grupo control no manipulado.

+  $p<0,05$  vs grupo control manipulado.

CNM= Grupo control no manipulado.

---

Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 2.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la media de los niveles plasmáticos de corticosterona en la fase de retención, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, 24 horas después del entrenamiento en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

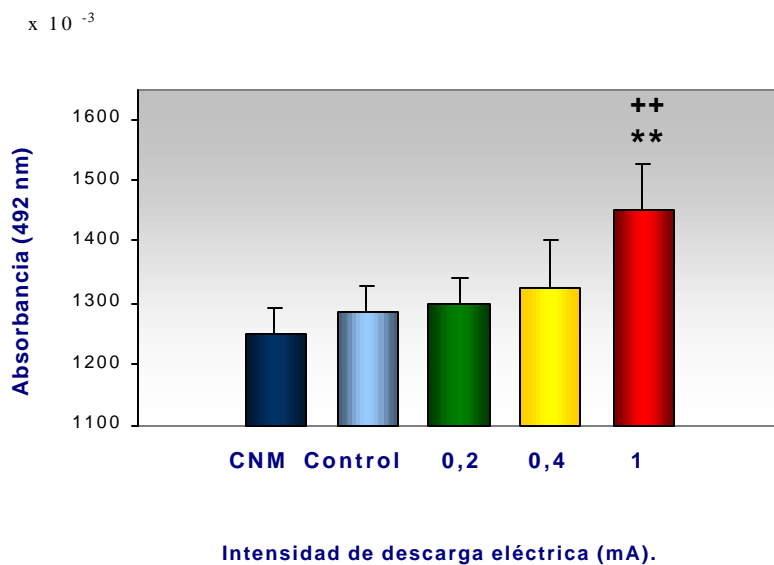
#### **4.1.1.3. Expresión de las distintas CAMs en diversas regiones cerebrales**

A continuación, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de moléculas de adhesión celular neural (NCAM, su forma polisializada, PSA-NCAM, y L1), en las diferentes regiones cerebrales estudiadas, 24 horas después del entrenamiento en el modelo del CMC.

##### **4.1.1.3.1. Hipocampo**

- **Expresión de NCAM**

Los datos correspondientes a la expresión de NCAM en el hipocampo, 24 horas post-entrenamiento, se muestran en la en la figura 3. El ANOVA indicó un efecto del entrenamiento en los niveles de NCAM [(F(4,57)=4,78,  $p<0,002$ , ver figura 3)]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, indicó que el grupo de 1 mA mostró un aumento significativo en la expresión de NCAM, tanto al compararlo con el grupo control no manipulado ( $p<0,005$ ), como con el grupo control manipulado ( $p<0,005$ ). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la expresión de NCAM entre ambos grupos controles, manipulado y no manipulado ( $p>0,05$ , n.s).



\*\* p<0,005 vs grupo control no manipulado.

++ p<0,05 vs grupo control manipulado.

CNM= Grupo control no manipulado.

Control= Grupo control manipulado.

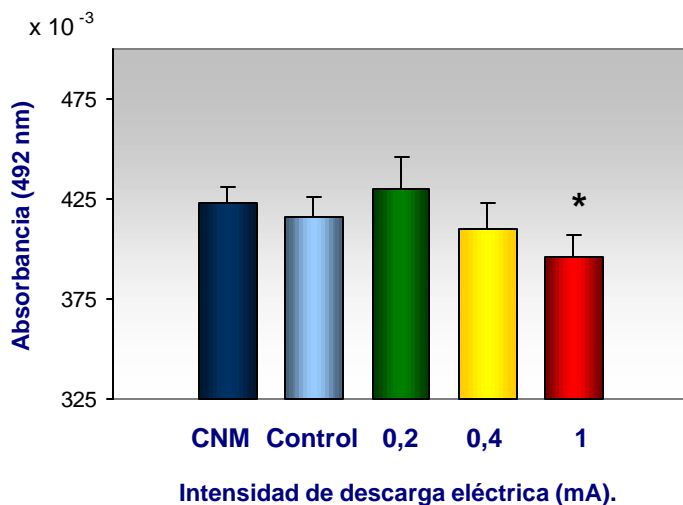
0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 3.** En la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en el hipocampo, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

### • Expresión de PSA-NCAM

El ANOVA de los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el hipocampo, 24 horas después del entrenamiento en el modelo de condicionamiento del miedo al contexto indicó un efecto significativo de grupo [F (4,57)= 2,48, p<0,05], ver figura 4]. El análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student indicó que los niveles de PSA-NCAM son significativamente más bajos en el grupo entrenado en el CMC con un choque eléctrico de 1 mA de intensidad, cuando se comparan con el grupo control no manipulado (p<0,005), observándose también una tendencia hacia la significación

estadística cuando los valores del grupo de 1 mA se comparan con los del grupo control manipulado ( $p < 0,09$ , n.s).



\*  $p < 0,05$  vs grupo control no manipulado.

CNM= Grupo control no manipulado.

Control= grupo control manipulado.

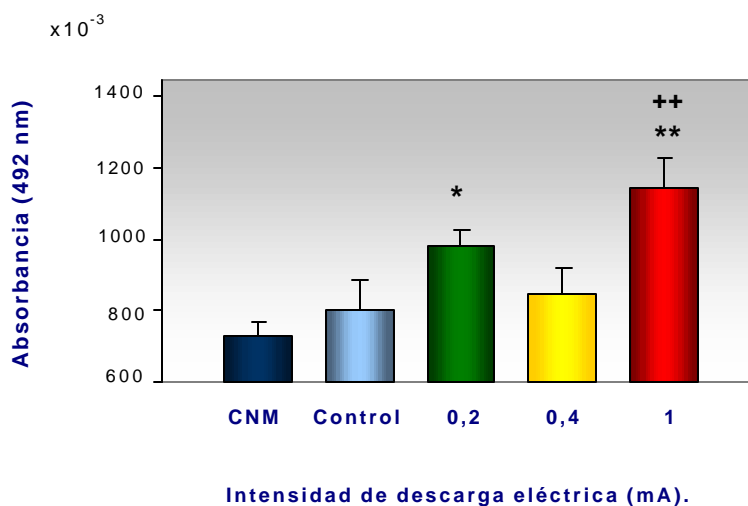
0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 4.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el hipocampo, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

### • Expresión de L1

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de L1 en el hipocampo, 24 horas post-entrenamiento, mostró un efecto significativo del entrenamiento  $F [(4,57)=10,04, p < 0,0001]$ . La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, mostró que el condicionamiento del miedo al contexto modulaba la expresión de L1 que, como puede observarse en la Figura 5, mostraba un patrón de expresión bifásico con respecto a la intensidad de descarga eléctrica. Así, el

grupo que se entrenó a 1 mA de intensidad en el CMC mostró valores de L1 significativamente más elevados, comparados tanto con los del grupo control no manipulado ( $p < 0,005$ ), como manipulado ( $p < 0,005$ ), respectivamente. Además, el grupo entrenado a 0,2 mA mostró valores de L1 significativamente más elevados que los del grupo control no manipulado ( $p < 0,02$ ) y una tendencia a mostrar valores de L1 significativamente más elevados que los del grupo control no manipulado ( $p < 0,06$ , n.s).



\*  $p < 0,05$  vs grupo control no manipulado.

\*\*  $p < 0,005$  vs grupo control no manipulado.

++  $p < 0,005$  vs grupo control manipulado.

CNM= Grupo control no manipulado.

Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

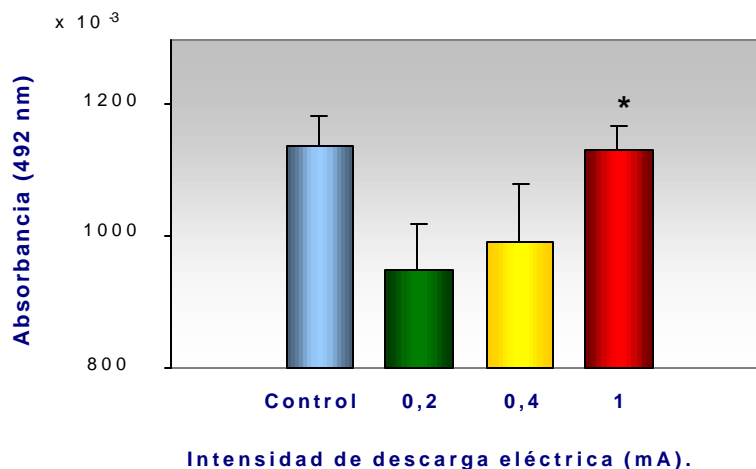
**Figura 5.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el hipocampo, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

#### 4.1.1.3.2. Corteza frontal

Puesto que los análisis efectuados en el hipocampo mostraron que los grupos control manipulado y no manipulado no diferían en los parámetros moleculares evaluados, se decidió utilizar a partir de entonces un único grupo control (no manipulado) en los distintos experimentos. Dadas las limitaciones para disponer de anticuerpo contra L1, los análisis efectuados en el resto de regiones cerebrales no incluyen la medición de esta molécula.

- **Expresión de NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de NCAM en la corteza frontal no mostró una tendencia hacia la significación estadística del factor entrenamiento [F(3,41)=2,011,  $p < 0,1275$ , n.s.]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, indicó que el grupo entrenado con choque eléctrico de 1 mA de intensidad mostró un aumento significativo en la expresión de NCAM al compararse con el grupo entrenado a 0,2 de intensidad ( $p < 0,05$ ), observándose también una tendencia hacia la significación estadística al compararse los valores de dicho grupo de 1 mA con los del grupo entrenado a una intensidad de 0,4 mA ( $p < 0,16$ , n.s). Por otra parte, el grupo entrenado a 0,2 mA mostró una tendencia a mostrar valores de NCAM significativamente más bajos ( $p < 0,075$ , n.s) que el grupo control (ver figura 6).



\*  $p < 0,05$  vs grupo que se entrenó a 0,2 mA en el CMC.

---

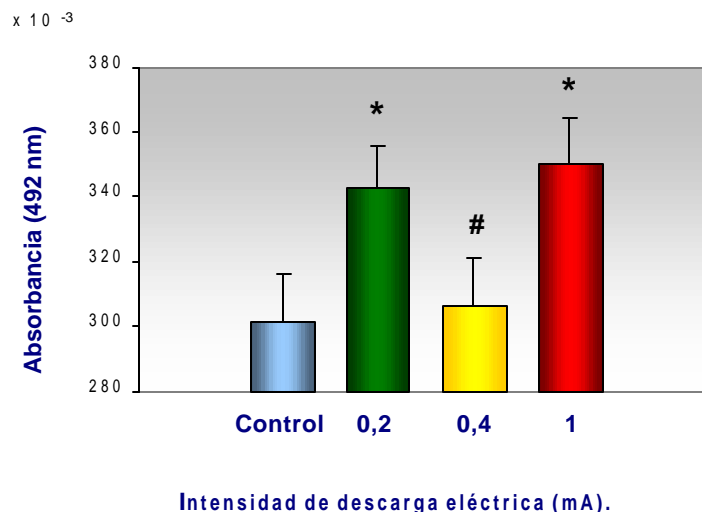
Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 6** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en la corteza frontal, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

- **Expresión de PSA-NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de PSA-NCAM, 24 horas después del entrenamiento, mostró un efecto significativo del factor grupo [ $F(3,42)=2,74$ ;  $p<0,05$ , ver figura 7]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, mostró un aumento significativo de los niveles de PSA-NCAM, tanto en el grupo entrenado a la más baja intensidad de descarga eléctrica (0,2 mA,  $p<0,05$ ), como del grupo entrenado a 1 mA de intensidad ( $p<0,05$ ), cuando sus valores se comparaban con el grupo control. Por otro lado, el grupo que se entrenó en el CMC a 0,4 mA, mostró niveles de PSA-NCAM significativamente más bajos tanto vs grupo entrenado a 1 mA ( $p<0,05$ ), como valores más bajos tendentes a la significación estadística en comparación al grupo de 0,2 mA ( $p<0,064$ , n.s).





\*  $p < 0,05$  versus grupo control manipulado.

#  $p < 0,05$  versus grupo que se entrenó a 1 mA en el CMC.

Control= Grupo control manipulado.

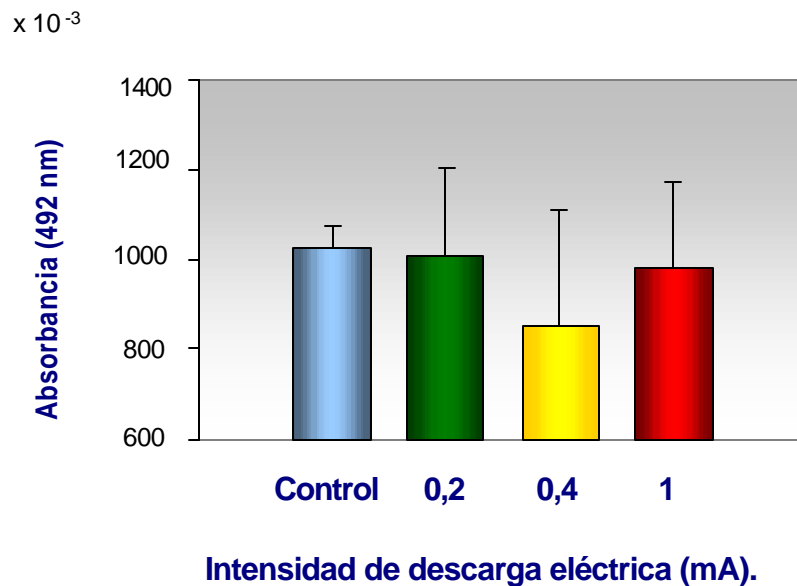
0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 7.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en la corteza frontal, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

#### **4.1.1.3.3. Estriado**

- **Expresión de NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de NCAM en el estriado, 24 horas post-entrenamiento, no mostró un efecto significativo del factor grupo [ $F(3,41)=2,83$ ,  $p < 0,21$ , n.s, ver figura 8].



---

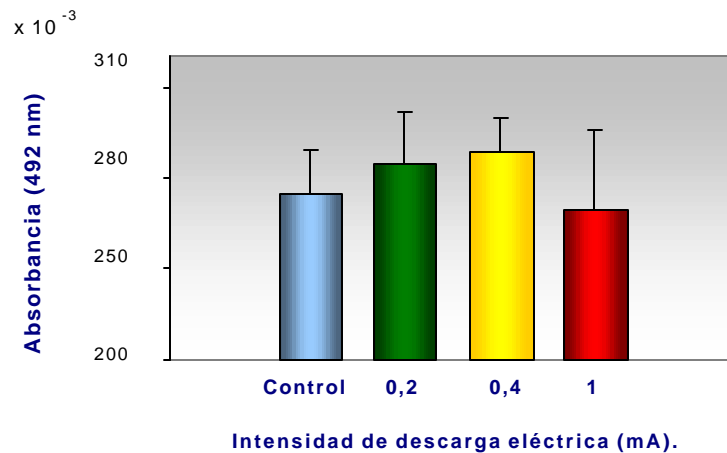
Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 8** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en el estriado, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, (medida en sinaptosomas a 492 nm), 24 horas en el después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

- **Expresión de PSA-NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el estriado, 24 horas post-entrenamiento, no mostró un efecto significativo del factor grupo grupo [ $F(3,34)=2,88$ ;  $p=0,74$ , n.s, ver figura 9].



Control= Grupo control manipulado.

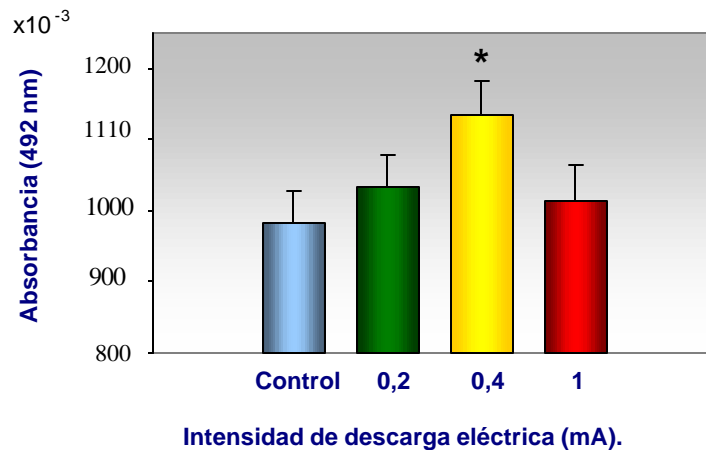
0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 9.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el estriado, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

#### 4.1.1.3.4. Hipotálamo

- **Expresión de NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de NCAM en el hipotálamo no mostró un efecto significativo del factor grupo grupo  $F[(3,43)=1,441, p<0,24]$  (ver figura 10). La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student mostró un aumento significativo en la expresión de NCAM en el grupo entrenado con una intensidad de descarga eléctrica intermedia de 0,4 mA ( $p<0,04$ ) versus grupo control. Además, en dicho grupo entrenado a 0,4 mA de intensidad, se observó una tendencia a mostrar valores de NCAM significativamente más elevados tanto en comparación al grupo entrenado a 0,2 mA ( $p<0,087$ , n.s) como versus grupo que se entrenó a 1 mA en el CMC ( $p<0,11$ , n.s).



\*  $p<0,05$  vs grupo control manipulado.

Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4

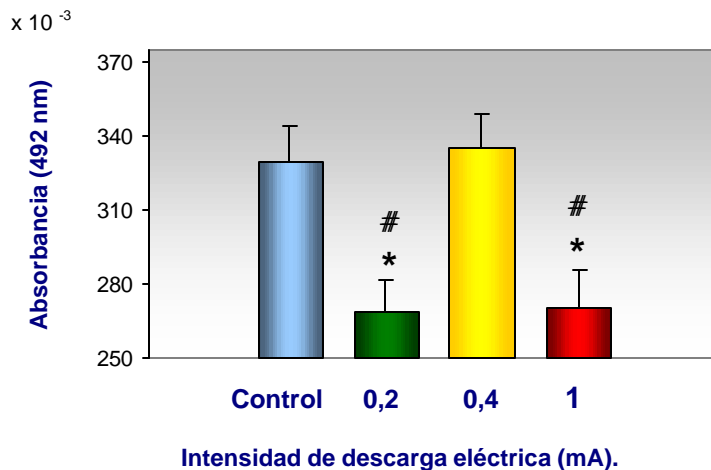
y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 10.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en el hipotálamo, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

---

- **Expresión de PSA-NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el hipotálamo mostró un efecto significativo del factor grupo  $F[(3,42)=3,336, p<0,0288, \text{ver figura 11}]$ . La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, mostró que tanto el grupo entrenado a 0,2 mA, ( $p<0,05$ ), como el entrenado con la intensidad de descarga más alta -de 1 mA- ( $p<0,05$ ), mostraron niveles de PSA-NCAM significativamente más bajos que los del grupo control. Por otro lado, el grupo entrenado a 0,4 mA mostró niveles de PSA-NCAM significativamente más elevados tanto con respecto al grupo entrenado a 0,2 mA ( $p<0,025$ ), como versus grupo entrenado a 1 mA ( $p<0,02$ ), pero este grupo (0,4 mA) no difirió del grupo control.



\*  $p<0,05$  vs grupo control manipulado.

#  $p<0,025$  vs grupo que se entrenó a 0,4 mA en el CMC.

Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 11.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el hipotálamo, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

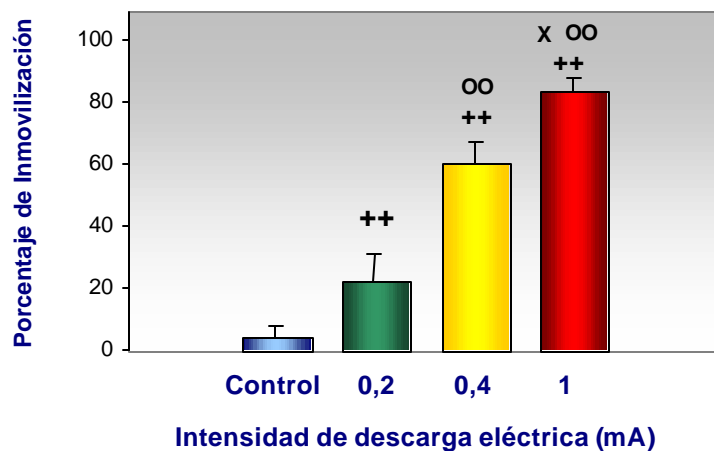
---

### **4.1.2. Efectos del condicionamiento del miedo al contexto evaluados 12 horas después del entrenamiento**

En este experimento, se siguió el mismo diseño experimental que en el anterior, con la diferencia de que los distintos parámetros evaluados se estudiaron 12 horas después del entrenamiento, con el objeto de estudiar una posible dinámica de modulación de los mismos en función del tiempo transcurrido tras la adquisición de la conducta de condicionamiento del miedo. Así pues, distintos grupos de ratas fueron entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto bajo distintas condiciones de choque eléctrico y, 12 horas más tarde, se procedió a la evaluación de los distintos parámetros (i) conductuales: retención de la conducta de inmovilización al reintroducir los animales en la caja de condicionamiento; (ii) endocrinos: niveles plasmáticos de corticosterona 10 min después del momento en el que se reintroduce a las ratas en la caja de condicionamiento; y (iii) moleculares: expresión de las distintas moléculas de adhesión celular neural estudiadas en este trabajo, en diversas áreas cerebrales.

#### **4.1.2.1. Efectos conductuales**

El ANOVA de los datos correspondientes a la inmovilidad conductual mostrada por las ratas, expuestas al test de retención 12 horas post-entrenamiento, mostró un efecto significativo del factor grupo [ $F(3,37)=27,25$ ;  $p<0,0001$ , ver figura 12]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, indicó que la inmovilidad conductual mostrada por todos los grupos condicionados (grupos de 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente) fue significativamente más alta en todos ellos, en comparación con el grupo control manipulado ( $p<0,05$  en todos los grupos analizados). Además, también se observó que el grupo que se entrenó a 1 mA de intensidad mostraba valores de inmovilidad conductual significativamente más elevados, tanto al compararlo con el grupo entrenado a una intensidad de 0,4 mA ( $p<0,05$ ), como con el grupo entrenado a 0,2 mA ( $p<0,005$ ). Además, el grupo entrenado a una intensidad intermedia de 0,4 mA también, mostraba valores de inmovilización conductual significativamente más elevados que los de las ratas entrenadas a 0,2 mA ( $p<0,005$ ).



++  $p < 0,005$  vs grupo control manipulado.

oo  $p < 0,005$  vs grupo que se entrenó a 0,2 mA en el CMC.

x  $p < 0,05$  vs grupo que se entrenó a 0,4 mA en el CMC.

Control= Grupo control manipulado.

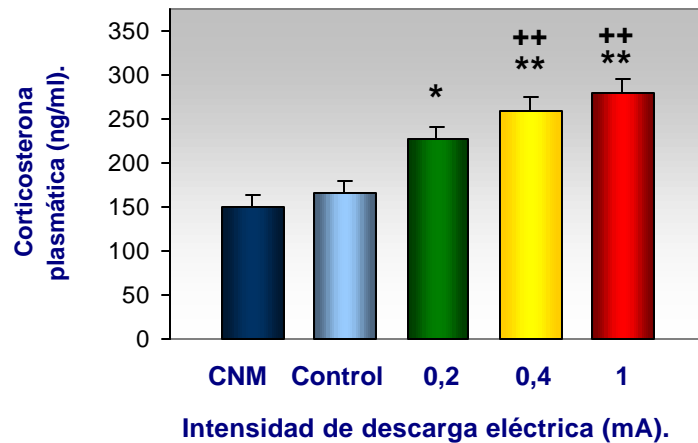
0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4

y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 12.** En la gráfica se muestra la media del porcentaje de inmovilidad conductual en la fase de retención, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, 12 horas después del entrenamiento en el modelo del condicionamiento de miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

#### 4.1.2.2. Niveles plasmáticos de corticosterona

El ANOVA de los datos correspondientes a los niveles plasmáticos de corticosterona (ng/ml), medidos 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el modelo del condicionamiento al contexto, mostró un efecto significativo del factor grupo  $F[(4,59)]=7,88$ ,  $p < 0,0001$ , ver figura 13]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, mostró que todos los grupos condicionados mostraban niveles plasmáticos de corticosterona significativamente incrementados, como resultado del entrenamiento, al compararlos con el grupo control no manipulado ( $p < 0,01$  en todos los grupos analizados). Por otro lado, los grupos entrenados a 1 mA y 0,4 mA, mostraban niveles de corticosterona plasmática significativamente más elevados que los del grupo control manipulado ( $p < 0,05$ , en ambos casos).



\*  $p < 0,05$  vs grupo control no manipulado.

\*\*  $p < 0,005$  vs grupo control no manipulado.

++  $p < 0,005$  vs grupo control manipulado.

CNM= Grupo control no manipulado.

Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4

y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 12.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la media de los niveles plasmáticos de corticosterona en la fase de retención, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

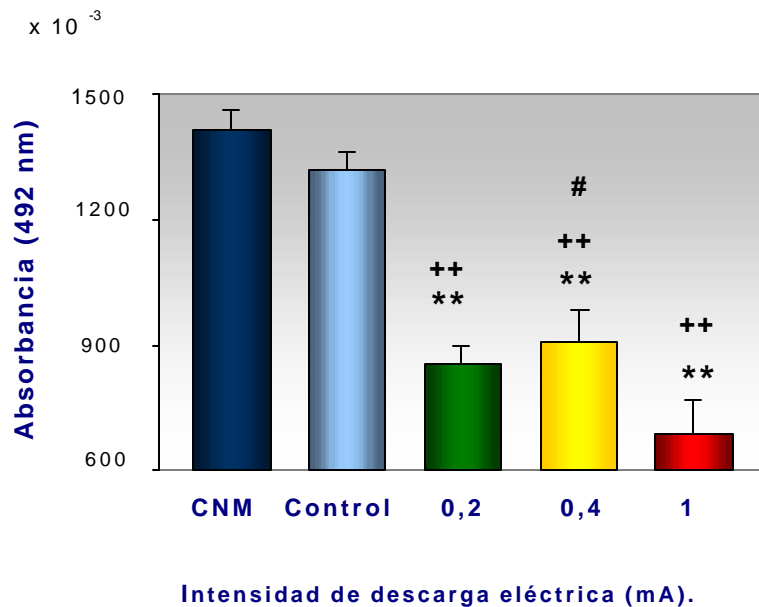
#### **4.1.2.3. Expresión de las distintas CAMs en diversas regiones cerebrales**

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la expresión de moléculas de adhesión celular neural en la fase de retención, 12 horas después del entrenamiento en el modelo de CMC, en el hipocampo y en las diferentes regiones cerebrales analizadas mediante la técnica de ELISA.

### 4.1.2.3.1. Hipocampo

- **Expresión de NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de NCAM en el hipocampo en el test de retención del modelo de CMC, 12 horas después del entrenamiento, mostró un efecto significativo del factor grupo  $F[(4,59)]=29,76$ ,  $p<0,0001$ , ver figura 13]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, indicó que todos los grupos condicionados (grupos de 0,2, 0,4 y 1 mA) mostraban un decremento significativo en la expresión de NCAM al compararlos con cada uno de los grupos controles ( $p<0,005$  en todos los casos analizados). Por otro lado, el grupo entrenado a la intensidad de 0,4 mA, mostró niveles de NCAM significativamente más elevados que los del grupo de 1 mA ( $p<0,02$ ); mientras que en el grupo entrenado a 0,2 mA se observó una tendencia a mostrar valores de NCAM significativamente más elevados que los del grupo de 1 mA ( $p<0,0626$ , n.s).



\*\*  $p<0,005$  vs grupo control no manipulado.

++  $p<0,005$  vs grupo control manipulado.

#  $p<0,02$  vs grupo que se entrenó a 1 mA en el CMC.

CNM= Grupo control no manipulado.



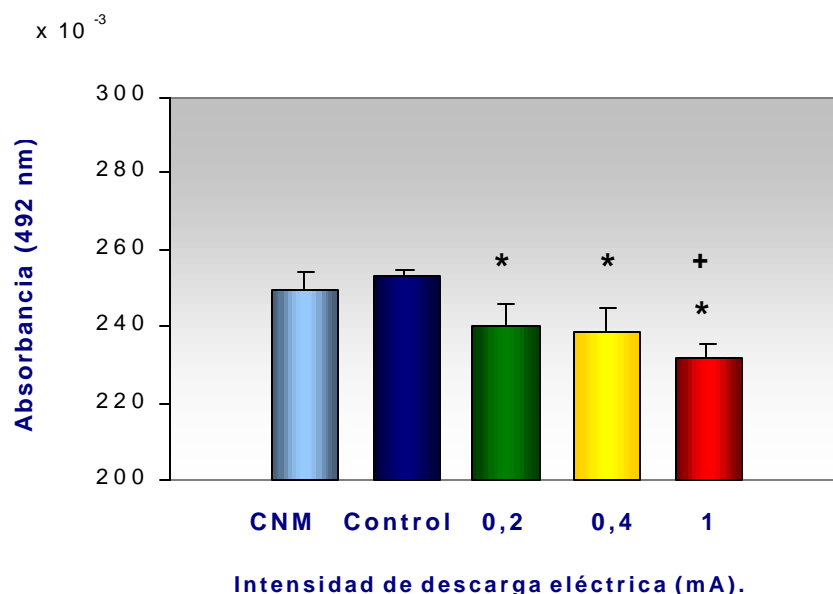
Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 13.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en el hipocampo, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

### • Expresión de PSA-NCAM

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de la forma polisializada de NCAM, PSA-NCAM, en el hipocampo, 12 horas post-entrenamiento, mostró un efecto significativo del factor grupo  $F(4,59)=3,91$ ,  $p<0,00001$ , ver gráfica 14]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student indicó que la expresión de PSA-NCAM se mantuvo significativamente más baja en todos los grupos entrenados en el condicionamiento del miedo al contexto, en comparación con el grupo control no manipulado ( $p<0,05$ , en todos los casos). También indicó que el grupo que se entrenó a 1 mA de intensidad mostró niveles de PSA-NCAM significativamente disminuidos en comparación con los del grupo control manipulado ( $p<0,05$ ) (ver gráfica 14).



\*  $p<0,05$  vs grupo control no manipulado

+  $p<0,05$  vs grupo control manipulado.

---

CNM= Grupo control no manipulado.

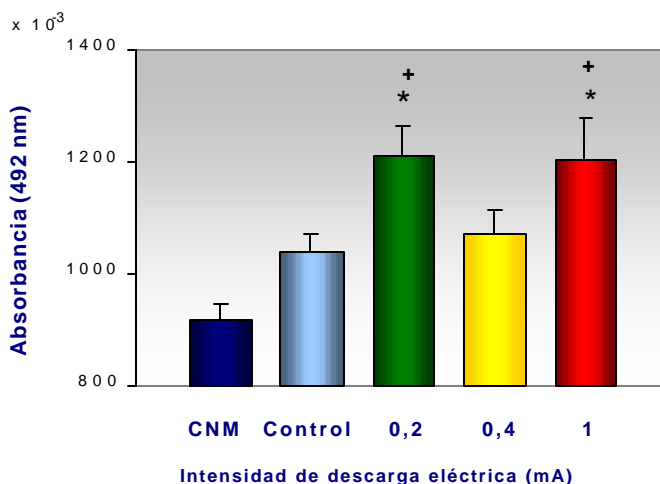
Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 14.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el hipocampo, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto.

- **Expresión de L1**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de L1 en el hipocampo, 12 horas después del entrenamiento, mostró un efecto significativo del factor tratamiento  $F(4,59)=8,75$ ,  $p<0,0001$ , ver gráfica 15). La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student mostró que los niveles de L1 se vieron significativamente incrementados en los grupos entrenados en el modelo del condicionamiento del miedo al contexto, tanto con la más baja intensidad (0,2 mA), como con la más alta intensidad de descarga eléctrica (1 mA), comparados tanto versus grupo control manipulado ( $p<0,05$  en ambos casos), como en comparación al grupo control no manipulado ( $p<0,05$  en ambos casos). Por otro lado, el análisis t de Student evidenció una alta tendencia en las ratas entrenadas a 0,4 mA a mostrar valores de L1 significativamente más bajos tanto en comparación a los del grupo entrenado a 1 mA ( $p<0,069$ , n.s), como en comparación al grupo que se entrenó a 0,2 mA en el CMC ( $p<0,063$ , n.s).



---

\*  $p < 0,05$  vs grupo control no manipulado.

+  $p < 0,05$  vs grupo control manipulado.

Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

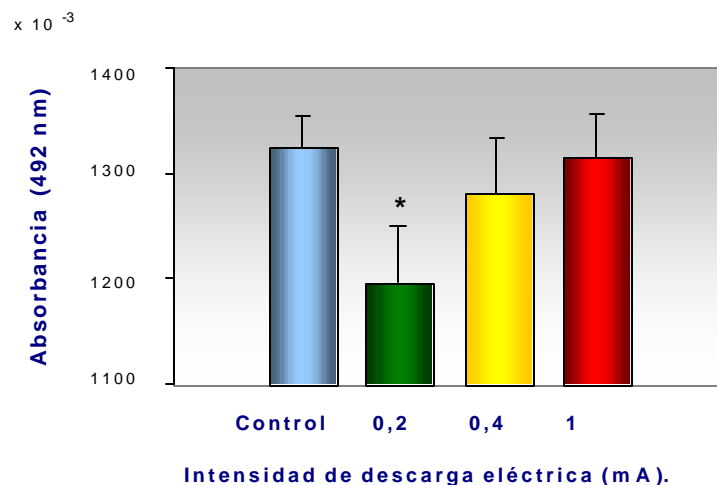
**Figura 15.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de L1 en el hipocampo, de 10-20 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

#### **4.1.2.3.2. Amígdala**

En este experimento se incluyó la amígdala entre las regiones cerebrales estudiadas por considerarse su interés, dada la amplia literatura que relaciona este complejo de núcleos con el condicionamiento del miedo.

##### **• Expresión de NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de NCAM en la amígdala no indicó un efecto significativo del factor grupo  $F[(3,36)=1,54, p < 0,22]$ . No obstante, dadas las variaciones observadas en la gráfica 16, se procedió a realizar análisis estadísticos post hoc. El análisis *a posteriori* de t de Student, indicó que el grupo que se entrenó a 0,2 mA en el CMC, mostró niveles de NCAM significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) que los del grupo control manipulado.



\*  $p < 0,05$  vs grupo control manipulado.

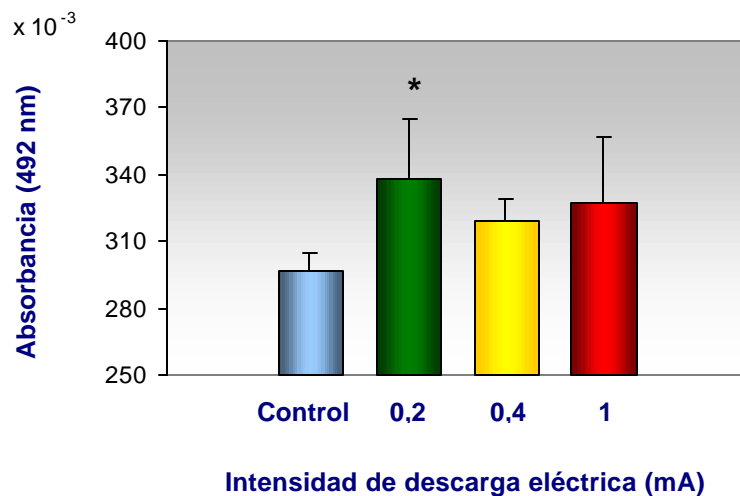
Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 16.** En la gráfica, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en la amígdala, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

- **Expresión de PSA-NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en la amígdala, no indicó un efecto significativo del factor grupo [ $F(3,36)=2,58$ ,  $p < 0,07$ , n.s, ver gráfica 17]. No obstante, dadas las variaciones observadas en la gráfica 17, se procedió a realizar análisis estadísticos *post hoc*. La realización de análisis *a posteriori* mediante la prueba de t de Student, indicó que el grupo entrenado a 0,2 mA de intensidad mostró valores de PSA-NCAM significativamente más elevados ( $p < 0,01$ ) que los del grupo control manipulado. Por otro lado, se observó unos niveles de PSA-NCAM aumentados, que tendían a la significación estadística en el grupo de 1 mA vs grupo de 0,4 mA ( $p < 0,071$ ; n.s). No se observaron diferencias significativas en el grupo de 0,4 mA en comparación al grupo entrenado a 0,2 mA ( $p < 0,24$ , n.s), ni versus grupo control manipulado ( $p < 0,19$ , n.s).



\*  $p < 0,05$  vs grupo control manipulado.

Control= Grupo control manipulado.

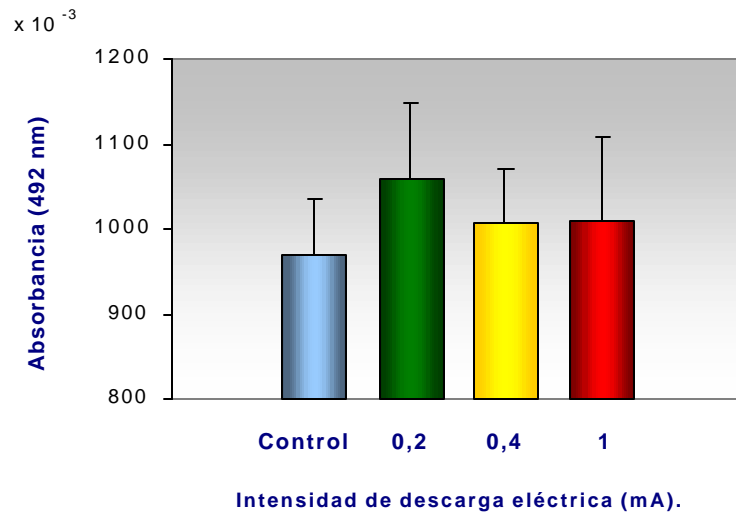
0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 17.** En la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en la amígdala, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas a 492 nm), 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto.

#### 4.1.2.3.3. Corteza frontal

- **Expresión de NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de NCAM en la corteza frontal, 12 horas después del entrenamiento, no mostró un efecto significativo de grupo  $F[(3,37)=0,196, p<0,89, n.s, \text{ver gráfica 18}]$ .



Control= Grupo control manipulado.

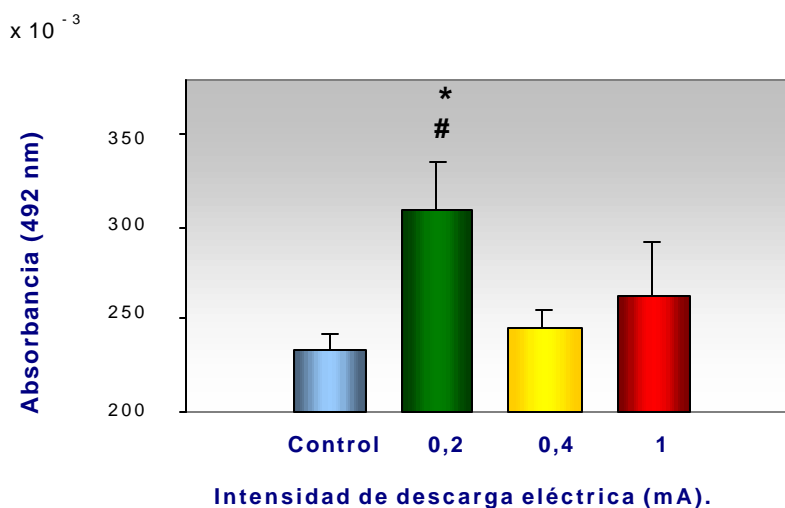
0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 18.** En la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en la corteza frontal, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida

en sinaptosomas crudos a 492 nm), 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

- **Expresión de PSA-NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en la corteza frontal 12 horas después del condicionamiento, mostró un efecto significativo del factor entrenamiento [F(4,36)=3,273,  $p<0,03$ ]. La realización de análisis *a posteriori* mediante la prueba de t de Student, indicó que el grupo entrenado a 0,2 mA mostraba valores de NCAM significativamente más elevados, tanto al compararlo con el grupo control ( $p<0,01$ ), como con el grupo que se entrenó a 0,4 mA de intensidad ( $p<0,025$ , ver gráfica 19)



\*  $p<0,05$  vs grupo control manipulado.

#  $p<0,05$  vs grupo que se entrenó a 0,4 mA en el CMC.

Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4

y 1 mA, respectivamente en el CMC.

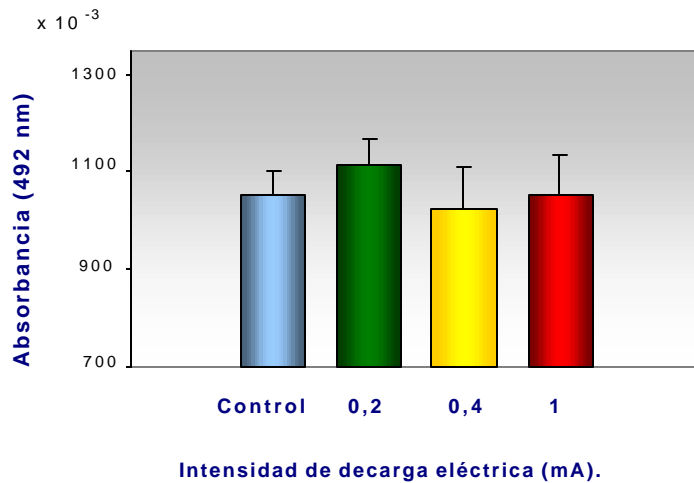
**Figura 19.** En la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en la corteza frontal, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

---

#### 4.1.2.3.4. Estriado

- **Expresión de NCAM**

EL ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de NCAM en el estriado, 12 horas después del entrenamiento, no mostró un efecto significativo de tratamiento  $F(3,38)=0,58$ ,  $p<0,63$ , n.s., ver gráfica 20]



Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4

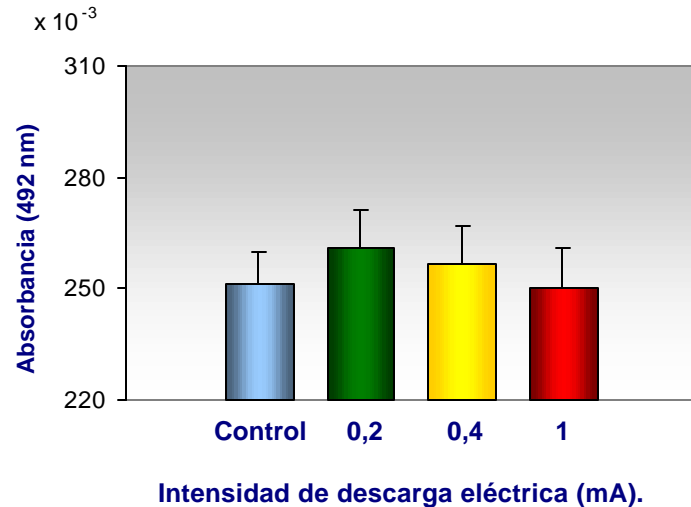
y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 20.** En la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en el estriado, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

---

- **Expresión de PSA-NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el estriado no mostró un efecto significativo del factor tratamiento  $F[(3,37)=0,8, p<0,477, n.s., \text{ver gráfica 21}]$ .



Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

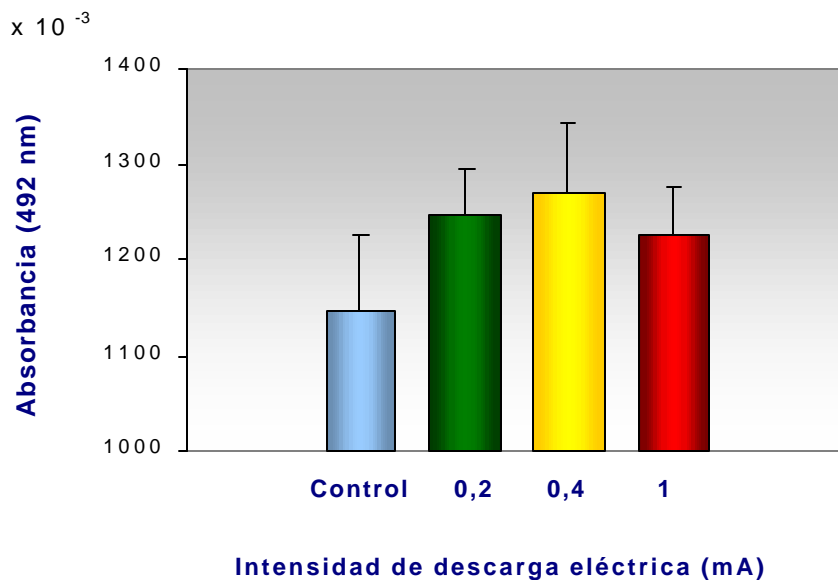
**Figura 21.** En la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el estriado, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto.

#### **4.1.2.3.5. Hipotálamo**

- **Expresión de NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de NCAM en el hipotálamo, no mostró un efecto significativo del factor grupo  $F[(3,40)=1,43, p<0,25, n.s., \text{ver gráfica 22}]$ .





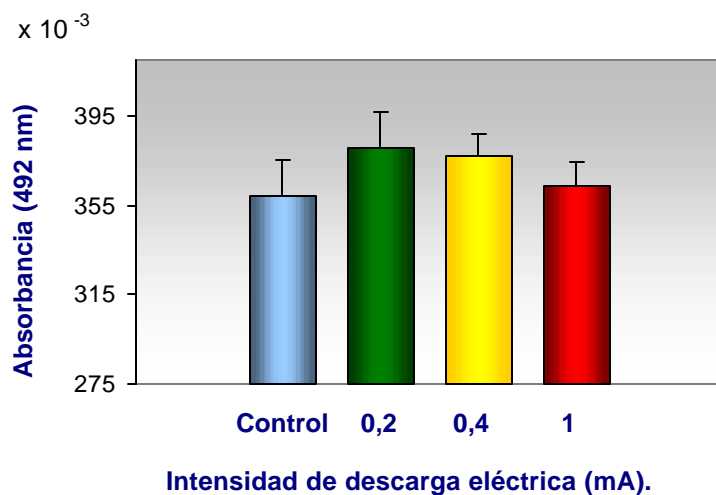
Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 22.** En la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la expresión de NCAM en el hipotálamo, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto a diferentes intensidades de descarga eléctrica.

- **Expresión de PSA-NCAM**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el hipotálamo, no mostró un significativo efecto del factor grupo  $F [(3,37)=0,8, p<0,5, n.s.]$ .



---

Control= Grupo control manipulado.  
0,2, 0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4  
y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 21.** En la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el hipotálamo, de 7-15 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media (medida en sinaptosomas crudos a 492 nm), 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto.

#### **4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA CORTICOSTERONA EN LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN HIPOCAMPAL DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL, Y SU POLISIALIZACIÓN, INDUCIDA POR EL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL CONTEXTO**

En este experimento, nos planteamos la posibilidad de que algunos de los efectos moduladores de la expresión de NCAM, y su forma polisializada PSA-NCAM, observados en el apartado anterior pudieran estar mediados por las acciones de la corticosterona liberada como consecuencia del entrenamiento. Para evaluar esta posibilidad, diseñamos un experimento dirigido a inhibir la liberación de corticosterona durante el condicionamiento, con el objeto de estudiar las consecuencias conductuales y moleculares de dicha manipulación experimental. Por otra parte, otros estudios de nuestro grupo mostraron que la administración del inhibidor de la síntesis y liberación de corticosterona, metirapona (inyectada subcutáneamente a 100 mg/Kg), 90 min antes del entrenamiento, induce una reducción en los niveles de condicionamiento del miedo al contexto adquirido por los animales (Cordero y cols, 2001).

Así pues, aquí se planteó la posibilidad de que la administración intraperitoneal de metirapona pudiera ser capaz de modular (revertir) la modulación en la expresión de moléculas de adhesión celular observada en el hipocampo a nivel de NCAM y PSA-NCAM 12 horas post-entrenamiento, en ratas entrenadas en el modelo de CMC con un choque eléctrico de 1 mA de intensidad. En este experimento, además, se exploraron las consecuencias conductuales y neuroendocrinas de dicho tratamiento en la retención del condicionamiento y los niveles post-test de corticosterona, evaluados, por tanto, 12 horas después del entrenamiento.

---

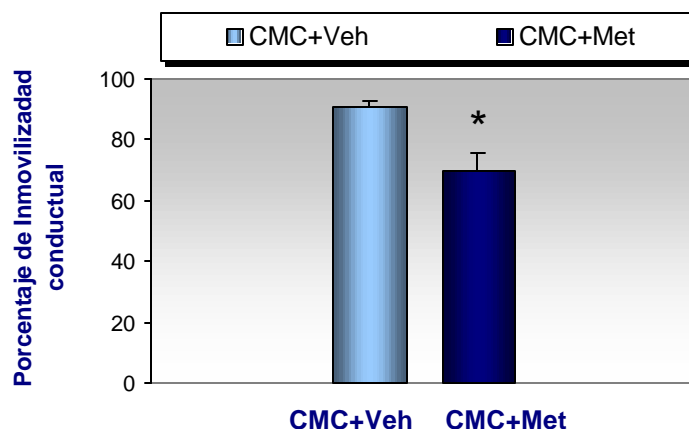
### **4.2.1. Efectos de la metirapona en las acciones inducidas por el condicionamiento del miedo al contexto evaluados 12 horas después del entrenamiento**

Para estudiar éstos objetivos se planteó un protocolo en el que se incluyeron 4 grupos. Así, se inyectó subcutáneamente metirapona a la mitad de los grupos, y vehículo a los otros dos restantes, dando lugar a los siguientes grupos experimentales: (i) grupo al que se inyectó metirapona (subcutáneamente, 100 mg/Kg) y entrenó en el modelo de CMC con 1 mA de intensidad; (ii) grupo al que se inyectó vehículo y se entrenó en el modelo de CMC con 1 mA de intensidad; así como sus dos respectivos grupos controles; es decir, (iii) un grupo inyectado con metirapona, pero no condicionado; y (iv) un grupo al que se le inyectó vehículo y recibió la misma manipulación experimental que los animales entrenados en el condicionamiento del miedo, pero difiriendo de éstos en el hecho de que no recibió ninguna descarga eléctrica en la caja de Skinner.

Exactamente 12 horas después del condicionamiento, se realizó el test de retención, y se analizó la conducta de inmovilidad de las ratas durante los 8 minutos de duración del test, tras el cual los animales fueron decapitados para proceder a la evaluación de sus niveles plasmáticos de corticosterona y a la expresión de las CAMs en el hipocampo.

#### **4.2.1.1. Efectos conductuales**

La realización de análisis mediante la prueba de t de Student mostró que los animales a los que se inyectó subcutáneamente metirapona (a 100 mg/Kg), y que se entrenaron en el modelo del CMC con una intensidad de 1 mA, desarrollaban niveles de inmovilidad conductual significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) que los del grupo al que se inyectó vehículo y que se entrenó en el modelo de condicionamiento de miedo al contexto (ver gráfica 22).



\*  $p < 0,05$  vs grupo control al que se inyectó vehículo y se entrenó en el CMC a 1 mA.

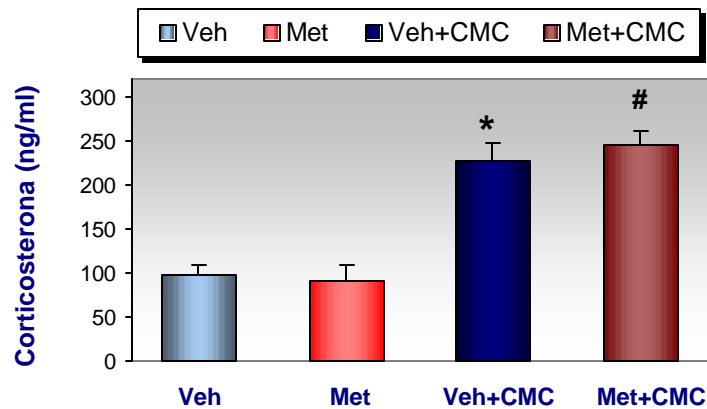
Veh + CMC= Grupo al que se inyectó vehículo y que se entrenó en el CMC a 1 mA.

Met + CMC= Grupo al que se inyectó metirapona y que se entrenó en el CMC a 1 mA.

**Figura 22.** En la gráfica se muestra el porcentaje de inmovilidad conductual correspondiente a la media de 9-10 ratas por grupo más el error estándar de la media, 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el CMC para el grupo al que se inyectó vehículo subcutáneamente, que se entrenó en el CMC y en el grupo al que se inyectó metirapona y se entrenó en el CMC.

#### 4.2.1.2. Niveles plasmáticos de corticosterona

La realización de análisis mediante la prueba de t de Student, mostró que ambos grupos entrenados en el condicionamiento del miedo al contexto (grupo al que se le inyectó s.c. vehículo, y grupo al que se le inyectó s.c con metirapona, antes de ser entrenados en el condicionamiento del miedo al contexto) mostraban niveles de corticosterona plasmática significativamente más elevados en comparación a sus respectivos grupos controles no manipulados ( $p < 0,0001$ , en ambos casos). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de corticosterona, entre el grupo control al que se inyectó s.c. con metirapona y el control al que se inyectó s.c con vehículo ( $p > 0,05$ , n.s, ver gráfica 23).



\*  $p < 0,001$  vs grupo control al que se inyectó vehículo.

#  $p < 0,001$  vs grupo al que se le inyectó metirapona.

Veh= Grupo al que se le inyectó vehículo.

Met= Grupo al que se le inyectó metirapona.

Veh + CMC= Grupo al que se inyectó vehículo y que se entrenó en el CMC a 1 mA de intensidad de descarga eléctrica.

Met + CMC= Grupo al que se inyectó metirapona y que se entrenó en el CMC a 1 mA de intensidad de descarga eléctrica.

**Figura 23.** La gráfica muestra que los grupos condicionados a los que se inyectó salino o metirapona, evidencian niveles de corticosterona plasmática más elevados que sus respectivos grupos control, 12 horas después del entrenamiento de los animales en el CMC a 1 mA de intensidad de descarga eléctrica.

#### 4.2.1.3. Expresión de las distintas CAMs en el hipocampo

A continuación, se muestran los resultados correspondientes a la expresión de moléculas de adhesión celular neural (NCAM, y su forma polisializada), en las diferentes regiones cerebrales

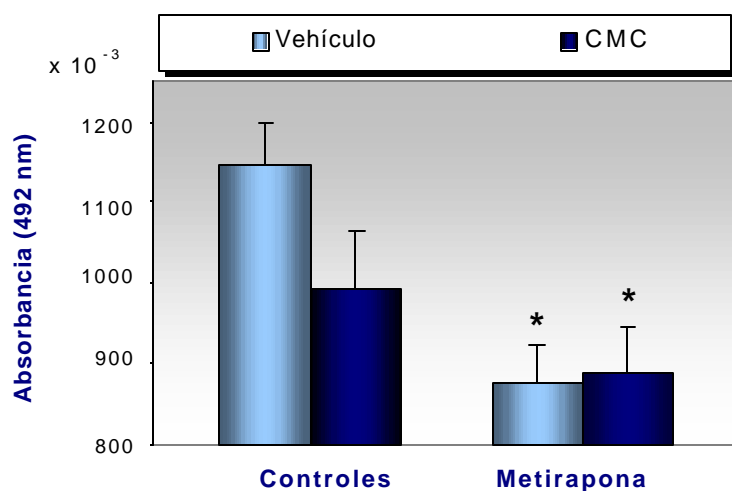
---

estudiadas, 12 horas después del entrenamiento en el modelo de CMC en ratas previamente inyectadas (90 minutos antes del condicionamiento) con vehículo o con el inhibidor de la síntesis de corticosterona, metirapona.

- **Expresión de NCAM**

Los datos correspondientes a la expresión de NCAM se representan en la figura 24. El correspondiente análisis estadístico mediante ANOVAs de dos factores mostró un efecto significativo del factor "metirapona"  $F(1,43)=6,755$ ,  $p<0,0091$ ], que disminuye la expresión de NCAM en el hipocampo. Sin embargo, los análisis estadísticos correspondientes al factor "condicionamiento"  $F(1,43)=2,645$ ,  $p<0,11$ , n.s], así como a la interacción de los dos factores ("metirapona" y "condicionamiento"), sólo mostraron  $F(1,1)=1,390$ ,  $p<0,25$ , n.s], una tendencia hacia la significación estadística, que no llegó a ser significativa.

La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, mostró que el grupo inyectado con metirapona mostró valores de NCAM significativamente más bajos que los del grupo control al que se inyectó vehículo ( $p<0,02$ ). También, se observó una tendencia del grupo al que se inyectó vehículo y se entrenó en el CMC, a mostrar niveles de NCAM significativamente más bajos que su respectivo grupo control, al que, sólo se le inyectó vehículo ( $p<0,12$ , n.s).



\*  $p<0,01$  vs grupo control al que se inyectó vehículo.

---

Veh= Grupo al que se le inyectó vehículo.

Met= Grupo al que se le inyectó metirapona.

Veh + CMC= Grupo al que se inyectó vehículo  
y se entrenó en el CMC a 1 mA de intensidad  
de descarga eléctrica.

Met + CMC= Grupo al que se inyectó metirapona  
y se entrenó en el CMC a 1 mA de intensidad  
de descarga eléctrica.

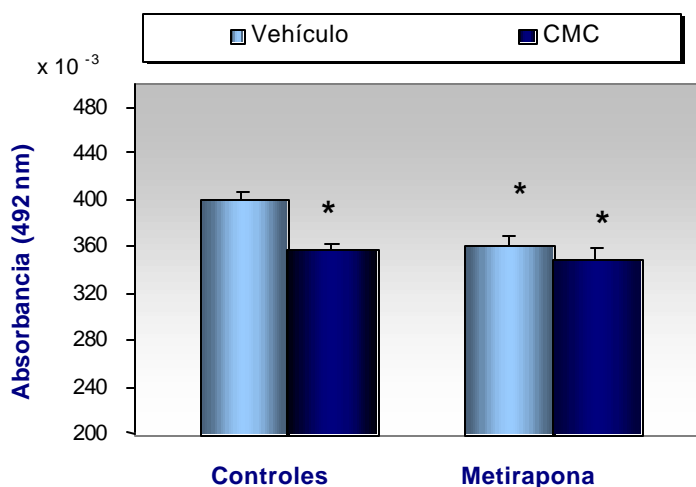
**Figura 26.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión de NCAM en el hipocampo, 12 horas después del entrenamiento en el modelo de CMC. El diseño experimental utilizado incluye 4 grupos de animales, de acuerdo con una estrategia experimental factorial, que incluye la inyección bien de vehículo o bien de metirapona (s.c., 100 mg/kg) 90 min antes del entrenamiento y, dentro de cada condición de inyección, dos grupos de animales, uno de los cuales fue entrenado en el CMC con choque eléctrico de 1 mA de intensidad y otro grupo que sólo recibió manipulación, pero no fue condicionado al miedo.

- **Expresión de PSA-NCAM**

La expresión de PSA-NCAM se indica en la gráfica 27, donde el ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo para el factor "condicionamiento",  $F[(1,43)=20,8, p=0,0001]$ , lo que indica que como consecuencia del entrenamiento en el CMC se redujo significativamente la expresión de PSA-NCAM para dicho factor; mientras que se observó una leve tendencia del factor "metirapona" hacia la significación estadística  $F[(1,36)=1,965, p<0,16, n.s.]$ , que tiende a mostrar niveles de PSA-NCAM disminuidos en el hipocampo para el "factor metirapona". Sin embargo, no se observó un efecto de la interacción conjunta de ambos factores,  $F[(1,1)=0,08, n.s.]$ .

La realización de análisis *a posteriori* mediante la prueba de t de Student, indicó un descenso significativo en la polisialización de NCAM en el grupo control al que se inyectó metirapona ( $p<0,05$ ), cuando se compara con el grupo control al que se inyectó vehículo. Por otro lado, el grupo control al que se inyectó vehículo mostró valores de PSA-NCAM, significativamente más elevados vs ambos grupos condicionados, es decir, tanto en comparación al grupo al que se inyectó vehículo y que se

entrenó en el CMC ( $p < 0,001$ ), como vs grupo al que se inyectó metirapona y se entrenó en el CMC ( $p < 0,001$ ), respectivamente.



\*  $p < 0,01$  vs grupo control al que se le inyectó vehículo.

Veh= Grupo al que se le inyectó vehículo.

Met= Grupo al que se le inyectó metirapona.

Veh + CMC= Grupo al que se inyectó vehículo y que se entrenó en el modelo de CMC a 1 mA de intensidad de descarga eléctrica.

Met + CMC= Grupo al que se inyectó metirapona y que se entrenó en el CMC a 1 mA de intensidad de descarga eléctrica.

**Figura 27.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en el hipocampo, 12 horas después del entrenamiento en el modelo de CMC. El diseño experimental utilizado incluye 4 grupos de animales, de acuerdo con una estrategia experimental factorial, que incluye la inyección bien de vehículo o bien de metirapona (s.c., 100 mg/kg) 90 min antes del entrenamiento y, dentro de cada condición de inyección, dos grupos de animales, uno de los cuales fue entrenado en el CMC con choque eléctrico de 1 mA de intensidad y otro grupo que sólo recibió manipulación, pero no fue condicionado al miedo.



---

### **4.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA PROFUNDIZAR EN LOS EFECTOS DEL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL CONTEXTO EN LA POLISIALIZACIÓN DE NCAM EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO**

Este experimento se diseñó con objeto de profundizar en los resultados obtenidos en los experimentos bioquímicos con respecto a la polisialización de NCAM en el giro dentado 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el modelo de condicionamiento del miedo al contexto. En ellos, mediante la técnica de ELISA, encontramos una reducción en la polisialización de NCAM en sinaptosomas de hipocampo en ratas entrenadas en dicho aprendizaje bajo un choque eléctrico de 1 mA, un resultado que contrasta con toda una serie de hallazgos del grupo del Prof. C. Regan (Murphy y cols, 1996; Murphy y Regan, 1998, 1999) en los que se ha mostrado un incremento en dicha modificación post-traducciona de NCAM (12 horas después del entrenamiento en distintas tareas de aprendizaje, tal como se comentó en la Introducción de la Tesis). Dado que sus estudios se centraron en la frecuencia de células polisializadas presentes en la subcapa granular del giro dentado que colinda con el hilus, planteamos el presente estudio para evaluar cuál podría ser la modulación de las mismas en animales entrenados bajo distintas condiciones de intensidad de choque eléctrico en el modelo del condicionamiento del miedo al contexto.

#### **4.3.1 Efectos del condicionamiento del miedo al contexto evaluados 12 horas después del entrenamiento**

Ratas macho, p80, de la cepa Wistar se entrenaron en el modelo de condicionamiento de miedo al contexto, a 0,2 mA, 0,4 mA y 1 mA de intensidad de choque eléctrico; condiciones que conducen a diferentes niveles de condicionamiento del miedo.

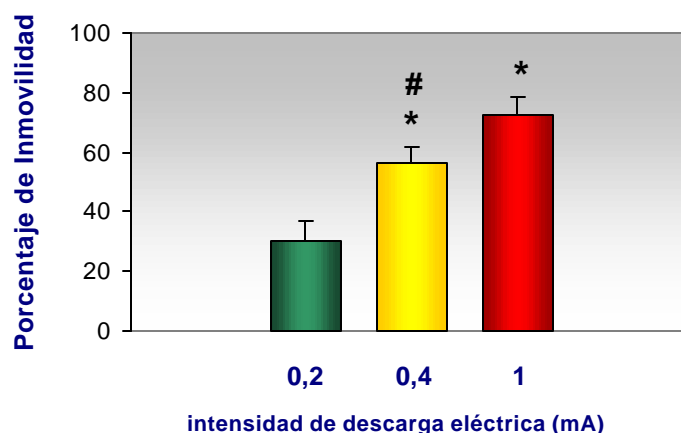
Por tanto, el experimento incluyó los siguientes grupos condicionados, que se entrenaron a 0,2 mA (n=10), 0,4 mA (n=10) y 1 mA, (n=10) respectivamente, y un grupo control manipulado, que no recibió descarga eléctrica alguna (n=10). Además, un quinto grupo (n=12) se entrenó en el modelo del laberinto acuático de Morris, como control positivo en el estudio de la polisialización de NCAM, con objeto de verificar si, bajo nuestras condiciones experimentales, 12 horas después del entrenamiento en el modelo del condicionamiento del miedo al contexto se observaba un aumento en la polisialización de NCAM en el giro dentado tal como se ha relatado en otros paradigmas de aprendizaje y memoria, incluido el laberinto acuático (Murphy y cols, 1996; Murphy y Regan, 1998). Así pues, 12 horas

---

después del entrenamiento, los animales fueron sometidos a un test de retención (en la caja de condicionamiento o en el laberinto acuático, dependiendo del grupo experimental al que se les adscribió en la fase de entrenamiento), e inmediatamente sacrificados para proceder posteriormente al estudio de la polisialización en el giro dentado.

#### 4.3.1.1 Efectos conductuales

El análisis de los datos correspondientes a la variable de inmovilidad conductual desarrollada por las ratas, replicó resultados previos obtenidos en otros experimentos conductuales, realizados 12 horas postentrenamiento, donde se observó que las ratas desarrollaban el mismo patrón de inmovilidad conductual que en este experimento (ver figura 28). El ANOVA de los datos correspondientes a la inmovilidad conductual 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el CMC, mostró un efecto significativo del factor grupo  $F(2,26)=34,25$ ,  $p<0,0001$ ]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, indicó que todos los grupos condicionados mostraron valores de inmovilidad conductual significativamente más elevados ( $p<0,05$  en todos los grupos analizados) que el grupo entrenado a 0,2 mA. Como en experimentos anteriores, el grupo que se entrenó en el modelo de CMC con la más alta intensidad de choque eléctrico (1 mA) mostró valores de inmovilidad conductual significativamente más elevados que los grupos entrenados a 0,2 mA ( $p<0,05$ ) y a 0,4 mA ( $p<0,01$ ). A su vez, el grupo entrenado a 0,4 mA mostró niveles de inmovilidad conductual significativamente más elevados ( $p<0,01$ ) que los del grupo entrenado con la intensidad más baja (0,2 mA).



---

\*  $p < 0,01$  vs grupo control que se entrenó a 0,2 mA en el CMC.

#  $p < 0,05$  vs grupo control que se entrenó a 1 mA en el CMC

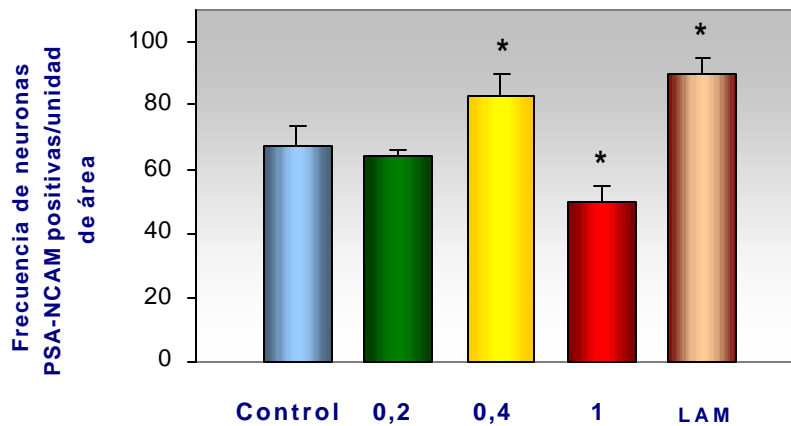
0,2, 0,4 y 1 mA= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4  
y 1 mA respectivamente en el CMC.

**Figura 28.** En la gráfica se muestra el porcentaje de inmovilidad conductual correspondiente a la media de 10-12 ratas por grupo,  $\pm$  el error estándar de media, 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el condicionamiento del miedo al contexto.

#### **4.3.1.2. Efectos en la polisialización de NCAM en el giro dentado**

El ANOVA de los datos correspondientes a la expresión de la forma polisializada de NCAM en el borde de la capa polimórfica granular/hilus del giro dentado, mostró un efecto significativo del factor grupo,  $F[(3,35)=6,81, p < 0,001$ , ver figura 29]. La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student mostró que los niveles de PSA-NCAM fueron significativamente más elevados en el grupo que se entrenó a 0,4 mA, en comparación con el resto de grupos ( $p < 0,05$  en todos los casos analizados). Por el contrario, en el grupo de 1 mA se observó una reducción en la frecuencia de neuronas polisializadas en comparación con el resto de grupos ( $p < 0,05$  en todos los casos analizados). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de polisialización entre el grupo entrenado a 0,2 mA y el grupo control ( $p > 0,05$ , n.s).

Por otra parte, el estudio mostró que el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris indujo, como habían mostrado trabajos anteriores (Murphy y cols, 1996; Murphy y Regan, 1998), indujo un incremento en el estado de polisialización de NCAM en el giro dentado. En efecto, ya que el pertinente análisis mediante la prueba de t de Student, mostró que 12 horas después del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, se observó un aumento significativo de la frecuencia de polisialización en la capa polimórfica granular del giro dentado en el grupo entrenado en el laberinto acuático de Morris en comparación al grupo control ( $p < 0,0025$ ).



\*  $p < 0,05$  vs grupo control manipulado.

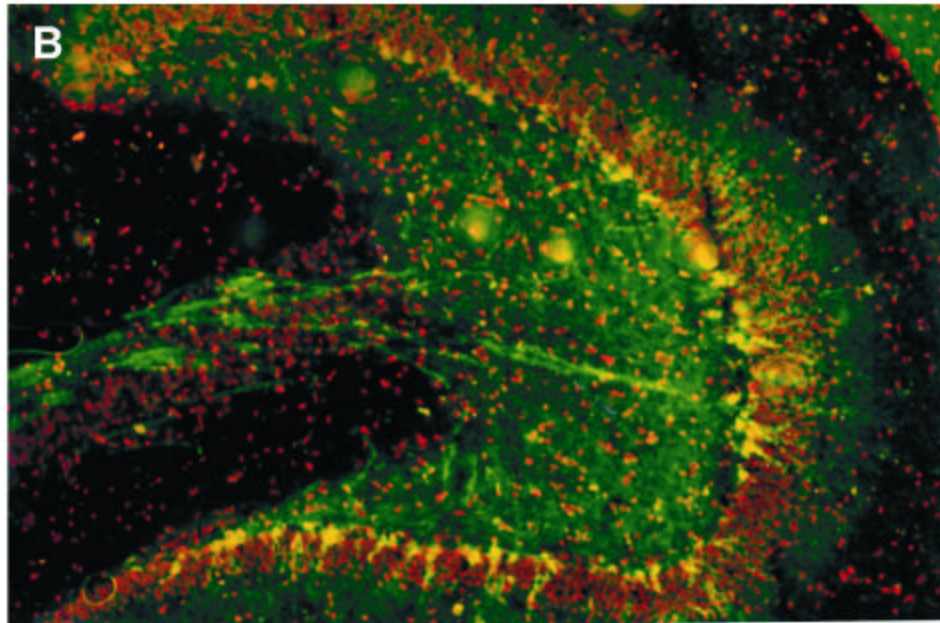
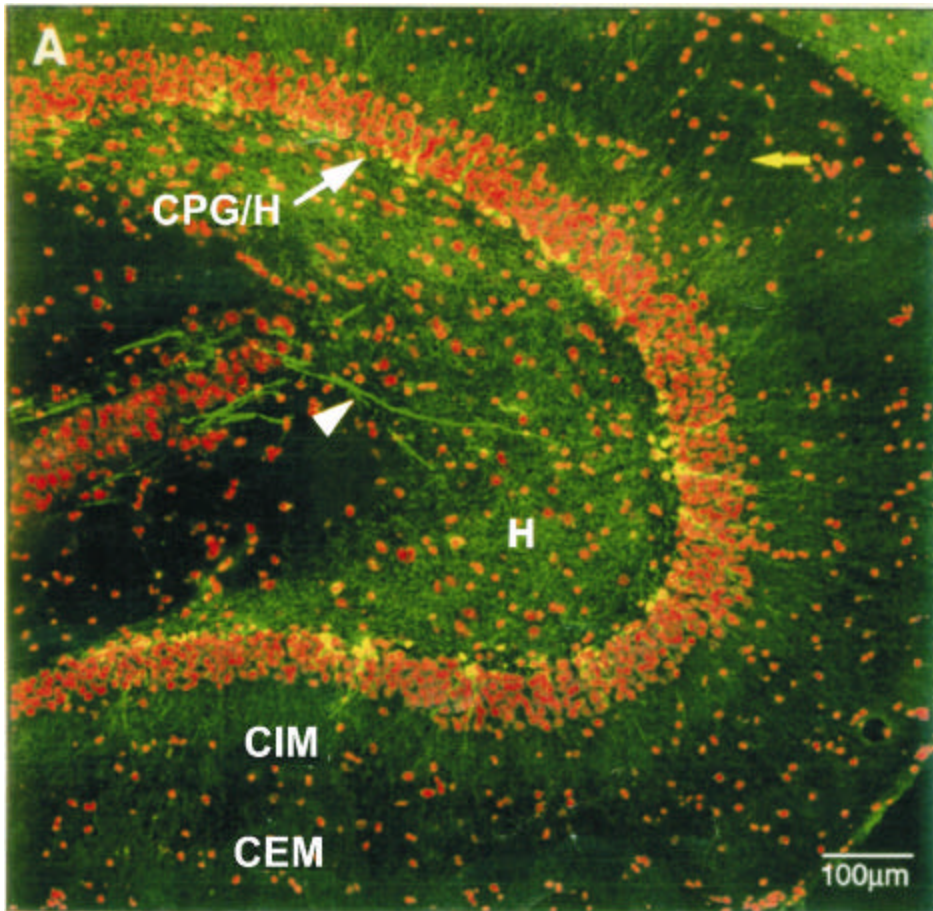
Control= Grupo control manipulado.

0,2, 0,4 y 1 mA= Grupos que se entrenaron a 0,2, 0,4 y 1 mA respectivamente en el CMC.

LAM= Grupo que se entrenó en el laberinto acuático de Morris.

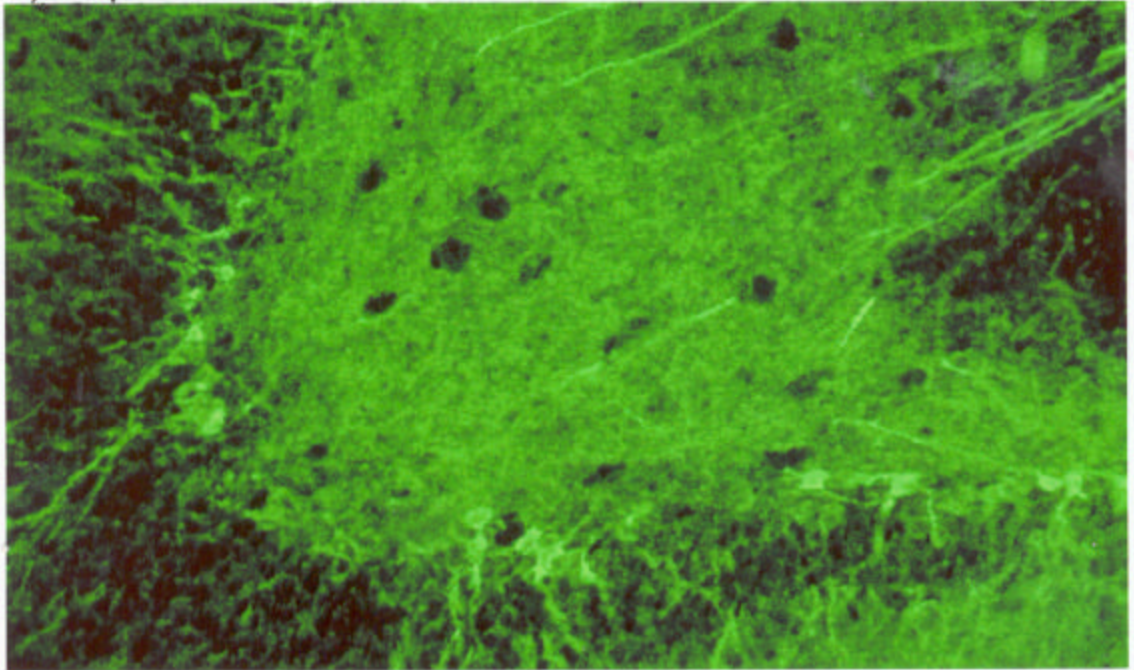
**Figura 29.** En la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la frecuencia de polisialización de NCAM, de 10-12 ratas por grupo más el error estándar de la media, en el borde de la capa polimórfica granular del giro dentado,. También se muestra la frecuencia de polisialización del grupo que se entrenó en el laberinto acuático de Morris (LAM), 12 horas post-entrenamiento.

A continuación, se muestra en los fotorregistros de las figuras 30 y 31 la inmunoreactividad del anticuerpo monoclonal para PSA-NCAM en el borde de la capa polimórfica granular/hilus del giro dentado, entre el grupo control y el grupo entrenado a 0,4 mA en el CMC (Ver gráfica 30 a 400  $\mu\text{m}$ ), y entre los grupos entrenados a 0,4 y 1 mA, respectivamente (ver figura 31 a 100  $\mu\text{m}$  , donde las células PSA-NCAM positivas se marcan con yoduro de propidio). En dichas figuras, se aprecia el aumento del número de neuronas PSA-NCAM positivas en el grupo entrenado a 0,4 mA en el CMC y la frecuencia de polisialización disminuida observada en el grupo que se entrenó a 1 mA (ver figuras).

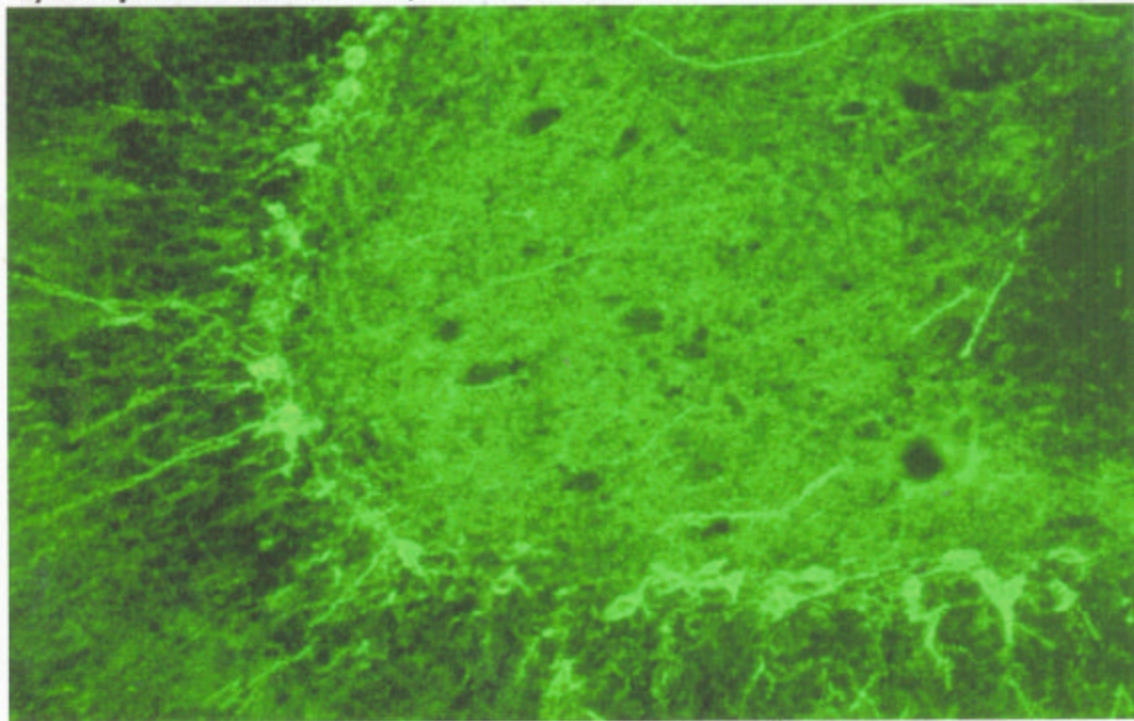


**Figura 29. A)** Grupo entrenado en el CMC a 1 mA **B)** Grupo que se entrenó a 0,4 mA en el CMC  
 Obsérvese la fecha que indica la inmunoreactividad para PSA-NCAM en las fibras de Mossy.

A) Grupo Control



B) Grupo entrenado a 0,4 mA en el CMC



**Figura 30.** Obsérvese la mayor frecuencia de neuronas polisializadas en el borde de la capa polimórfica granular del giro dentado en el grupo de 0,4 mA vs grupo control.

---

#### **4.4. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO EN EL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL CONTEXTO EN LA MEMORIA PARA OTRO TIPO DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN EN RATAS ENTRENADAS EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS**

Tal como se reseñó en los objetivos, mediante este experimento se pretendió estudiar las posibles implicaciones de los resultados relativos en el apartado 4.3, que mostraban una polisialización diferencial en los grupos condicionados de 0,4 y 1 mA. Para ello, se diseñó un experimento, cuyo protocolo se describe a continuación, en el que las ratas se entrenaron en dos paradigmas diferentes: CMC y laberinto acuático de Morris, con objeto de determinar la posibilidad de que el entrenamiento en el condicionamiento del miedo al contexto a las intensidades de 0,4 y de 1 mA, pudiera afectar diferencialmente la memoria para otro tipo de procesamiento de la información en ratas entrenadas en el laberinto acuático de Morris.

- **Protocolo experimental**

El protocolo seguido se dividió en varias fases experimentales, y se desarrolló en 4 días consecutivos. Así, en el primer día de experimento, los animales se sometieron a 4 ensayos de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, durante los cuales se midió la latencia o tiempo que tardaban las ratas en encontrar la plataforma parcialmente sumergida. Inmediatamente, después del último ensayo, se las secó con una toalla durante un periodo total de 8 minutos, y acto seguido, se entrenaron en el modelo de condicionamiento del miedo al contexto según el protocolo habitual descrito en materiales y métodos, balanceándose el número de animales en cada grupo. Por tanto, las ratas que se entrenaron en el modelo de condicionamiento del miedo al contexto, recibieron intensidades de 0,4 mA (n=13), o 1 mA (n=20), en función del grupo experimental al que se adscribieron, incluyéndose un grupo control no manipulado (n=15), y otro grupo control manipulado: que sólo se expuso a la cámara de condicionamiento, pero sin recibir descarga eléctrica alguna (n=12).

Después de un día de reposo se las sometió a un test de transferencia (test de natación libre, en el que se retiró la plataforma sumergida) durante 60 segundos. Acto seguido, después del test de transferencia, las ratas se reentrenaron (durante 4 sesiones de reaprendizaje) en el laberinto acuático de Morris con la plataforma sumergida en la misma localización donde se había ubicado en la fase de

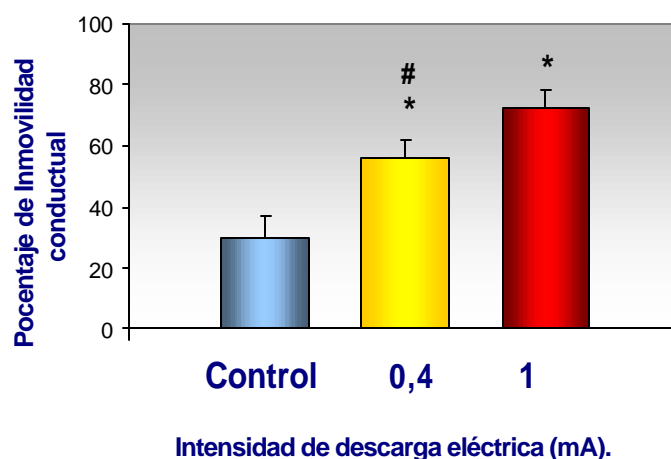
---

entrenamiento. Al día siguiente, se evaluó la retención de la memoria por reexposición de las ratas al test de condicionamiento de miedo al contexto, reexponiéndolas durante 8 minutos en la cámara de condicionamiento (según el protocolo habitual descrito en materiales y métodos).

#### 4.4.1. Efectos conductuales

##### 4.4.1.1. Efectos conductuales en la fase de retención del condicionamiento del miedo al contexto

El análisis de la variable de inmovilidad conductual desarrollada por las ratas entrenadas en el CMC replicó datos de experimentos anteriores, donde la conducta de inmovilidad conductual se analizó en la fase de retención, de forma que el ANOVA de los datos mostró un efecto significativo de grupo  $F[(2,26)=34,25, p<0,0001]$ . La realización de análisis *a posteriori*, mediante la prueba de t de Student, indicó que todos los grupos condicionados mostraron valores de inmovilidad conductual significativamente más elevados ( $p<0,05$  en todos los grupos analizados) vs grupo control manipulado (ver figura 32). Como en experimentos anteriores, el grupo que se entrenó en el modelo de CMC con la más alta intensidad de choque eléctrico (1 mA) mostró valores de inmovilidad conductual significativamente más elevados vs grupo control manipulado ( $p<0,05$ ) y vs grupo de 0,4 mA ( $p<0,01$ ), respectivamente. A su vez, el grupo entrenado a 0,4 mA mostró niveles de inmovilidad conductual significativamente más elevados ( $p<0,01$ ) que los del grupo control manipulado.



\*  $p < 0,05$  vs grupo control manipulado.

#  $P < 0,05$  vs grupo que se entrenó a 1 mA en el CMC.



---

Control= Grupo control manipulado: sólo expuesto a la cámara de condicionamiento.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

0,4, 1= Grupos que se entrenaron a 0,4 y 1 mA, respectivamente en el CMC.

**Figura 32.** En la gráfica se muestra el porcentaje de inmovilidad conductual de desarrollada por las ratas hipocampo  $\pm$  el error estándar de la media, de 8-10 ratas por grupo en la fase de retención del modelo del condicionamiento del miedo al contexto.

#### **4.4.1.2 Efectos conductuales en el test del laberinto acuático de Morris**

##### **▪ 4.4.1.2.1. Test de transferencia**

A continuación, se indica el análisis conductual de los datos correspondientes al test de transferencia del laberinto acuático de Morris (sin plataforma alguna), donde se evaluó el tiempo de permanencia de los diferentes grupos, y para cada uno de los cuatro cuadrantes imaginarios, a lo largo del tiempo total que duró dicho test (1 minuto), así como también desglosado durante los 30 primeros y los últimos 30 segundos del test (ver figuras 33 a 35).

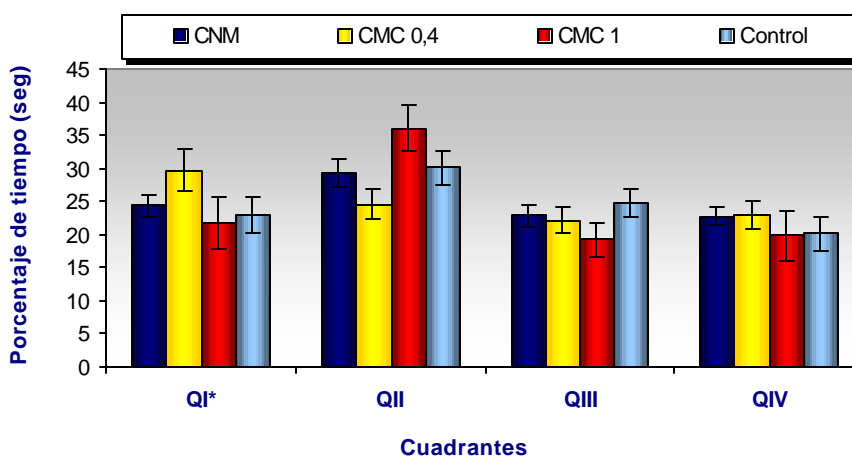
La realización de una prueba de t de Student indicó que durante los 30 primeros segundos del test de transferencia, las ratas que se entrenaron a 0,4 mA en el CMC tenían una tendencia a mostrar un porcentaje de permanencia mayor que las ratas del grupo de 1 mA ( $p < 0,12$ , n.s) cuando nadaban en el cuadrante I (cuadrante en el que se había ubicado la plataforma cuando las ratas fueron entrenadas en el laberinto acuático de Morris); lo que indica que el condicionamiento de miedo a 0,4 mA facilitaba la retención de la memoria –para otro tipo de procesamiento de información- en el grupo que fue condicionado a 0,4 mA vs grupo de 1 mA (ver gráfica 34)-. Es decir, que el condicionamiento de miedo para el grupo entrenado a 0,4 mA en el CMC, facilitaba el recuerdo de donde se ubicó la plataforma cuando las ratas fueron entrenaron en el laberinto acuático de Morris; Sin embargo, el grupo de 1 mA mostró un recuerdo similar al de los controles, en el test de transferencia (sin plataforma), cuando se evaluó el recuerdo –1 día después del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris-. Además, lógicamente, durante los 30 primeros segundos de dicho test de transferencia, el grupo de 1 mA mostró un porcentaje de permanencia mayor en el cuadrante II (por donde se introdujeron las ratas en la piscina) vs grupo de 0,4 mA ( $p < 0,007$ ), no observándose diferencias significativas dignas de

---

mención para el resto de grupos analizados y en los diferentes cuadrantes considerados ( $p > 0,05$ , n.s en todos los casos).

A continuación, se indican los resultados correspondientes al porcentaje de tiempo total (1 minuto) del test de transferencia (ver gráfica 33).

**Figura 33**



QI\* = Cuadrante I (Cuadrante en el que se había ubicado la plataforma durante el entrenamiento de las ratas en el laberinto acuático de Morris).

QII= Cuadrante por el que se introdujeron los animales en la piscina.

QI, QII, QIII= Segundo, tercer y cuarto cuadrante imaginario en los que se dividió la piscina.

LAM= Laberinto acuático de Morris.

CNM= Control no manipulado.

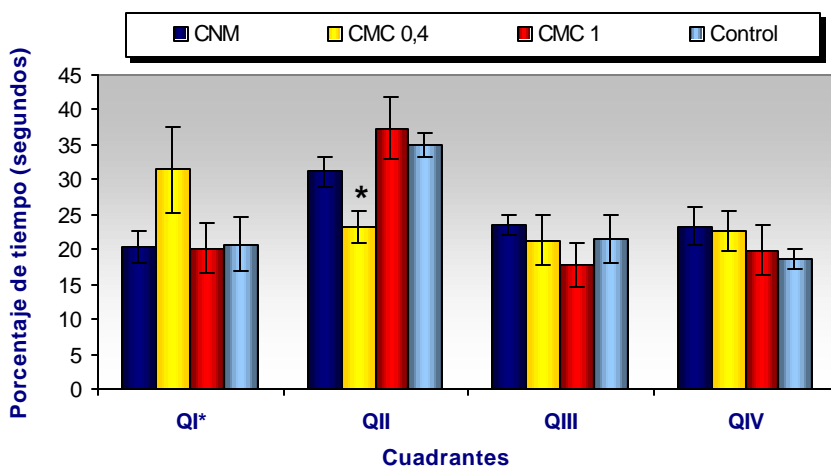
Control= Control manipulado: sólo se expuso a la caja de Skinner.

0,2, 0,4 y 1 mA= Grupos entrenados en el modelo de condicionamiento de miedo al contexto a 0,4, y 1 mA de intensidad de descarga eléctrica, respectivamente.

**Figura 33.** En la figura se indican los resultados correspondientes al porcentaje de permanencia de 8 ratas por grupo,  $\pm$  el error estándar de la media en el test de transferencia, para cada uno de los cuadrantes analizados a lo largo del tiempo total del test (1 minuto).

También se muestra el porcentaje de tiempo durante los 30 primeros segundos del test de transferencia (ver gráfica 34), así como también durante los últimos 30 segundos de dicho test (ver gráfica 35).

**Figura 34**



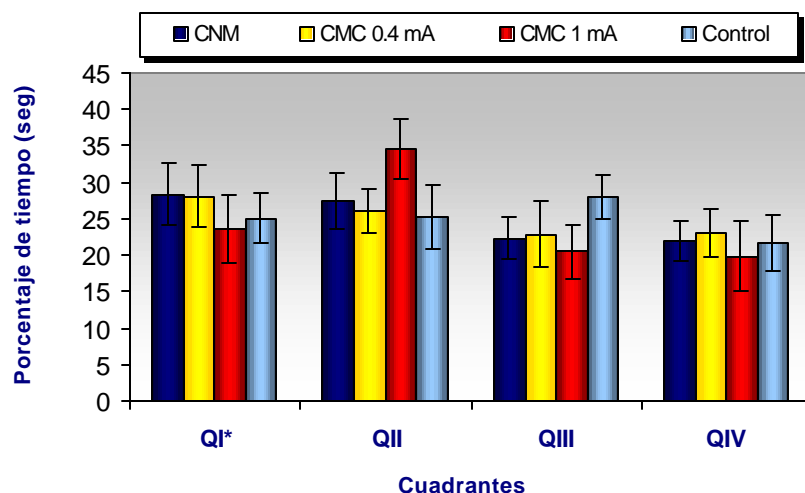
\*  $p < 0,05$  con respecto al grupo de 1 mA.

**Figura 34.** En las figura se indican los resultados correspondientes al porcentaje de permanencia en el test de transferencia de 8 ratas por grupo,  $\pm$  el error estándar de la media, en cada uno de los cuadrantes analizados, durante los primeros 30 segundos del test de transferencia.

---

En la figura 35 también se muestran los resultados correspondientes al test de transferencia considerando sólo los últimos 30 segundos del test.

**Figura 35**

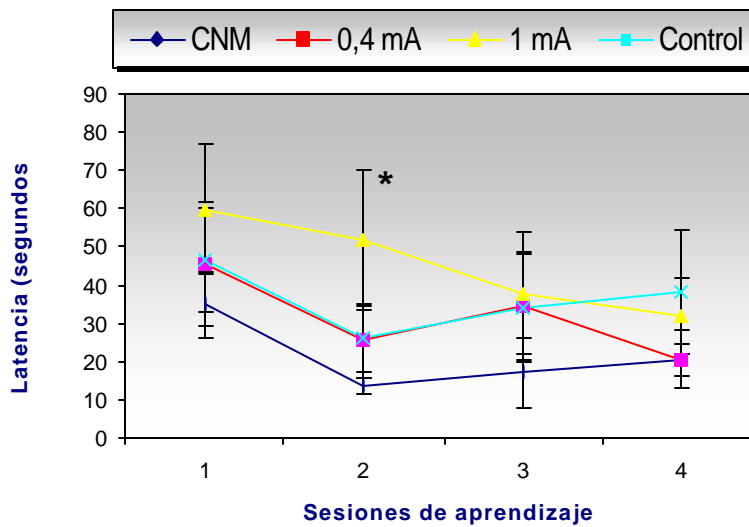


**Figura 35.** En las figura se indican los resultados correspondientes al porcentaje de permanencia en el test de transferencia de 8 ratas por grupo,  $\pm$  el error estándar de la media, en cada uno de los cuadrantes analizados, durante los últimos 30 segundos de duración del test.

#### **4.4.1.2.2. Curva de reaprendizaje de las ratas entrenadas en el laberinto acuático de Morris**

La curva de aprendizaje de las ratas que se entrenaron en el laberinto acuático de Morris se muestran en la figura 36, donde se indican las latencias medias a lo largo de los diferentes ensayos.

La realización de un ANOVA de dos vías, para el factor "ensayo" y para el factor "grupo", así como para la interacción conjunta de ambos factores en los ensayos de reaprendizaje, no mostró diferencias significativas dignas de mención en los grupos analizados, excepto en el grupo de 1 mA vs grupo control no manipulado (CNM), que se indican a continuación.



\*  $p < 0,05$  vs grupo control no manipulado (CNM).

CNM= Control no manipulado (CNM).

Control= Grupo control manipulado: sólo expuesto a la caja de Skinner.

CMC 0,2 mA, CMC 0,4 mA y CMC 1mA= Grupos que se entrenaron el modelo de condicionamiento de miedo al contexto a 0,4, y 1 mA de intensidad de descarga eléctrica, respectivamente.

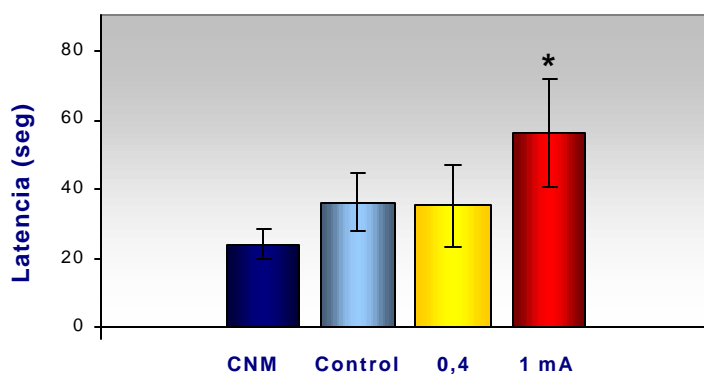
**Figura 36.** Curva de reaprendizaje de las ratas a lo largo de las 4 ensayos de aprendizaje, que muestra la latencia media  $\pm$  el error estándar de la media, de 8-10 ratas por grupo en las cuatro sesiones del test, donde se indican las diferencias significativas entre el grupo de 1 mA y el grupo control no manipulado (CNM) en el segundo ensayo de reaprendizaje.

A continuación, se muestran los ANOVAs de dos factores, correspondientes a la latencia media para el factor "grupo", y para el factor "ensayo", así como de la interacción conjunta de ambos factores en los ensayos de aprendizaje del laberinto acuático de Morris. Así, dado que el ANOVAs de dos factores para la latencia media de reaprendizaje correspondiente a los cuatro ensayos de reaprendizaje, indicó que el grupo de 1 mA mostró una alta tendencia hacia la significación estadística para el "factor grupo",  $F [(3,15)=3,614, p < 0,0781, n.s]$ ; (indicativo de que en los ensayos de reaprendizaje se observó una tendencia en el grupo de 1 mA a mostrar una latencia a encontrar la plataforma significativamente más elevada vs grupo control no manipulado), se analizó la posibilidad

---

de que pudieran existir diferencias significativas si consideramos las latencias medias correspondientes a las dos primeras sesiones de reaprendizaje. Así, la realización de un ANOVA de dos vías para la latencia media de las dos primeras sesiones de reaprendizaje, indicó un efecto significativo de grupo  $F[(1,14)=4,346, p<0,05]$ , indicativo de que el grupo condicionado a 1 mA mostraba una latencia de reaprendizaje significativamente más elevada que la del grupo CNM. En definitiva, las ratas expuestas a 1 mA en el CMC, mostraban una retención peor en la fase de reaprendizaje del laberinto acuático de Morris de la localización de la plataforma durante el entrenamiento en comparación al grupo CNM; mientras que el grupo de 0,4 mA, no mostró diferencias significativas en las latencias de reaprendizaje en comparación al grupo CNM (ver gráfica 37). Tampoco se evidenciaron diferencias significativas dignas de mención para las latencias medias de reaprendizaje en el resto de grupos analizados (datos no mostrados).

Además, el ANOVA de dos factores correspondiente a la latencia media de reaprendizaje en las dos primeros ensayos no indicó un efecto significativo del factor "ensayo"  $F[(1,14)= 2,815, p<0,1156, n.s]$ , así como tampoco de la interacción conjunta de ambos factores ("grupo" y "ensayo"  $F[(1,14)=0,57, p<0,46, n.s]$ , cuando se consideran conjuntamente sólo las dos primeras sesiones de reaprendizaje de las ratas entrenadas en el laberinto acuático de Morris, para las latencias de reaprendizaje del grupo de 1 mA y del grupo CNM.



\*  $p<0,05$  vs grupo control no manipulado.

Control= Grupo control manipulado: sólo expuesto a la caja de Skinner.

CNM= Grupo control no manipulado.

0,4 y 1mA= Grupos que se entrenaron en el CMC a 0,4,

---

y 1 mA de intensidad, respectivamente.

**Figura 37.** Curva de reaprendizaje en el paradigma del laberinto acuático de Morris, que muestra la media de la latencia  $\pm$  el error estándar en las dos primeras sesiones de reaprendizaje, entre el grupo el grupo de 1 mA que se entrenó en el modelo del laberinto acuático de Morris y el grupo CNM.

---

## **4.5. EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO EN EL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO AL CONTEXTO Y EN LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL**

Dadas las ya relatadas alteraciones que produce el estrés crónico en el cerebro, especialmente en la formación hipocampal (ver Introducción), planteamos un estudio cuyo objetivo prioritario fue estudiar la posible modulación del estrés crónico y/o del condicionamiento de miedo al contexto sobre la expresión de moléculas de adhesión celular en el hipocampo y otras regiones cerebrales. Así pues, simultáneamente, también se estudió si el estrés crónico podría afectar la conducta en el CMC, así como su posible efecto sobre los niveles plasmáticos de corticosterona. Además, se evaluó el efecto que el estrés crónico produce en el peso corporal, así como en el peso relativo del timo.

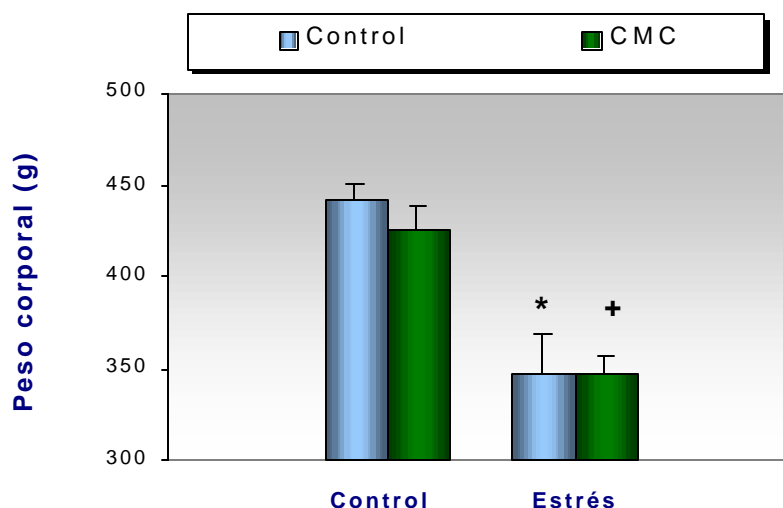
Para ello, 20 ratas macho Wistar se sometieron diariamente a estrés crónico durante 21 días, con una duración de la exposición al estrés de 6 horas diarias (entre las 8:00 y las 14:30 horas) mediante inmovilización, por restricción de sus movimientos. Durante este periodo, los animales controles (n=22) permanecieron sin manipular en sus respectivas jaulas en el estabulario. Un día después de la terminación del procedimiento inductor de estrés crónico (día 23), dos subgrupos de ratas procedentes uno de ellos de la condición de "estrés" (n=10), y otro del grupo control (n=12), se sometieron a un entrenamiento en el modelo del condicionamiento del miedo al contexto, con la intensidad de descarga eléctrica de 1 mA. Por tanto, el experimento incluyó, los siguientes grupos: grupo control no manipulado (n=10), grupo que se sometió a estrés crónico mediante inmovilización (n=8), grupo que se entrenó en el modelo del condicionamiento al contexto (n=12), y grupo que se sometió a estrés crónico y que se entrenó en el modelo del condicionamiento del miedo al contexto (n=10).

### **4.5.1. Efectos del estrés crónico sobre las variables de peso corporal y peso del timo por peso de rata**

En primer lugar, se estudió el efecto que produjo el estrés crónico y/o el condicionamiento del miedo al contexto sobre las variables del peso corporal y sobre el peso relativo del timo (mg de timo por 100 g de peso corporal). Tal como se muestra en la figura 38, las ratas sometidas a estrés crónico mostraban una reducción significativa del peso en la fase final del procedimiento inductor de estrés crónico, si se compara con los animales controles. Así, el ANOVA de dos vías, mostró un efecto



altamente significativo del factor estrés sobre el peso corporal  $F[(1,38)=78,01, p<0,0001]$ , mostrando una reducción del mismo. Tal como se esperaba, el condicionamiento del miedo al contexto no influyó sobre el peso corporal  $F[(1,38)=0,945, n.s.]$ , ni tampoco se observó un efecto significativo de la interacción conjunta de ambos factores ("estrés" y "condicionamiento de miedo") sobre el peso corporal  $[F(1,1)=0,66, n.s.]$ .



Control= Grupo control.

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

\*  $p < 0,001$  vs grupo control.

+  $p < 0,001$  vs grupo 'no estresado'

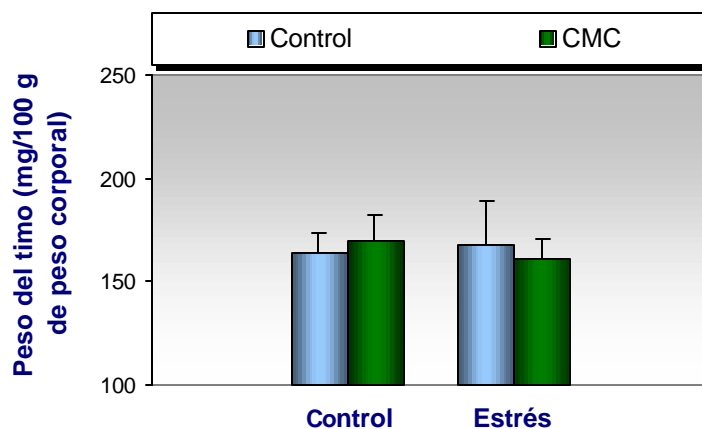
y que se entrenó en el CMC a 1 mA.

**Figura 38.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes al peso corporal  $\pm$  el error estándar de la media de 10-12 ratas por grupo, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

Por otra parte, los datos correspondientes al ANOVA de dos vías para el peso relativo del timo (mg de timo/100 gramos de peso corporal), indicaron una ausencia de efecto del factor "estrés"

---

F[(1,38)=0,01, n.s], así como una ausencia de efecto, tanto del factor "condicionamiento" F[(1,38)=1,04, n.s], como de la interacción conjunta del factor "estrés" y del factor "condicionamiento" F[(1,38)=0,04, n.s, Ver figura 39].



Control= Grupo control

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

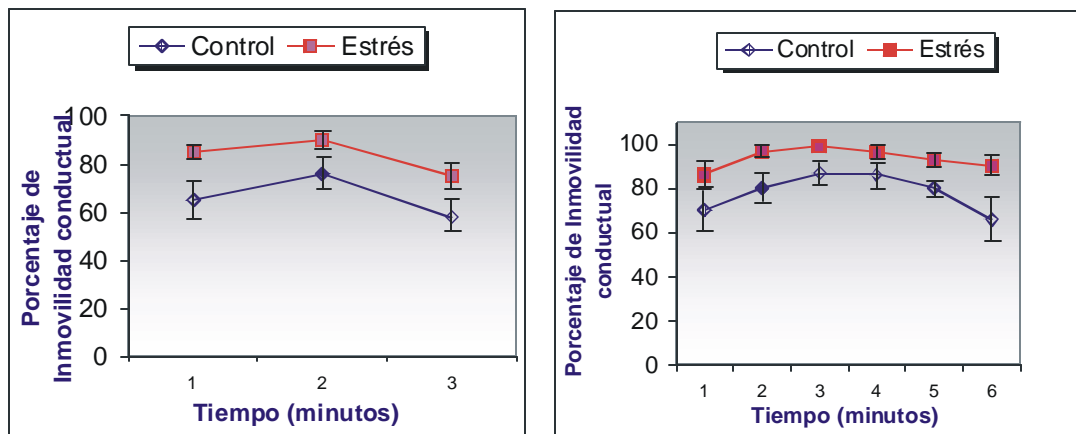
CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

**Figura 39.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes al peso relativo del timo de 10-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar, en ratas sometidas a estrés crónico y/o condicionamiento del miedo al contexto.

#### **4.5.2. Efectos del estrés crónico sobre el condicionamiento del miedo al contexto**

Tal como se muestra en la figura 40, el ANOVA de los datos correspondientes al condicionamiento del miedo, mostró un aumento significativo de los niveles de inmovilidad conductual en las ratas estresadas crónicamente, tanto durante el periodo post-descarga de la fase de entrenamiento en el CMC [F (1,21)=5,42,  $p<0,03$ ], como en la fase de retención –realizada 24 horas post-entrenamiento- [F (1,21)=4,3,  $p<0,05$ ].

Es importante destacar que tanto los controles, como las ratas sometidas a estrés crónico no mostraban la conducta de inmovilidad durante el periodo previo a la primera descarga (o predescarga) durante la fase de entrenamiento del modelo del condicionamiento de miedo al contexto (0% de inmovilidad conductual: 0% de las ratas estresadas, n.s.).

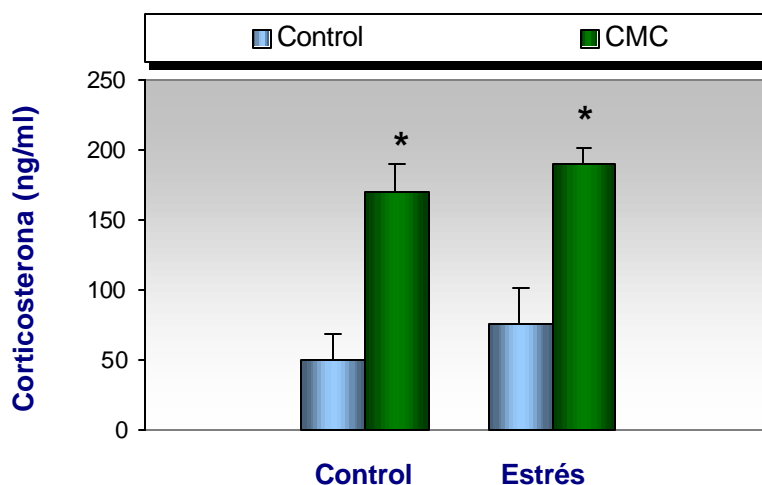


**Figura 40.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la media del porcentaje de inmovilidad conductual de 10-12 animales por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y condicionamiento del miedo al contexto. Se indica la inmovilidad conductual tanto en el entrenamiento (ver gráfica de la izquierda), como en la retención del test, 24 horas después del entrenamiento de los animales en dicho paradigma conductual (ver gráfica de la derecha)

#### 4.5.3. Efectos del estrés crónico y del condicionamiento del miedo al contexto sobre los niveles plasmáticos de corticosterona

Se procedió a la evaluación de los niveles plasmáticos de corticosterona en todos los grupos experimentales, realizando dicha medida 24 horas post-entrenamiento, inmediatamente después de someter a las ratas entrenadas al test de retención. El análisis de los datos correspondientes a los niveles hormonales, mediante ANOVA de 2 vías, indicó una ausencia del efecto del factor "estrés" [ $F(1,38)=1,9$ ,  $p<0,17$ , n.s], si bien cabe señalar una leve tendencia en los animales estresados a mostrar

sus valores hormonales incrementados. Sin embargo, como cabía esperar, dicho análisis mostró un efecto altamente significativo para el factor condicionamiento en la fase de retención [ $F(1,38)=62,61$ ,  $p<0,0001$ ], de forma que aumentaban significativamente los niveles plasmáticos de corticosterona, en los animales sometidos al test de retención en el modelo de CMC. Por otra parte, dicho análisis indicó una ausencia de interacción de ambos factores,  $F(1,1)=0,01$ , n.s, ver gráfica 41].



\*  $p<0,001$  vs respectivos grupos controles (sin CMC).

Control= Grupo control.

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

**Figura 41.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a los niveles plasmáticos de corticosterona, de 10-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o condicionamiento del miedo al contexto.

---

#### **4.5.4. Efectos del estrés crónico y del condicionamiento del miedo al contexto sobre la expresión de las moléculas de adhesión celular neural en diversas regiones cerebrales**

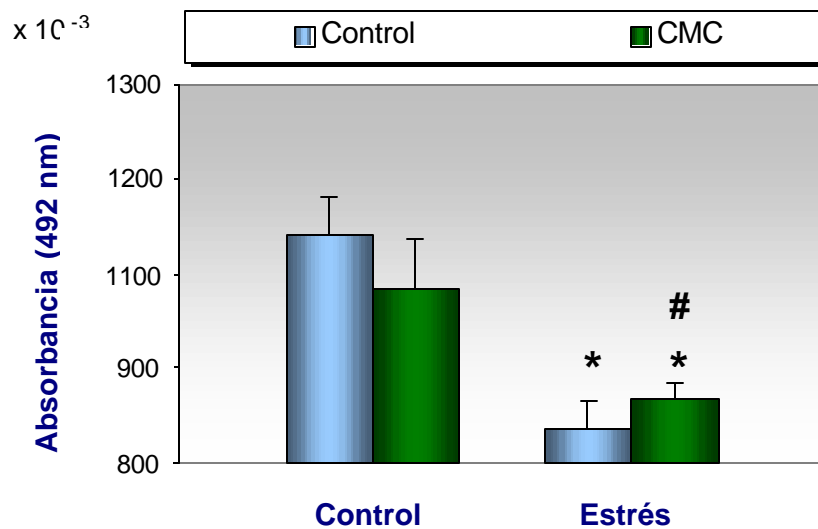
##### **4.5.4.1. Hipocampo**

Dado que, como se reseñó con anterioridad, el estrés crónico produce alteraciones en la formación hipocampal, se analizó la expresión de moléculas de adhesión celular neural en este protocolo de estrés crónico, mediante la técnica de ELISA, para las moléculas de adhesión celular: NCAM, su forma polisializada –PSA-NCAM-, y el antígeno L1.

- **Expresión de NCAM**

Los resultados obtenidos para NCAM se muestran en la figura número 42. El análisis de los resultados, mediante un ANOVA de dos vías, mostró un efecto significativo del factor “estrés” [F(1,38)=12,87, p<0,0011], indicativo de que dicho tratamiento induce un decremento significativo de la expresión de NCAM en el hipocampo. Sin embargo, dicho análisis indicó una ausencia de efecto del “factor condicionamiento” [F(1,38)=0,077, n.s] y de la interacción entre ambos factores (“estrés” y “condicionamiento”) F[(1,1)=0,353, n.s].

La realización de análisis a posteriori, mediante la prueba de t de Student, indicó que los dos grupos sometidos a estrés crónico; es decir, tanto el control sometido a inmovilización (p<0,004), como el grupo que se entrenó en el modelo de condicionamiento del miedo al contexto (p<0,05), mostraban valores de NCAM significativamente más bajos que sus respectivos grupos controles ‘no estresados’.



\*  $p < 0,05$  versus grupo control 'no estresado'.

#  $p < 0,05$  vs grupo control 'no estresado, que se entrenó en el CMC a 1 mA.

Control= Grupo control.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

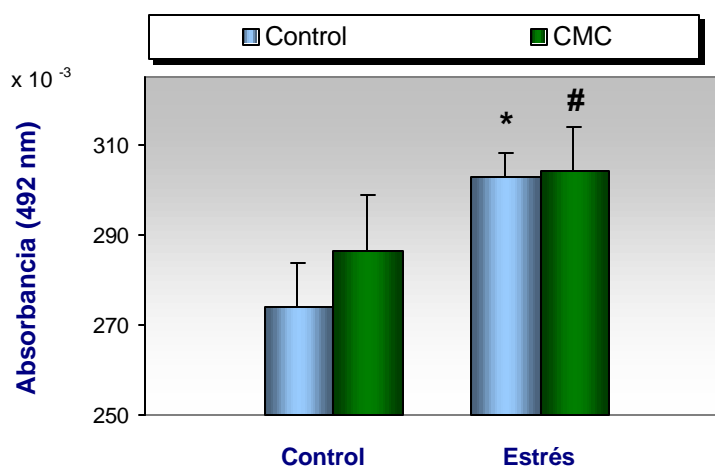
**Figura 42.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de NCAM en el hipocampo, de 10-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o condicionamiento del miedo al contexto.

- **Expresión de PSA-NCAM**

Por otro lado, se determinó la expresión de la forma polisializada de NCAM, PSA-NCAM. Así, el análisis de los datos correspondientes al ANOVA de dos vías, mostró un efecto significativo del factor "estrés" [ $F(1,38)=4,78$ ,  $p < 0,039$ ], con un aumento significativo en la expresión de PSA-NCAM, y una ausencia de efecto del factor condicionamiento [ $F(1,38)=0,713$ , n.s.]. Tampoco se observó un

efecto de la interacción entre ambos factores (factor "estrés" y "factor de condicionamiento") [F(1,1)=0,353, n.s].

Como se puede observar en la figura número 43, la realización de análisis a posteriori, mediante la prueba de t de Student, mostró que el estrés crónico indujo un incremento en la expresión de la forma polisializada de NCAM en ambos grupos estresados crónicamente ( $p < 0,05$  en ambos casos), en comparación a sus respectivos grupos controles.



\*  $p < 0,05$  versus grupo control 'no estresado'.

#  $P < 0,05$  vs grupo grupo control 'no estresado',  
que se entrenó en el CMC a 1 mA.

Control= Grupo control.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

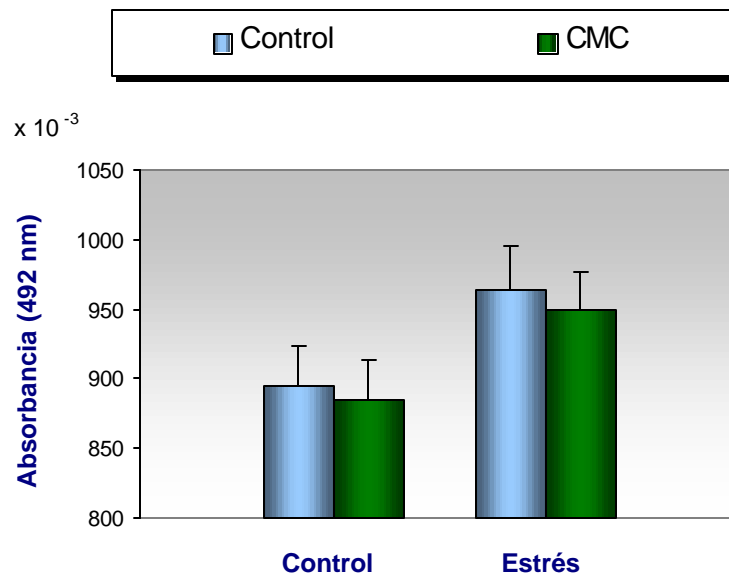
Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 43.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de PSA-NCAM en el hipocampo, de 10-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

---

- **Expresión de L1**

El análisis de los resultados correspondientes a la expresión de L1 mediante ANOVA de dos vías, mostró una tendencia hacia la significación estadística para el factor "estrés", indicativo de que dicho tratamiento tiende a inducir un aumento en los niveles de esta molécula en hipocampo [F(1,38)=2,44, p<0,13), n.s]. Sin embargo, el mismo análisis indicó una falta de efecto, tanto del factor "condicionamiento" [F(1,38)=0,00, n.s], como de la interacción conjunta de ambos factores ("estrés" y "condicionamiento"), [F(1,1)=0,00, n.s, ver figura 44].



Control= Grupo control.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 44.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de L1 en el hipocampo, de 10-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

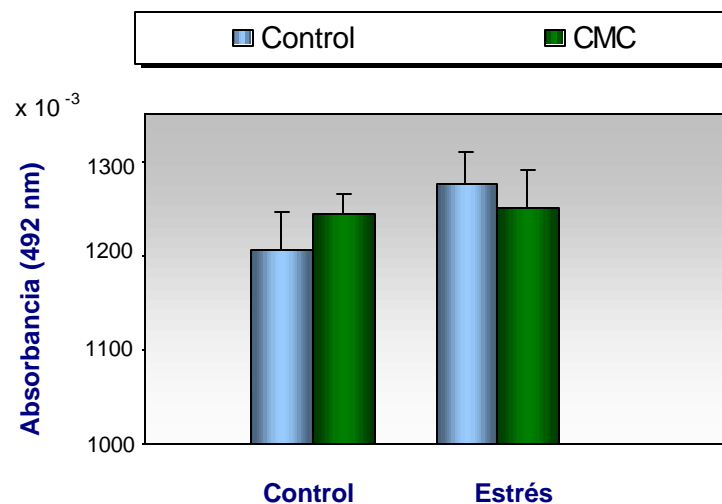


#### 4.5.4.2. Amígdala

Dado el importante papel que desempeña la amígdala en el modelo del condicionamiento de miedo al contexto, se analizó también la expresión en este conjunto de núcleos, de NCAM, PSA-NCAM y L1, en ratas sometidas a estrés crónico.

- **Expresión de NCAM**

El análisis de los resultados correspondientes a la expresión de NCAM mediante ANOVA de dos vías, no mostró un efecto significativo ni para el factor "estrés" [ $F(1,35)=0,983$ , n.s], ni para el factor condicionamiento [ $F(1,35)=0,9439$ , n.s]; así como tampoco para la interacción conjunta de ambos factores [ $F(1,1)=0,557$ , n.s] (ver gráfica 45).



Control= Grupo control.

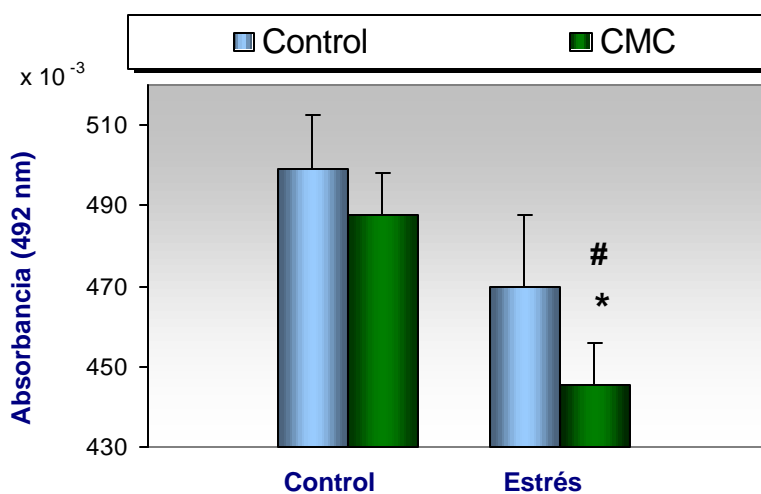
CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 45.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de NCAM en la amígdala, de 8-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

## • Expresión de PSA-NCAM

Los datos correspondientes al ANOVA de dos vías para la expresión de la forma polisializada de NCAM, PSA-NCAM, en la amígdala indicaron un efecto significativo del factor estrés, indicativo de la existencia de una disminución significativa de los niveles de PSA-NCAM por el tratamiento de estrés  $F[(1,35)=7,49, p<0,0097]$ . Sin embargo, dicho análisis fue indicativo de una ausencia de efecto del factor condicionamiento; si bien, se puede observar una tendencia a mostrar una disminución significativa de los niveles de PSA-NCAM por el condicionamiento  $F[(1,35)=1,714, p<0,19, n.s.]$ . El ANOVA tampoco mostró un efecto de la interacción conjunta de ambos factores ("estrés" y "condicionamiento") [ $F[(1,1)=9,21, n.s.]$ ]. La realización de análisis a posteriori, mediante la prueba de t de Student indicó que, las ratas sometidas a estrés crónico y que se entrenaron en el modelo de condicionamiento de miedo al contexto, mostraron valores de PSA-NCAM significativamente más bajos, tanto al compararlos con los de ratas controles no entrenadas ( $p<0,02$ ), como entrenadas ( $p<0,0025$ , ver figura 46).



\*  $P<0,05$  vs grupo control 'no estresado'

#  $P<0,05$  vs grupo control 'no estresado'

que se entrenó en el CMC a 1 mA.

Control= Grupo control.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

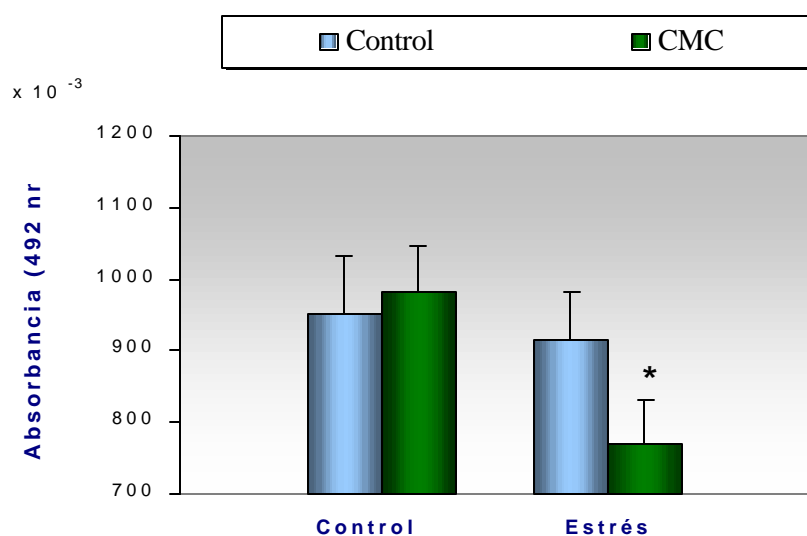
---

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 46.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de PSA-NCAM en la amígdala, de 8-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

- **Expresión de L1**

Los datos correspondientes a la expresión de L1 en la amígdala, mediante el ANOVA de dos vías, mostraron un efecto significativo del factor 'estrés'  $F[(1,35)=3,943, p<0,05]$ , indicativo de que dicho tratamiento indujo una disminución significativa de los niveles de L1. Sin embargo, dicho análisis estadístico indicó una ausencia de efecto del factor 'condicionamiento'  $F[(1,35)=0,529, n.s.]$ , así como de la interacción conjunta de ambos factores (factor 'estrés y factor de 'condicionamiento')  $F[(1,35)=1,615, p<0,2121, n.s.]$ . La realización de análisis a posteriori, mediante la prueba de t de Student, tal como se indica en la figura 47, indicó que el grupo sometido a estrés crónico y que se entrenó en el modelo de condicionamiento de miedo al contexto, mostró valores de L1 significativamente más bajos que los del grupo 'no estresado' que se entrenó en el CMC ( $p<0,05$ ). Además, dicho grupo 'estresado' que se entrenó en el CMC, mostró una tendencia a mostrar valores de L1 significativamente más bajos que los del ambos grupos controles ( $p<0,07, -n.s-$  vs grupo control ), y ( $p<0,14 -n.s-$  vs grupo control 'estresado', ver figura 47).



---

\*  $p < 0,05$  vs grupo control 'no estresado',  
que se entrenó en el CMC.

Control= Grupo control.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

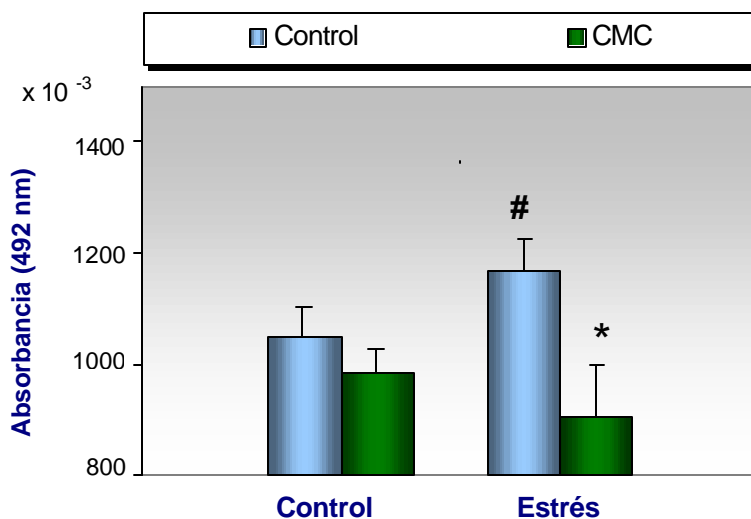
**Figura 47.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de L1 en la amígdala, de 8-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

#### **4.5.4.3. Corteza frontal**

- **Expresión de NCAM**

El análisis de los datos correspondientes a la expresión de NCAM mediante ANOVA de dos vías no mostró un efecto significativo del factor "estrés"  $F(1,34)=0,001$ , n.s], pero sí, en cambio, del factor "condicionamiento"  $F(1,34)=9,234$ ,  $p < 0,0046$ ], indicativo de que dicho procedimiento conductual produce una disminución significativa en los niveles de NCAM. Asimismo, dicho análisis también mostró un efecto significativo de la interacción entre los factores "estrés" y "condicionamiento"  $F(1,34)=3,932$ ,  $p < 0,05$ , ver gráfica 48]. La realización de análisis a posteriori, mediante la prueba t de Student, mostró en el grupo de ratas sometidas a estrés crónico un aumento significativo en la expresión de NCAM, al compararse con los valores de las ratas estresadas crónicamente y que se entrenaron en el modelo de CMC ( $p < 0,0025$ ), y en comparación a los del grupo control 'no estresado' y que se entrenó en el CMC ( $P < 0,025$ ), respectivamente.

Además, también el análisis mediante la prueba de t de Student indicó una tendencia del grupo control a mostrar niveles de NCAM significativamente más bajos que los del grupo estresado crónicamente ( $p < 0,08$ , n.s). También el grupo estresado y que se entrenó en el CMC, mostró una tendencia a mostrar niveles de L1 significativamente más bajos ( $p < 0,08$ , n.s), en comparación a los del grupo control 'no estresado'.



\* P<0,025 vs grupo control 'estresado'.  
 # p<0,025 vs grupo control 'no estresado' que se entrenó en el CMC.

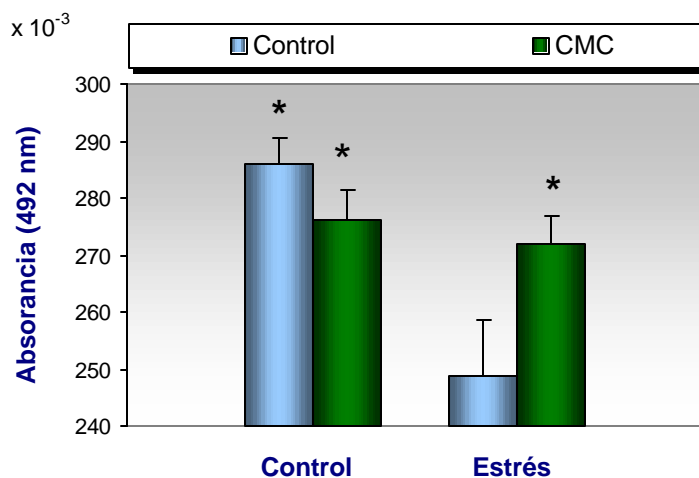
Control= Grupo control.  
 CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.  
 Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 48.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de NCAM en la corteza frontal, de 8-12 ratas por grupo ± el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

- **Expresión de PSA-NCAM**

Los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM en la corteza frontal, mediante la realización del ANOVA de dos vías, indicaron un efecto significativo del factor "estrés"  $F[(1,35)=9,36, p<0,0043]$ , indicativo de que dicho tratamiento produce una disminución significativa de los niveles de PSA-NCAM. Asimismo, dicho análisis mostró un efecto significativo de la interacción conjunta de los factores "estrés" y "condicionamiento"  $F[(1,35)=7,971, p<0,0078]$ . Sin embargo, se observó una ausencia de efecto del factor condicionamiento,  $F[(1,35)=0,5, p<0,48, n.s, \text{ver gráfica 49}]$ .

La realización de análisis a posteriori mediante la prueba t de Student, indicó que las ratas sometidas a estrés crónico mostraban niveles de PSA-NCAM significativos más bajos ( $p < 0,0004$ ), tanto al compararlos con los de animales controles ( $p < 0,005$ ), como con los de ratas que se entrenaron en el modelo de CMC ( $p < 0,005$ ). Por otro lado, las ratas estresadas crónicamente y que se entrenaron en el modelo de CMC, mostraron niveles de PSA-NCAM significativamente más elevados tanto en comparación con las ratas estresadas crónicamente ( $p < 0,05$ ), como una tendencia prácticamente significativa a mostrar niveles de PSA-NCAM más bajos que los del grupo control ( $p < 0,057$ , n.s).



\*  $P < 0,05$  vs grupo control estresado crónicamente.

Control= Grupo control.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

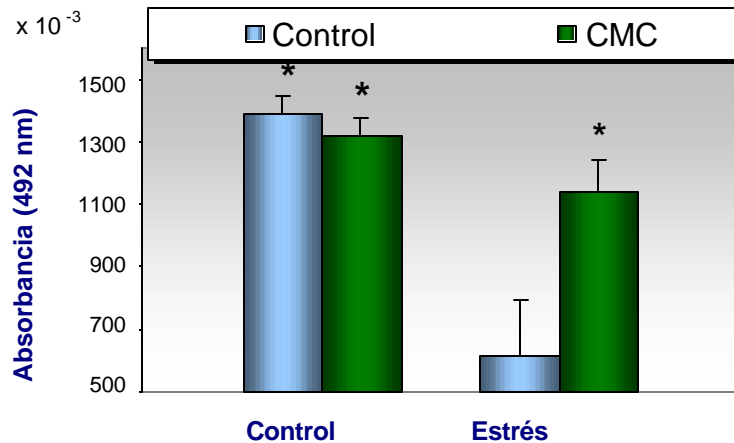
Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 49.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de PSA-NCAM, en la corteza frontal, de 8-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

#### 4.5.4.4. Estriado

- **Expresión de NCAM**

El ANOVA de dos vías de los datos correspondientes a la expresión de NCAM, mostraron un efecto significativo para el factor estrés  $F[(1,35)=24,811, p=0,000]$ , indicativo de que dicho tratamiento produjo una disminución significativa en los niveles de NCAM. Asimismo, dicho análisis indicó también un efecto del factor condicionamiento  $F[(1,35)=5,161, p<0,0293]$ , indicativo de que dicho entrenamiento produce un aumento de la expresión de NCAM. Finalmente, el análisis también indicó un efecto de la interacción entre ambos factores ("estrés" y "condicionamiento"),  $F[(1,35)=10,845, p<0,0023]$ . La realización de análisis a posteriori, mediante la prueba de t de Student, indicó que la expresión de NCAM en el estriado de ratas estresadas crónicamente, mostró una disminución altamente significativa, tanto al compararse con ratas controles ( $p=0,0001$ ), como con ratas entrenadas en el modelo de CMC ( $p<0,0004$ ). Sin embargo, las ratas que, habiendo sido estresadas crónicamente, fueron entrenadas en el modelo de CMC, mostraron un incremento significativo de los niveles de NCAM en esta estructura cerebral con respecto a los niveles mostrados por ratas estresadas crónicamente, pero no entrenadas en dicho paradigma conductual ( $p=0,0001$ , ver gráfica 50).



\*  $p < 0,05$  vs grupo control estresado crónicamente.

Control= Grupo control.

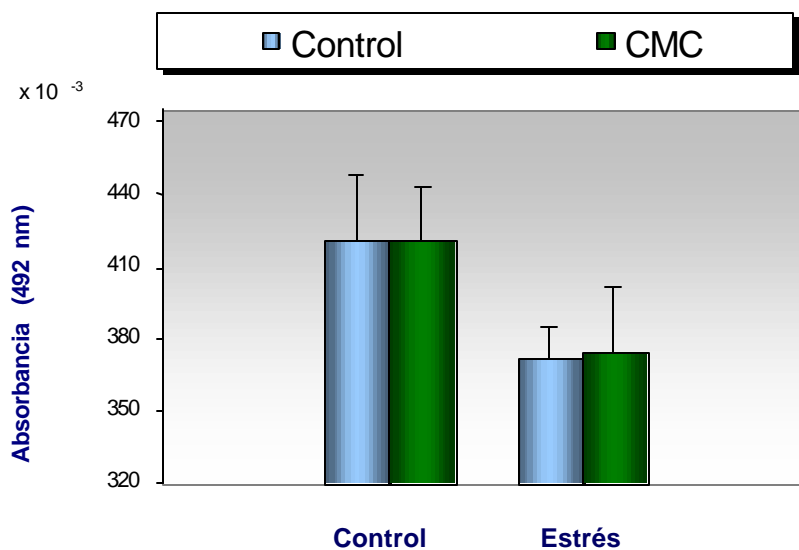
CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 50.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de NCAM en el estriado, de 8-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

- **Expresión de PSA-NCAM**

El ANOVA de dos vías, para la expresión de PSA-NCAM en el estriado, mostró un efecto significativo para el factor "estrés"  $F(1,33)=4,891$ ,  $p<0,034$ ], indicativo de que dicho tratamiento produce una disminución significativa en la expresión de PSA-NCAM. Sin embargo, dicho análisis indicó una ausencia de efecto del factor condicionamiento  $F(1,33)=0,007$ ,  $p<0,93$ , n.s], así como de la interacción entre ambos factores ("estrés" y "condicionamiento")  $F(1,33)=0,002$ ,  $p<0,96$ , n.s, ver gráfica 51]. Por otro lado, la realización de análisis a posteriori, mediante la prueba de t de Student, indicó una alta tendencia del grupo que se entrenó en el CMC a mostrar valores de NCAM significativamente más elevados, tanto en comparación al grupo control, como al grupo sometido a estrés crónico y que se entrenó en el modelo de condicionamiento de miedo al contexto ( $p<0,08$  en ambos casos, n.s).



Control= Grupo control.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

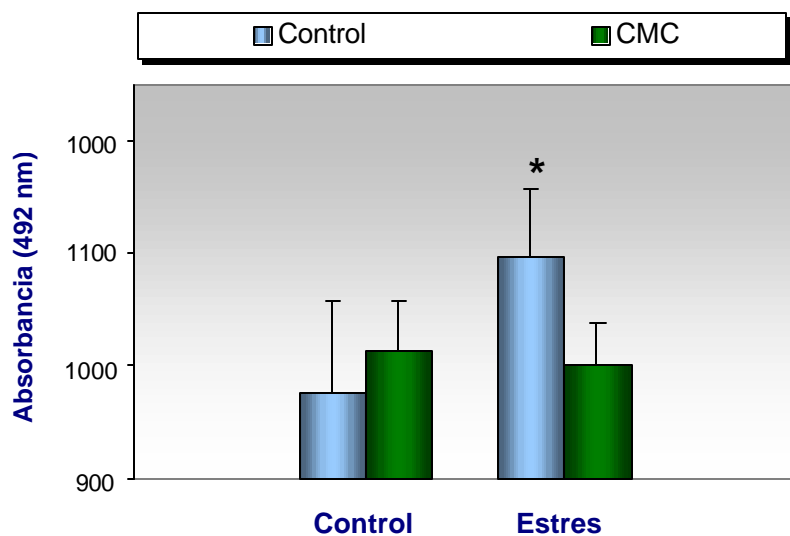
Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.



**Figura 51.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de PSA-NCAM en el estriado, de 8-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

- **Expresión de L1**

Los resultados correspondientes a la expresión de L1 en el ANOVA de dos vías indicaron un efecto significativo del factor estrés  $F[(1,35)=4,218, p<0,048]$ , indicativo de que dicho tratamiento produce un aumento significativo en la expresión de L1 estriatal (ver gráfica 52). Sin embargo, dicho análisis indicó una ausencia de efecto tanto del factor "condicionamiento"  $F[(1,35)=0,000, p<0,99, n.s]$ , como de la interacción entre ambos factores ("estrés" y "condicionamiento"),  $F[(1,35)=1,071; n.s]$ . La realización de análisis a posteriori, mediante la prueba de t de Student indicó que el grupo sometido a estrés crónico, mostró valores de L1 significativamente más elevados ( $p<0,04$ ) que los del grupo control.



\*  $p<0,05$  vs grupo control 'no estresado'.

Control= Grupo control.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

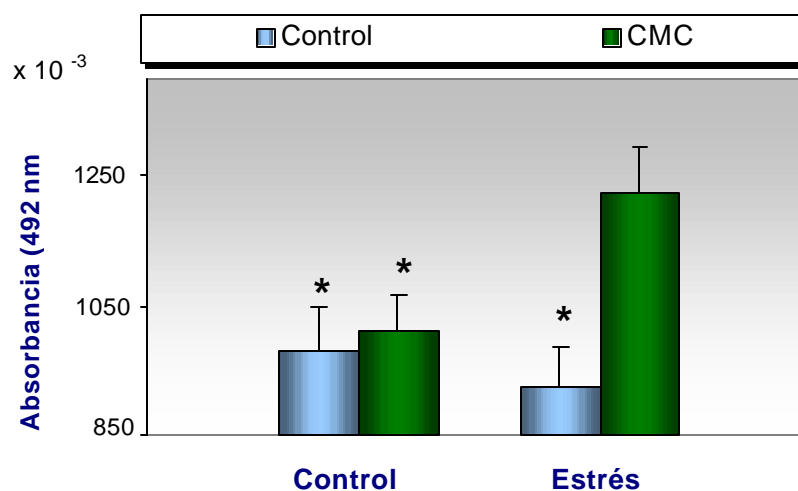
Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 52.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de L1 en el estriado, de 8-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

#### 4.5.4.5. Hipotálamo

- **Expresión de NCAM**

El ANOVA de dos vías correspondiente a la expresión de NCAM en el hipotálamo, no indicó un efecto significativo para el factor "estrés"  $F(1,33)=0,001$ ,  $p<0,2$ , n.s], pero mostró un efecto significativo del factor "condicionamiento"  $F(1,33)=5,8292$ ,  $p<0,0208$ ], que produce un aumento significativo de los niveles de NCAM (ver gráfica 53). También, mostró un efecto significativo de la interacción conjunta de ambos factores ("estrés" y "condicionamiento"),  $F(1,33)=4,377$ ,  $p<0,0442$ ]. La realización de análisis a posteriori, mediante la prueba de t de Student, indicó que las ratas estresadas crónicamente y que se entrenaron en el CMC, mostraron niveles de NCAM significativamente más elevados, tanto en comparación a las ratas estresadas crónicamente, pero no entrenadas en el modelo de CMC ( $p<0,01$ ), como al grupo control no estresado ( $p<0,025$ ), o al grupo 'no estresado' y entrenado en el CMC ( $P<0,025$ ).



\*  $p<0,05$  vs grupo control 'estresado' que se entrenó en el CMC.

---

Control= Grupo control.

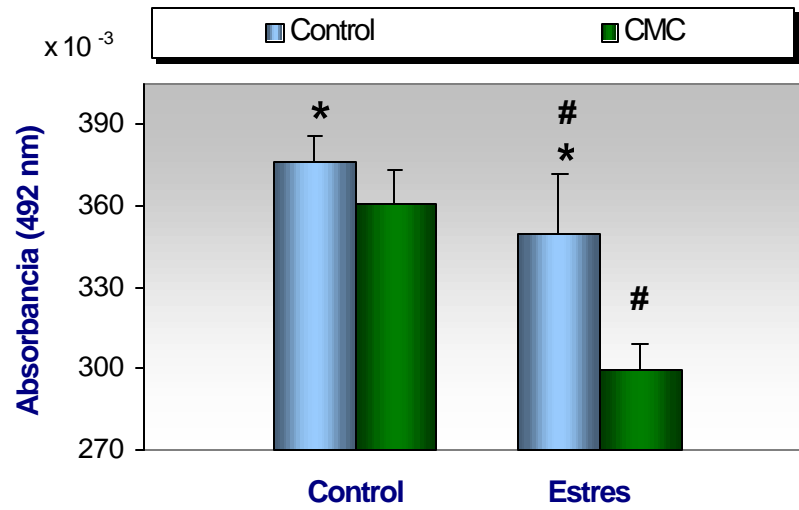
CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 53.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de NCAM en el hipotálamo de 10-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

- **Expresión de PSA-NCAM**

El análisis de los resultados correspondientes a la expresión de PSA-NCAM, mediante un ANOVA de dos vías, mostró un efecto significativo para el "factor estrés"  $F(1,34)=11,03$ ,  $p<0,0022$ ], indicativo de que dicho tratamiento produce una disminución significativa de la expresión de PSA-NCAM en el hipotálamo. Dicho análisis estadístico también indicó un efecto significativo del factor "condicionamiento"  $F(1,34)=11,03$ ;  $p<0,0251$ ], indicativo de que el entrenamiento conductual induce una disminución significativa de los niveles de PSA-NCAM. Sin embargo, el ANOVA no reveló un efecto de la interacción conjunta entre ambos factores  $F[(1,34)=1,537$ ,  $p<0,2236$ , n.s, ver gráfica 54]. La realización de análisis a posteriori, mediante la prueba de t de Student, indicó que las ratas estresadas crónicamente y que se entrenaron en el CMC, mostraban niveles de PSA-NCAM significativamente más bajos, tanto en comparación al grupo estresado crónicamente ( $p<0,016$ ), como al grupo control ( $p<0,001$ ). También, el grupo control 'no estresado' y que se entrenó en el CMC, mostró niveles de NCAM significativamente más elevados en comparación con cualquiera de los dos grupos estresados crónicamente ( $p<0,05$  vs grupo entrenado en el CMC y  $p<0,0005$  versus grupo estresado crónicamente, respectivamente).



Control= Grupo control.

CMC= Condicionamiento del miedo al contexto.

Estrés= Grupos sometidos a estrés crónico.

**Figura 54.** En la gráfica se muestran los datos correspondientes a la expresión media de PSA-NCAM en el hipotálamo, de 8-12 ratas por grupo  $\pm$  el error estándar de la media, en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

---

## **5. DISCUSIÓN**

---

## **5.1 EFECTOS DEL ESTRÉS INTRÍNSECO LIGADO A LA TAREA DE APRENDIZAJE SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR NEURAL EN EL SISTEMA NERVIOSO**

A continuación se discuten los resultados observados en los experimentos dirigidos a explorar el efecto que pudiera ejercer un aprendizaje estresante (en ratas que se entrenaron en el CMC) sobre la expresión de moléculas de adhesión celular neural en diversas regiones cerebrales (hipocampo, amígdala, corteza frontal, estriado, e hipotálamo), evaluada 12 y 24 horas después del entrenamiento.

### **5.1.1. Modulación de la expresión de moléculas de adhesión celular en el hipocampo**

Nuestros datos han mostrado que, en sinaptosomas de hipocampo, tanto la expresión de NCAM como la de su forma polisializada -PSA-NCAM- se redujo significativamente en todos los grupos condicionados 12 horas post-entrenamiento. Sin embargo, 24 horas post-entrenamiento sólo el grupo que se entrenó a 1 mA de intensidad en el CMC mostró cambios significativos en la expresión de NCAM, el cual mostró un incremento en la expresión de esta molécula. Por otra parte, 24 horas post-entrenamiento, no se observaron cambios significativos en la expresión de PSA-NCAM en los grupos entrenados a 0.2 y 0,4 mA, pero sí en el grupo que se entrenó con la más alta intensidad de descarga eléctrica de 1 mA (aprendizaje más estresante), que mostró, de nuevo, una reducción significativa en los niveles de PSA-NCAM. Además, en nuestros resultados no se observaron diferencias significativas en la expresión de las moléculas de adhesión celular evaluadas (NCAM, PSA-NCAM y L1) entre ambos grupos control (el únicamente manipulado y el expuesto también a la caja de condicionamiento).

Se ha propuesto que, en los procesos de aprendizaje y memoria, tiene lugar un remodelamiento estructural que implica la posible formación de nuevas conexiones sinápticas (Bailey y cols, 1996; Mayford y cols, 1992), que se iniciaría con un primer paso de de-adherencia sináptica, que permitiría cambios a nivel de las sinapsis (Bailey y Kandel, 1993; Mayford y cols, 1992; Rose, 1995; Abel y Kandel, 1998). En nuestra opinión, los resultados observados en nuestro

---

estudio -que muestran un descenso en la expresión de NCAM- 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el CMC, podrían interpretarse en este sentido, como un mecanismo que facilitaría la de-adherencia sináptica. Varios mecanismos podrían estar implicados en el descenso observado en la expresión de NCAM 12 horas post-entrenamiento que se observó en nuestros datos (ver apartado 5.1.3 de la discusión).

Dado que 24 horas post-entrenamiento, los niveles de NCAM se habían normalizado en todos los grupos experimentales, e incluso incrementados en el grupo entrenado con la intensidad de 1 mA, el decremento en la expresión de NCAM observado 12 horas post-entrenamiento parece tratarse de un fenómeno transitorio, que, como hemos comentado, podría facilitar el remodelamiento sináptico durante un periodo post-entrenamiento previo a la estabilización final de las sinápsis formadas (Rose, 1995; Regan, 1998). Estudios previos implican a NCAM en la transición de una memoria lábil a una memoria persistente (Rose, 1995; Doyley y cols, 1992b; Scholey y cols, 1993; Sandi y cols, 1995; Murphy y Regan, 1998). En esta línea, es interesante destacar que los animales que se entrenaron a 1 mA, y que son los que mostraban una expresión potenciada de NCAM en el hipocampo 24 horas post-entrenamiento, son los que desarrollan los niveles de miedo condicionado más intensos, y que se mantiene durante periodos de tiempo más prolongados (Cordero y cols, 1998).

Dado que los resultados obtenidos mediante técnicas bioquímicas en sinaptosomas de hipocampo en relación con la expresión de PSA, no se correspondían con los descritos en la literatura 12 horas después del entrenamiento de ratas en diversas pruebas comportamentales (Murphy y cols, 1996, Murphy y Regan, 1998, 1999), realizamos un estudio inmunohistoquímico para evaluar exactamente el efecto de los distintos tipos de entrenamiento en la expresión de células polisializadas en el giro dentado. Nuestros datos inmunohistoquímicos han puesto de manifiesto que la polisialización de NCAM en el borde de la capa polimórfica granular/hilus del giro dentado, 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el paradigma del condicionamiento del miedo al contexto, es dependiente de la intensidad del estímulo estresor con el que se entrenaron las ratas en el CMC. Así, el grupo que se entrenó a 0,4 mA (estrés intrínseco moderado) mostraba 12 horas post-entrenamiento una frecuencia de polisialización significativamente incrementada en dicha capa del giro dentado, mientras que se replicó el descenso observado en nuestros estudios bioquímicos en los niveles de PSA-NCAM en el grupo entrenado con 1 mA.

---

Es interesante señalar que el incremento en la polisialización que se observó en nuestros datos 12 horas después del entrenamiento de las ratas en el CMC a 0,4 mA es comparable al mostrado (también 12 horas post-entrenamiento) por el grupo de ratas que se entrenaron en el laberinto acuático de Morris (Murphy y cols, 1996, Murphy y Regan, 1998; resultados confirmados en esta Tesis), lo que refuerza la idea de que un estado de polisialización incrementado, 12 horas después del entrenamiento, en el borde del hilus con la capa polimórfica granular podría considerarse como un mecanismo general asociado a la formación de la memoria en diversos paradigmas conductuales, como el laberinto acuático de Morris (Murphy y cols, 1996; Murphy y Regan, 1999), el paradigma del evitación pasiva (Fox y cols, 1995a) y, de acuerdo con nuestros resultados, experiencias moderadamente estresantes de condicionamiento del miedo al contexto. Por otra parte, es interesante comentar que la inclusión del grupo de ratas entrenadas en el laberinto acuático de Morris nos permitió validar los resultados obtenidos en nuestro estudio y replicar los obtenidos en trabajos previos por otros autores (Murphy y cols, 1996).

En cuanto a las discrepancias observadas en la expresión de PSA-NCAM, 12 horas post-entrenamiento, en el grupo que se entrenó a 0,4 mA, entre los resultados logrados mediante la técnica de ELISA en sinaptosomas de hipocampo y los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia, podrían ser debidas, como comentamos anteriormente, a que ambos estudios implicaron considerables diferencias metodológicas de las dos técnicas empleadas. En los estudios de inmunofluorescencia, PSA-NCAM se determinó en una población de neuronas restringidas a la capa polimórfica granular del giro dentado/hilus, por tratarse de una población celular cuyo fenómeno de polisialización se ha comprobado que juega un papel crítico en la formación de la memoria en ratas diversos paradigmas conductuales (Fox y cols, 1995a; Murphy y cols, 1996; Murphy y Regan, 1998). Sin embargo, la técnica de ELISA se llevó a cabo en sinaptosomas obtenidos del total del hipocampo, por lo que posibles cambios en la polisialización localizados en una subpoblación celular, podrían haberse diluido al efectuar nuestras medidas en el total de la estructura de la formación hipocampal.

Por otra parte, el estudio inmunohistoquímico mostró que, a diferencia del incremento en la polisialización observado en el grupo entrenado con una intensidad de 0,4 mA, el grupo entrenado con 1 mA presentó una reducción en la polisialización. El hecho de que dicha reducción la observáramos en los animales entrenados en la condición experimental que conduce a la formación de una memoria de mayor intensidad y duración, parece discrepar con la propuesta de que el incremento en la polisialización hipocampal 12 horas post-aprendizaje podría jugar un



---

papel clave en los mecanismos de transferencia de la información a una memoria a largo plazo (Murphy y cols, 1996; Murphy y Regan, 1998). Sin embargo, en nuestra opinión, tal discrepancia podría encontrarse relacionada con la naturaleza del test de aprendizaje empleado en nuestro estudio –CMC–, que es diferente a la de aquellos paradigmas de aprendizaje en los que otros autores han observado un aumento de PSA-NCAM como consecuencia del aprendizaje, como el laberinto acuático de Morris o el test de evitación pasiva. En dichos tests también existen factores estresantes ligados a la tarea de aprendizaje, si bien, en ellos, los animales adquieren una respuesta que les permite afrontar las condiciones adversas. Por el contrario, el CMC es un modelo de aprendizaje emocional en el que los animales exhiben una respuesta inhibitoria (medida por el porcentaje de inmovilidad conductual desarrollado por las ratas) cuando las ratas son reintroducidas en el contexto en el que fueron condicionadas y, por tanto, no aprenden a desarrollar ninguna respuesta conductual para actuar sobre las circunstancias estresantes. Esta idea se aplica particularmente en los animales entrenados con 1 mA, mientras que las respuestas conductuales inducidas por el entrenamiento con 0,4 mA son indicativas de mecanismos de aprendizaje diferentes. Así, el hecho de que, al realizar el test de retención, el grupo de 1 mA muestre niveles de inmovilidad conductual del 80-90%, frente al 40-60 % mostrado por el grupo de 0,4 mA, podría reflejar un impacto diferente del condicionamiento con una estimulación moderadamente estresante (0,4 mA), frente al inducido por una estimulación que podría considerarse ‘traumática’ (1 mA) (Cordero y cols, 2001). Es decir, la aparente discrepancia entre el papel propuesto para la polisialización de NCAM en la consolidación de la memoria y la reducción en dicha polisialización observada en el grupo de 1 mA, podría deberse al hecho de que el condicionamiento del miedo con dicha intensidad de descarga eléctrica induce un tipo especial de memoria, que podría mantener ciertas similitudes con las características de las memorias traumáticas que se dan en el síndrome de estrés postraumático (Yeyuda y Antelman, 1993).

Dada la dificultad que presentan algunos aspectos de las memorias traumáticas a ver reducida la intensidad de los recuerdos con el paso del tiempo (Richter-Levin, 1998), se ha sugerido la existencia de un mecanismo de codificación de la información diferente para este tipo de memorias traumáticas (van der Kolk, 1994; Bremner y cols, 1995; Murburg, 1997). De acuerdo con nuestros resultados, existe la posibilidad de que el descenso en la polisialización de NCAM quizás pudiera desempeñar un papel importante en los mecanismos de formación de las memorias traumáticas.

---

Así pues, es lógico proponer la existencia de mecanismos de codificación de la información diferentes para aquellas pruebas en las que existen factores estresantes de una magnitud muy elevada de los que subyacen al almacenamiento de aprendizajes con un contenido de estrés moderado. Nuestros resultados sugieren que el incremento en la polisialización de NCAM, que se produce después de ciertos tipos de aprendizaje no traumáticos (en los cuales las ratas desarrollan estrategias de afrontamiento), permitiría la selección de las sinapsis relevantes del total de las que pudieran haber sido transitoriamente sobreexpresadas durante del entrenamiento (Doyle y cols, 1992a; Murphy y Regan, 1998). Sin embargo, dada la resistencia al olvido observada en las memorias traumáticas, nuestros resultados sugieren que la reducción en la expresión de PSA podría potenciar la adhesión sináptica (Rutishauser y Landmesser, 1996) en ciertos circuitos implicados en el procesamiento original de la información, lo que dificultaría el olvido del evento traumático (Roemer y cols, 1997; Ehlers y Clark, 2000).

Además, se sabe que la exposición a eventos traumáticos puede provocar un complejo patrón de alteraciones de memoria que, entre otras manifestaciones, incluye: (i) una potenciación de la memoria para elementos del contexto asociados a la situación traumática (ii) y una amnesia retrógrada o un recuerdo dificultado de la información que se procesó, justo antes del trauma (Schacter y cols, 1996). Pues bien, el condicionamiento de miedo desarrollado por las ratas entrenadas a la condición de descarga eléctrica a 1 mA de intensidad puede conducir a estas dos alteraciones de la memoria reseñadas. Así, la existencia de una memoria potenciada de los elementos del contexto, similar a la evidenciada en las memorias traumáticas del síndrome de estrés posttraumático, está en consonancia con el hecho de que el grupo que se entrenó a 1 mA cuando se reexpuso a la cámara de condicionamiento mostraba los niveles de inmovilidad conductual más elevados -conducta que incluso se mantiene 4 semanas después de la experiencia traumática- (Cordero y cols, 1998, comunicación personal).

Además, la segunda alteración de la memoria puesta de manifiesto en el síndrome de estrés posttraumático, a la que acabamos de referirnos, está en consonancia con el hecho de que el condicionamiento del miedo inducido por 1 mA, pero no por 0,4 mA, interfiere con la formación de la memoria para otro tipo de información –aprendizaje espacial-, que fue adquirida inmediatamente antes del condicionamiento. Este hecho se ha puesto de manifiesto en esta Tesis en el experimento en el que las ratas, después de haber sido entrenadas en el paradigma del laberinto acuático de Morris, se sometieron al condicionamiento del miedo. En dicho experimento, se observó que el recuerdo de la tarea de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris,

---

se vio dificultado en las ratas que, tras dicho aprendizaje, fueron sometidas al condicionamiento del miedo con una intensidad de choque de 1 mA. Por el contrario, el grupo que se entrenó a 0,4 mA en el CMC, mostró durante el test de transferencia (test de natación libre sin plataforma) una retención potenciada de la localización espacial.

Por último, discutiremos en esta sección los efectos inducidos por el condicionamiento del miedo al contexto en la expresión hipocampal de la molécula L1. Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron un complejo patrón de regulación de la expresión de esta molécula. Así, tanto 12 como 24 horas después del entrenamiento, sus niveles hipocampales mostraron un patrón de expresión bifásico, en relación a la intensidad de descarga eléctrica. Así, tanto 12, como 24 horas post-entrenamiento, la expresión de L1 se vio significativamente incrementada en los grupos entrenados bajo niveles de estrés leves (0.2 mA) e intensos (1 mA), no observándose cambios significativos en los niveles de dicha molécula mostrados por el grupo entrenado bajo niveles de estrés moderados (0,4 mA).

El hecho de que en varias especies animales la administración i.c.v de anticuerpos contra L1 dificulte la consolidación de la memoria en diversos paradigmas conductuales, parece sugerir un papel importante a esta molécula en la consolidación de la memoria (Scholey y cols, 1995; Arami y cols, 1996, Pradel y cols, 2000).

El incremento en la expresión de L1 observado en nuestro estudio después del entrenamiento en el condicionamiento del miedo al contexto podría estar implicado en los cambios neurales que acontecen bajo la consolidación de la memoria a largo plazo (Rose, 1995). Esta hipótesis, es consistente con el hecho de que el grupo que se entrenó a 1 mA de intensidad de descarga eléctrica (que forma una memoria más fuerte y persistente a largo plazo) mostrara el reseñado aumento en la expresión de L1. Sin embargo, el hecho de que las ratas que se entrenaron a 0.2 mA mostraron niveles bajos de inmovilidad conductual y una expresión elevada de L1, así como la falta de modulación en la expresión de L1 observada en el grupo entrenado a 0,4 mA, cuestiona la atribución de un papel de L1 en los mecanismos de consolidación de la memoria del condicionamiento del miedo al contexto.

---

### **5.1.2. Expresión de la molécula de adhesión celular neural, y de su forma polisializada, en otras regiones cerebrales (amígdala, corteza frontal, estriado e hipotálamo) 12 y 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el CMC**

Son diversos los trabajos existentes en la literatura científica que han otorgado un importante papel a áreas cerebrales como la amígdala (Roozendaal y cols, 1999; Schafe y cols, 2000), el estriado (Baunez y cols, 1999; Siemiakowski y cols, 2000), o la corteza frontal, en procesos de aprendizaje y memoria (Miller y cols, 2000; Fuster y cols, 2000).

En lo que respecta a la amígdala, son distintas las evidencias que otorgan un papel a las diferentes áreas de la amígdala en el condicionamiento de miedo (Killcross y cols, 1997; Rogan y cols, 1997; Garcia y cols, 1998). Asimismo, algunos estudios han implicado otras estructuras, además de la amígdala y el hipocampo, como la corteza frontal (Garcia y cols, 1999), en el condicionamiento del miedo al contexto. Por ello, extendimos nuestra evaluación de la posible modulación de las moléculas de adhesión celular, 12 y 24 horas después del entrenamiento, a otras áreas cerebrales: amígdala, corteza frontal, estriado e hipotálamo. En dicho estudio, por razones técnicas, nos centramos en la expresión de NCAM y PSA-NCAM, y también evaluamos la posibilidad de que la modulación de dichas moléculas pudiera depender de la intensidad de choque eléctrico utilizada en el condicionamiento, por lo que incluimos los mismos grupos de entrenamiento evaluados anteriormente (ratas entrenadas a 0.2, 0,4 ó 1 mA).

Los datos obtenidos mostraron un complejo patrón de regulación de estas moléculas, dependiente tanto de la estructura, como de la molécula estudiada, así como de la intensidad de choque eléctrico a la que los animales fueron entrenados y el tiempo (12 o 24 horas post-entrenamiento) al que se realizaron los estudios.

Entre los resultados obtenidos, cabe destacar que, al igual que se observó en el hipocampo, 12 horas después del entrenamiento, el grupo entrenado con 0.2 mA mostró una reducción en la expresión de NCAM en la amígdala. Por el contrario, también 12 horas post-entrenamiento, este grupo mostró un incremento en la expresión de PSA-NCAM amigdalal. Sin embargo, los grupos entrenados a intensidades de choque eléctrico superiores, no mostraron una regulación en la expresión de dichas moléculas en esta estructura. En lo que respecta a la

---

modulación observada en la amígdala por el grupo que se entrenó a 0.2 mA, debemos señalar que, tanto la reducción en la expresión de NCAM, como el incremento en la expresión de PSA, son procesos que contribuyen a facilitar procesos de de-adherencia sináptica y de facilitación de la plasticidad sináptica, que podrían favorecer el remodelamiento sináptico en dicho grupo. Por ello, nuestros resultados apuntan hacia la existencia de una plasticidad potenciada en la amígdala (12 horas post-entrenamiento) en ratas que se entrenaron bajo un estrés intrínseco leve asociado a la tarea de aprendizaje.

En coincidencia con la regulación de PSA descrita en la amígdala 12 horas post-entrenamiento, la corteza frontal también mostró un aumento significativo en la polisialización en el grupo que se entrenó con una intensidad de 0.2 mA. Por otra parte, 24 horas post-entrenamiento, se observó un patrón de expresión de PSA bifásico en la corteza frontal; es decir, opuesto en los grupos condicionados a diferentes intensidades de choque eléctrico.

Estudios en la literatura han otorgado un papel importante a PSA-NCAM en la formación de sinapsis en el estriado (Uryu y cols, 1999). Así, se ha observado una polisialización disminuida (Butkler y cols, 1999), junto a un descenso del 30 % de un determinado tipo de sinapsis en ratas tratadas con el antagonista de los receptores de NMDA, (MK-801) (Butkler y cols, 1998). Nuestros resultados, no mostraron cambios significativos en la expresión de NCAM estriatal, y de su forma polisializada, en los diferentes grupos condicionados, y a los diferentes tiempos post-entrenamiento evaluados.

Trabajos en la literatura han mostrado la existencia de un remodelamiento sináptico importante en el sistema neurohipofisario ante determinadas situaciones fisiológicas (García Segura y cols, 1995; Nothias y cols, 1997; Theodosis y cols, 1999; Pierre y cols, 2001). Nuestros datos mostraron un patrón de expresión bifásico en el hipotálamo, tanto de PSA, como de NCAM, 24 horas post-entrenamiento, observándose aumentada la expresión de dichas moléculas en el grupo entrenado bajo condiciones de estrés moderado  $-0,4$  mA- y disminuida en las otras dos condiciones experimentales de entrenamiento, bajo estrés leve  $-0.2$  mA- y elevado  $-1$  mA-. Carecemos de argumentos que nos permitan explicar, 24 horas post-entrenamiento, la expresión bifásica obtenida para ambas CAMs en los diferentes grupos condicionados. Un reciente trabajo, ha puesto de manifiesto que situaciones fisiológicas en el sistema neurohipofisario (como la lactación o la parturación, que inducen la liberación de hormonas como la oxitocina y la vasopresina), inducen un descenso en la polisialización de NCAM, que de forma interesante

---

coincide con la estabilización sináptica de neuronas oxitocinérgicas (Soares y cols, 2000; Nothias y cols, 1997). Basándonos en esta evidencia, podríamos sugerir que en los grupos entrenados a 0.2 y 1 mA en el CMC, (a diferencia del grupo entrenado a 0,4 mA, que mostró una plasticidad potenciada), podría acontecer una estabilización sináptica importante en ambos grupos, como consecuencia de un estado de polisialización disminuido.

Nuestros datos también han mostrado, 24 horas post-entrenamiento un patrón de expresión bifásico de PSA-NCAM en la corteza frontal (opuesto al evidenciado en el hipotálamo).

### **5.1.3. Mecanismos implicados en la reducción en la expresión de NCAM observada en diferentes regiones cerebrales**

Al igual que las observaciones recogidas en nuestro estudio en diversas regiones cerebrales (entre las que destacan el hipocampo y la amígdala, dado su importante papel en el condicionamiento de miedo) principalmente 12 horas post-entrenamiento, la sensibilización del reflejo de apertura de la branquia en el molusco marino *Aplysia californica* también induce una regulación a la baja en la expresión de apCAM –homólogo de NCAM- (Mayford y cols, 1992). De acuerdo con los datos obtenidos en diversos estudios, dicho descenso en la expresión de NCAM podría ser explicado como consecuencia de distintos mecanismos, que consideraremos a continuación, si bien nuestro estudio no nos permite establecer hasta qué punto cada uno de ellos podría estar implicado en los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Así, entre los factores que podrían encontrarse implicados en la reducción en la expresión de NCAM después del entrenamiento (y de forma particular 12 horas post-entrenamiento en el hipocampo), cabría destacar los siguientes:

- (i) **Endocitosis intracelular.** En el modelo de aprendizaje de *Aplysia californica*, se ha puesto de manifiesto que la reducción observada en neuronas presinápticas sensoriales parece ser debida, entre otros mecanismos, a la reducción en la expresión de apCAM preexistente, presumiblemente como consecuencia de una internalización por endocitosis (Bailey y cols, 1992; Mayford y cols, 1992). Además, Miñana y cols (2001) han puesto de manifiesto que NCAM puede ser endocitado por un mecanismo dependiente de clatrina (Miñana y cols, 2001). Recientes trabajos han atribuido

---

un papel a la ubiquitinización de NCAM como mecanismo que explicase la regulación a la baja de las isoformas de NCAM, sobre todo de NCAM 180 (Foley y cols, 2001).

- (ii) **Síntesis de NCAM disminuida.** Los niveles de NCAM disminuidos observados en nuestro estudio podrían ser consecuencia de un decremento en la síntesis de sus isoformas estabilizadoras (Doherty y cols, 1990b).
- (iii) **Degradación de NCAM potenciada.** Otro factor que puede explicar la expresión de NCAM disminuida observada en nuestros estudios es la existencia de un aumento en la degradación de esta molécula. Así, se ha documentado en la literatura la existencia de una degradación diferencial de las isoformas transmembrana de NCAM (Park y cols, 1997).
- (iv) **Aumento en la liberación de la forma soluble de NCAM.** Un aumento en la secreción extracelular de NCAM podría explicar los niveles de NCAM disminuidos en las sinapsis. En esta línea, estudios desarrollados en el modelo de la LTP han puesto de manifiesto que también existe un incremento en los niveles extracelulares de una forma soluble de NCAM de 115 Kda, que se ha propuesto que resulta de la eliminación sináptica de NCAM como consecuencia de un incremento de la actividad proteolítica (Fazeli y cols, 1994). Además, incluso en pacientes con desórdenes bipolares (enfermos con desórdenes bipolares de tipo I y con depresión mayor), se ha visto un incremento de los niveles de NCAM soluble en el fluido cerebrospinal (Barbeau y cols, 1995; Poltorak y cols, 1996; Wawter y cols, 1998, 1999).

#### **5.1.4. Papel de los glucocorticoides**

Una de las cuestiones que cabe preguntarse en el tipo de estudios desarrollados en esta Tesis es cuál o cuáles podrían ser los mediadores de los cambios observados en la expresión de las moléculas de adhesión celular en animales sometidos a pruebas de aprendizaje con un distinto contenido estresante. Dado que los sistemas fisiológicos de estrés, se han implicado en los procesos de consolidación de las memorias estresantes (ver Introducción), en la mayor parte de nuestros estudios hemos incluido la evaluación de los niveles circulantes de corticosterona.

En esta Tesis, hemos confirmado las observaciones realizadas en estudios previos en el sentido de que existe una relación entre los niveles plasmáticos de corticosterona y el nivel de condicionamiento desarrollado por los animales (Cordero y cols, 1998). En particular, se observó

---

la existencia de una correlación entre los niveles plasmáticos de corticosterona liberados como consecuencia del entrenamiento en el condicionamiento del miedo al contexto y los niveles de miedo condicionado (que dependen de la intensidad de descarga eléctrica con que se entrenaron los animales) (Cordero y cols, 1998).

Por otra parte, se han identificado secuencias consenso para glucocorticoides específicas que median la represión transcripcional en las polisialiltransferasas PST-1 o STX (Rodríguez y cols, 1998). Además, se ha visto que la dexametasona –análogo sintético de glucocorticoides- es capaz de modular la expresión de las polisialiltransferasas en cultivos celulares (Coughlan y Breen, 1998). Nuestros datos han mostrado, 12 horas post-entrenamiento, un descenso significativo en la expresión de PSA-NCAM en el grupo que se entrenó a 1 mA de intensidad en el CMC, que podría ser debido a la acción de la corticosterona plasmática liberada inmediatamente después del entrenamiento (ya que este grupo es el que muestra valores hormonales más elevados). Este hecho está en consonancia con el efecto inhibitorio que ejerce la corticosterona sobre la polisialización de NCAM en el hipocampo (Rodríguez y cols, 1998).

Ahora bien, en dicho contexto, es difícil explicar la polisialización diferencial de NCAM observada en nuestro estudio inmunohistoquímico, ya que a diferencia del descenso encontrado en el grupo entrenado con 1 mA, el grupo de 0,4 mA, presentó un incremento del PSA hipocampal. No obstante, existen trabajos en la literatura que han puesto de manifiesto la existencia de una modulación bifásica por la acción de la corticosterona en distintas funciones del sistema nervioso (Joels y de Kloet, 1992).

Dado que la administración 5,5 horas después del entrenamiento de anticuerpos tanto contra NCAM, como contra L1, previene los efectos que ejerce la corticosterona sobre la facilitación de la memoria en pollos débilmente entrenados en el modelo de evitación pasiva (Sandi y cols, 1995), *a priori* parece razonable que entre los mecanismos, directos o indirectos, implicados en las acciones de dicha hormona sobre la consolidación de la memoria, se encuentra la modulación de la expresión de NCAM o L1.

En lo que respecta a la expresión de L1 en nuestro estudio, se ha observado un patrón de expresión bifásico, por lo que no parece existir una relación entre la expresión de L1 y los niveles plasmáticos de corticosterona en el hipocampo. En efecto, ya que a los tiempos post-entrenamiento seleccionados (12 y 24 horas) las ratas que se entrenaron en el CMC a 0.2 mA y a 1 mA, respectivamente mostraban niveles de corticosterona plasmática como de condicionamiento



---

muy diferentes, y sin embargo, una expresión de L1 muy similar. Por ello, resulta difícil atribuir un papel a la corticosterona en la modulación de la expresión de L1 en nuestro estudio a los diferentes tiempos post-entrenamiento seleccionados.

Por otra parte, el hecho de que cultivos de células PC-12 muestren un decremento en la expresión del mRNA de L1 cuando se añade dexametasona (DEX) ( $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M) al medio (Grant y cols, 1996), está en contradicción con el aumento en la expresión de L1 observada en los grupos de 0,2 y 1 mA a los tiempos post-entrenamiento seleccionados en nuestro estudio. Sin embargo, podrían existir diferencias importantes entre los mecanismos de modulación de CAMs que acontecen en cultivos celulares “*in vivo*” de los que tienen lugar en situaciones “*in vitro*”.

Por otra parte, se sugiere que la corticosterona liberada como consecuencia del entrenamiento puede potenciar la expresión de NCAM en la corteza frontal. En esta línea, Sandi y Loscertales (1999) han demostrado que la inyección de corticosterona, que facilita el condicionamiento del miedo contextual en ratas entrenadas a 0,2 mA de intensidad, produce un aumento en la expresión de NCAM a nivel de la corteza frontal (Sandi y Loscertales, 1999). Este hecho, podría explicar que la expresión de NCAM potenciada de nuestro estudio en el grupo entrenado a 1mA en el CMC en comparación con el grupo de 0,2 mA, pudiera ser debida a la acción de la corticosterona plasmática liberada por las ratas como consecuencia del entrenamiento en el CMC.

Por otro lado, a pesar de que se ha puesto de manifiesto que la inyección aguda de corticosterona (a 5 mg/Kg), disminuyó significativamente la fucosilación de glicoproteínas en el estriado y en el hipotálamo (Venero y cols, 1996), en nuestro estudio no observamos modificaciones en el estriado ni en la expresión de NCAM, ni en la de PSA-NCAM, a los tiempos post-entrenamiento seleccionados, por lo que nuestros datos no avalan la posible modulación de dichas moléculas en esta estructura por los glucocorticoides.

- **5.1.4.1. Efecto de la metirapona sobre la modulación hipocampal de CAMs inducida por el condicionamiento del miedo al contexto**

Varios estudios en la literatura han puesto de manifiesto que tratamientos que inhiben la síntesis de corticosterona son capaces de alterar la consolidación de la memoria en ratas entrenadas en diversos paradigmas conductuales (Oitzl y de Kloet, 1992; Sandi y Rose, 1994a;

---

Roozendaal y cols, 1996; Roozendaal y McGaugh, 1997b). En lo que respecta al condicionamiento del miedo al contexto, la inhibición de la acción cerebral de la corticosterona liberada durante el entrenamiento interfiere la formación de la memoria, tanto cuando dicha inhibición se realiza mediante la administración intracerebroventricular de antagonistas específicos para los receptores corticosteroides (Cordero y Sandi, 1998), como cuando se actúa reduciendo los niveles de corticosterona secretados en el condicionamiento mediante la administración de inhibidores de la síntesis de este esteroide, como la metirapona (Cordero y cols, 2001).

En esta Tesis, hemos utilizado la segunda estrategia de inhibición de la síntesis del corticosteroide, para preguntarnos si la reducción en la secreción de corticosterona durante el entrenamiento de las ratas en el modelo de condicionamiento del miedo al contexto bajo la intensidad de choque eléctrico de 1 mA, podría interferir con la modulación de las CAMs en el hipocampo inducida por dicho entrenamiento. Para ello, se inyectó subcutáneamente metirapona a las ratas, que es capaz de ejercer una "adrenalectomía farmacológica", ya que disminuye los niveles plasmáticos de corticosterona por inhibición de la actividad de la enzima 11- $\beta$  hidroxilasa en ratas (Diederich y cols, 2000). El hecho de seleccionar metirapona frente a otros inhibidores de la síntesis de corticosterona, (como por ejemplo, aminoglutamida), se debe a que ésta última por si misma puede producir déficits fisiológicos y conductuales (Roberts y cols, 1993). Además, se prefirió el uso de metirapona frente a la adrenalectomía como técnica quirúrgica, ya que ésta última elimina la medula y la corteza adrenal irreversiblemente y produce hipotensión e hipoglucemia como efectos secundarios. Por otro lado, y desde un punto de vista conductual, se ha demostrado que la metirapona es capaz de prevenir las alteraciones conductuales y neuroquímicas inducidas por el estrés (Calvo y cols, 2000).

A nivel conductual, en este trabajo, hemos confirmado el efecto reductor de la metirapona sobre la formación de la memoria del condicionamiento del miedo al contexto (Cordero y cols., 2001), ya que las ratas inyectadas con dicho inhibidor mostraron una reducción en la respuesta de inmovilización durante el test de retención (efectuado 12 horas post-entrenamiento). Además, este resultado está en consonancia con trabajos previos en la literatura que han puesto de manifiesto que inyecciones de metirapona previas al entrenamiento, son capaces de atenuar la formación de la memoria, bajo situaciones que llevan implícito un estrés intrínseco ligado a la tarea de aprendizaje (Roozendaal y cols, 1996; Loscertales y cols, 1997). Estudios similares, han puesto de manifiesto que la inhibición de la función de los receptores de

---

glucocorticoides de tipo II mediante otros inhibidores de la síntesis de corticosterona – fundamentalmente antagonistas de receptores de glucocorticoides de tipo II-, puede interferir con la consolidación de la memoria en determinadas respuestas de aprendizaje (Oitzl y de Kloet, 1992; Sandi y Rose, 1994a,b; Roozendaal y McGaugh, 1997b; Cordero y Sandi, 1998).

En lo que respecta a la expresión de las CAMs 12 horas después del tratamiento con metirapona y/o condicionamiento del miedo al contexto, nuestros resultados mostraron que la metirapona induce una reducción sobre la expresión de NCAM. Sin embargo, la expresión de PSA-NCAM no pareció verse influida (al ser evaluada mediante técnicas bioquímicas en la totalidad del hipocampo) por la administración de este inhibidor. Ahora bien, dicha expresión sí se vio disminuida significativamente por el efecto del condicionamiento con un choque eléctrico de 1 mA, lo que replica nuestros resultados previos.

Se ha demostrado que el efecto inhibitorio que ejerce la corticosterona sobre la polisialización de NCAM en el hipocampo se realiza a través de receptores de glucocorticoides de tipo II (Rodríguez y cols, 1998). Nuestros datos han mostrado que el "factor metirapona" no revertía la reducción en la expresión de NCAM y PSA-NCAM inducida por el entrenamiento, sino que, por el contrario, la disminuyó. Este hecho está en consonancia con los datos publicados por Rodríguez y cols. (1998) indicativos de que ratas adrenalectomizadas a las que se restauraron sus niveles normales de corticosterona plasmática -mediante la implantación de pellets que liberan corticosterona-, revertían la disminución en la polisialización de NCAM, y no evidenciaban diferencias significativas en la expresión de PSA-NCAM al compararlos con el grupo control. Sin embargo, existen diferencias importantes a tener en cuenta entre este estudio y el nuestro, ya que en dicho estudio los niveles plasmáticos de corticosterona de las ratas adrenalectomizadas no llegan a ser del todo comparables a los de las ratas a las que se inyectó metirapona y/o entrenó en el modelo del condicionamiento del miedo al contexto. Es decir, que mientras que la adrenalectomía elimina totalmente los niveles plasmáticos de corticosterona y mantiene ambos tipos de receptores de glucocorticoides desocupados, la metirapona mantiene niveles basales.

---

## **5.2. ESTRÉS CRÓNICO**

A continuación, se discuten los resultados obtenidos en el estudio en el que se evaluaron las consecuencias que ejerce la exposición a un protocolo de estrés crónico por inmovilización, durante 21 días, tanto sobre el aprendizaje del condicionamiento del miedo al contexto, como sobre la expresión de moléculas de adhesión celular.

### **• 5.2.1. Efectos del estrés crónico sobre distintos parámetros fisiológicos**

En primer lugar, comentaremos el efecto de los tratamientos sobre diversas variables fisiológicas. Así, nuestros resultados mostraron que las ratas estresadas crónicamente, aunque presentaban una cierta tendencia a ver incrementados sus niveles plasmáticos de corticosterona, dichos niveles no difirieron significativamente de los presentados por los animales controles. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos en los que el estrés crónico no produjo cambios en los niveles basales de corticosterona (Herman y Spencer, 1998; Herman y cols, 1995).

Por otra parte, la exposición a un estrés crónico mantenido redujo el peso corporal y el peso de timo, tal como se ha relatado en otros trabajos (Magariños y McEwen, 1995a). Así, se sabe que el estrés crónico produce una involución del timo unida a una apoptosis de timocitos (Kinoshita y Hato, 2001), que dependen de los niveles de corticosterona (Tarcic y cols, 1998). En este sentido, es interesante señalar que existen estudios donde se ha visto que la timectomía (extirpación del timo) produce alteraciones cognitivas en procesos de aprendizaje y memoria (Nishiyama, 2001).

### **5.2.2. Efectos del estrés crónico en el condicionamiento del miedo al contexto**

El mismo procedimiento de estrés crónico utilizado en nuestro estudio ya se había empleado en trabajos previos (Wooley y cols, 1990), en los que se vio que la exposición a un protocolo de estrés crónico, durante 21 días y con una frecuencia de 6 horas diarias, producía una atrofia reversible en las dendritas apicales de las neuronas piramidales del área CA3 en el hipocampo

---

(Watanabe y cols, 1992a,c; Magariños y McEwen, 1995; Magariños y cols, 1997), así como déficits de aprendizaje en test dependientes de hipocampo (Conrad y cols, 1999; Cordero y cols, 1999).

Sin embargo, nuestros resultados han puesto de manifiesto que ratas sometidas a éste mismo procedimiento de estrés crónico y entrenadas en el paradigma del condicionamiento del miedo al contexto a 1 mA de intensidad, mostraban una potenciación del condicionamiento. Dado que el procedimiento mencionado de estrés crónico utilizado en nuestro estudio, no sólo no bloqueó, sino que además potenció el condicionamiento de miedo al contexto, parece ser que las posibles alteraciones estructurales que pudiese inducir el estrés crónico específicamente en el hipocampo son insuficientes para bloquear el condicionamiento del miedo, aun cuando se sabe que ante un daño inducido en el hipocampo se puede interferir con el condicionamiento de miedo (Good y Honey, 1997; Maren y Fanselow, 1997). En consonancia con dicha potenciación del condicionamiento del miedo por estrés crónico, recientemente se ha observado en otro paradigma conductual la existencia de un aumento de la memoria, como consecuencia de la exposición al estrés crónico en ratas entrenadas en un laberinto radial (Bowman y cols, 2001).

Es importante destacar que las ratas sometidas a estrés crónico y que se entrenaron en el CMC mostraban una inmovilidad conductual no sólo en la fase de retención o de test del CMC, sino también durante el periodo post-descarga del entrenamiento. Dado que se ha relatado que ratas sometidas a un estrés inescapable mostraban una potenciación de los niveles de inmovilidad conductual en un nuevo ambiente (Antelman, 1998; Maier, 1990), se sugiere que los niveles de miedo portenciado observados en el grupo que se sometió a estrés crónico y que se entrenó en el CMC, podrían ser interpretados como una facilitación de la conducta de miedo por una historia previa de estrés por inmovilización. Como resultado, el condicionamiento del miedo en un nuevo ambiente podría haber sido facilitado y, por tanto, las ratas estresadas crónicamente podrían tener más miedo condicionado cuando consoliden la memoria a largo plazo.

---

### **5.2.3. Expresión de moléculas de adhesión celular neural en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el modelo del CMC en diversas regiones cerebrales**

A continuación, se discuten las alteraciones observadas en la expresión de moléculas de adhesión celular neural en ratas sometidas a estrés crónico y/o entrenadas en el modelo del condicionamiento del miedo al contexto, en diversas regiones cerebrales: hipocampo, amígdala, corteza frontal, estriado e hipotálamo.

- **5.2.3.1. Hipocampo**

En este trabajo se ha observado, la existencia de una marcada regulación en la expresión de moléculas de adhesión celular neural *in vivo*, como consecuencia de la exposición a un protocolo de estrés crónico mantenido. Así, la expresión de NCAM se vio significativamente reducida, pero sin embargo se observó un incremento, tanto de la forma polisializada de NCAM, como de L1 (tendente a la significación estadística).

Varios factores podrían estar contribuyendo a esta expresión de NCAM disminuida en el hipocampo. Además de los mecanismos reseñados en el apartado 5.1.3 de la discusión, un estudio reciente ha mostrado un papel de la actividad ecto-ATP-ásica de NCAM (Skladchikova y cols, 1999), que podría explicar la reducción observada en los niveles de NCAM en nuestros datos. Esta idea está en consonancia con estudios en los que se ha mostrado que el estrés crónico, a través de la inducción de elevados niveles glucocorticoides, podría inducir una depleción de los niveles de ATP ante ciertos daños en el hipocampo (Tombaugh y Sapolsky, 1992). Por ello, el estrés crónico podría disminuir los niveles de ATP extracelular, lo que daría lugar en última instancia a un aumento de la actividad proteolítica de NCAM, y por tanto, a reducidos niveles de NCAM en la sinapsis. En esta línea, Poltorak y cols (1996) han visto un aumento en la liberación de la forma soluble de NCAM en el fluido cerebroespinal de pacientes con desórdenes bipolares (que mostraron niveles plasmáticos de cortisol elevados) (Poltorak y cols, 1996).

---

Se ha propuesto que los niveles elevados de glucocorticoides median una gran parte de la alteraciones morfológicas inducidas por el estrés crónico en neuronas piramidales de CA3 (Magariños y cols, 1995a, 1999), entre las que se encuentra: (i) una reducción en el número y la longitud de sus ramificaciones dendríticas (Magariños y cols, 1995a,b), y (ii) cambios estructurales en los terminales de las fibras musgosas (Magariños y cols, 1997). Dado que NCAM está implicado en la estabilización de los contactos sinápticos (Murphy y Regan, 1998), la reducción de la expresión de esta molécula, observada en nuestro estudio podría estar implicada en las alteraciones estructurales que induce el estrés crónico en el hipocampo (Magariños y cols, 1995b).

Por otro lado, se sabe que el estrés crónico en ratas reduce el número total de sinapsis en las fibras musgosas-CA3 (Sousa y cols, 2000). Es posible que en ratas estresadas crónicamente, la pérdida de contactos neurales entre las fibras musgosas y las células piramidales de CA3 (inducida, entre otros factores, por la atrofia en las dendritas de dichas neuronas), pudiese conducir a una respuesta plástica de remodelamiento sináptico compensatoria. Así, las fibras musgosas, que son las mayores proyecciones sobre las células piramidales de CA3, muestran una densa inmunoreactividad para PSA-NCAM en nuestro estudio. Dado que la presencia del ácido polisialílico que porta NCAM dificulta la adhesión sináptica y favorece la plasticidad sináptica (Ruthisauser y Landmesser, 1996), la existencia de un estado de polisialización incrementado, podría constituir un mecanismo adecuado, que permitiría el remodelamiento estructural. En esta línea, varias evidencias, que se indican a continuación, parecen otorgar un papel importante a la reactivación en la expresión de PSA-NCAM en la formación hipocampal, como mecanismo compensatorio ante una situación de daño tisular inducido, similar en mayor o menor medida al que pudiera estar aconteciendo en nuestro estudio de estrés crónico (Le Gal-La Salle y cols, 1992; Fox y cols, 2001). Entre dichas evidencias, se ha visto (i) en pacientes epilépticos la existencia de una expresión de PSA-NCAM incrementada en el giro dentado y en la corteza entorrinal (capa II) (Mikkonen y cols, 1999). (ii) y un patrón de inmunoreactividad para PSA-NCAM alterado en el área CA1 de pacientes con Alzheimer (Mikkonen y cols, 1998), (iii) mientras que Fox y cols (2001) han observado en gergos isquémicos unos niveles de PSA-NCAM incrementados en neuronas y en células gliales del hipocampo (Fox y cols, 2001).

A continuación, se indican otros posibles moléculas que, a través de una relación indirecta con PSA-NCAM, pudieran estar modulando la plasticidad sináptica en la formación hipocampal:

---

(i) Evidencias indirectas en la literatura parecer otorgar un papel indirecto a determinados neurotransmisores (como la serotonina), en la capacidad de remodelamiento sináptico inducida por PSA-NCAM. Así, la reinervación serotoninérgica revierte el decremento observado en la expresión de PSA-NCAM cuando se induce una lesión en el hipocampo (Brezun y Daszuta, 2000). Además, se ha visto en monos subordinados que el estrés crónico produce atrofia dendrítica en neuronas de CA3, al tiempo que decrece los sitios de unión a serotonina en el hipocampo (McKittrick y cols, 2000). Estas evidencias podrían sugerir la existencia de una interrelación entre la expresión de PSA-NCAM y dicho neurotransmisor en la capacidad de remodelamiento estructural en el hipocampo.

(ii) Otro estudio, ha puesto de manifiesto una relación indirecta entre la expresión de BDNF y de PSA-NCAM en fenómenos de remodelamiento sináptico inducidos en el hipocampo. En dicho estudio, la administración de BDNF restauró la LTP en ratones transgénicos deficientes para NCAM, y se evidenció la existencia de una vía de señalización molecular convergente entre las cascadas moleculares de PSA-NCAM y de BDNF a nivel de la enzima fosfatidil 3 inositol quinasa (Muller y cols, 2000). Por otro lado, se ha visto también que ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización durante 10 días muestran un incremento en la actividad catalítica del receptor de Trk (receptores de neurotrofinas) tanto en el giro dentado como en CA1 y CA3 (Nibuya y cols, 1999).

Respecto a la expresión de L1, nuestros datos han puesto de manifiesto que el estrés crónico induce un aumento en los niveles de L1, tendente a la significación estadística. Varias evidencias en la literatura apoyan un papel de L1 como molécula remodeladora. Así, dado que (i) L1 actúa como un factor antiapoptótico en cultivos celulares (Chen y cols, 1999), (ii) y el hecho de que la deafferenciación del giro dentado produzca un aumento en la expresión de L1 (Jucker y cols, 1998), parece razonable proponer un papel de L1 como molécula remodeladora, que se induce ante situaciones que requieren reparación tisular o un remodelamiento estructural importante.

Por otra parte, tal como se ha relatado en la introducción, L1 desempeña un importante papel en los procesos de formación de la memoria a largo plazo (Arami y cols, 1996; Wolfer y cols, 1988). A pesar de que 24 horas después del entrenamiento de las ratas en el CMC a 1 mA, se evidencio una expresión tanto de NCAM como de L1 significativamente incrementada en el hipocampo, y una expresión de PSA-NCAM decrecida, los experimentos del presente trabajo no mostraron cambios significativos en la expresión de NCAM y de L1, como consecuencia del condicionamiento de miedo. Dado que el papel y



---

la regulación de estas moléculas es dependiente de la edad de los animales (Bahr y cols, 1993; Fox y cols, 1995a; Linnemann y Skarsfelt, 1994; Linnemann y cols, 1985, 1993), una posible explicación a tal discrepancia podría radicar en la diferente edad de los animales empleados en este estudio y en los estudios anteriores.

- **5.2.3.2. Amígdala**

En la amígdala, nuestros datos han mostrado un efecto significativo debido al estrés tanto para la expresión de PSA-NCAM como de L1. No existen trabajos en la literatura que nos permitan establecer los posibles mecanismo/s que pudieran explicar el descenso observado en la polisialización y en los niveles de L1, aunque indirectamente se podría sugerir la interacción de ciertas quinasas en los efectos observados sobre la polisialización. El razonamiento es el siguiente. Por una parte, parece existir un consenso sobre el papel que desempeñan determinadas quinasas en las memorias de miedo condicionado. Algunos trabajos en la literatura otorgan un papel importante a la proteína quinasa  $\beta$  en las memorias de miedo condicionado en la amígdala basolateral, pero también en CA1 y en la neocorteza (Weeber y cols, 2001; Schafe y cols, 1999, 2000). Además, se ha visto que la administración de inhibidores de la enzima *PKC* antes del entrenamiento de las ratas en el CMC disminuye la respuesta de miedo condicionado, cuando son administrados en el núcleo basolateral de la amígdala, pero no en el núcleo central, lo podría apoyar un posible papel de estas quinasas en el condicionamiento del miedo en esta región (Goosens y cols, 2000). Por otra parte, se ha visto que el estrés es capaz de producir alteraciones en la actividad de determinadas quinasas (Kim y cols, 2000). Pues bien, Gallagher y cols, han puesto de manifiesto en cultivos celulares (Gallagher y cols, 2000) e *in vivo* (Gallagher y cols, 2001), que la activación de la *PKC delta* inhibe la polisialización de NCAM, aunque debemos reconocer que carecemos de datos para saber si dicha inhibición acontece en algún núcleo de la amígdala.

- **5.2.3.3. Corteza frontal**

La corteza frontal desempeña un papel importante en la respuesta neuroquímica al estrés (Horger y Roth, 1996). En nuestros datos se observó que el "factor estrés" indujo una disminución significativa en la expresión de PSA-NCAM; y además, se observó un efecto significativo de la

---

interacción conjunta del "factor estrés" y del "factor condicionamiento", tanto para la expresión de NCAM como de su forma polisializada.

Aun cuando, no se observaron cambios significativos en la expresión de NCAM para el "factor estrés", el grupo de ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización mostró un aumento significativo en la expresión de NCAM vs grupo control no estresado. Existe un trabajo en la literatura donde se ha visto que en situaciones de estrés crónico emocional se producen cambios en la inmunoreactividad de NCAM y de GFAP (Sedyhk y cols, 1999).

Es importante reseñar que la expresión de NCAM potenciada, que se observó en el grupo sometido a estrés crónico por inmovilización está en contradicción con la expresión de NCAM observada en el resto de áreas cerebrales en el grupo sometido a estrés crónico por inmovilización, ya que siempre se ha visto la existencia de unos niveles de NCAM disminuidos en el resto de regiones para el grupo control no estresado. Por ello, el aumento observado en los niveles de NCAM para dicho grupo estresado crónicamente mediante inmovilización, es poco consistente con los datos existentes en la literatura. Así, Sandi y Loscertales (1999) han demostrado que la administración crónica de corticosterona durante 21 días, induce un descenso en la expresión de NCAM en la corteza frontal (Sandi y Loscertales, 1999).

Por otra parte, nuestros datos han puesto de manifiesto que el estrés crónico disminuyó la expresión de PSA-NCAM en la corteza frontal. Éste decremento en la polisialización de NCAM también se ha puesto de manifiesto mediante inmunohistoquímica en la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos (Ni Dhuill y cols, 1999). Además, se sabe que en dicha patología existe un aumento en los niveles de NCAM soluble (como consecuencia del aumento de la liberación de una isoforma soluble de 115 Kda) en el líquido cefalorraquídeo de dichos pacientes (Vawter y cols, 1998, 1999), que podría estar reflejando un mecanismo de remodelamiento sináptico alterado (Barbeau, 1995; Vawter 2000).

A continuación, se indican evidencias que relacionan la expresión de BDNF con la expresión de CAMs en este área cerebral. Así, se ha visto en cultivos de neuronas corticales que la pérdida del ácido polisialílico que porta NCAM conduce a una supervivencia y a una diferenciación reducida de los mismos. Este efecto, es consecuencia de una señalización celular disminuida. debido a unos niveles de BDNF y de ácido polisialílico disminuidos Además, la adición exógena de BDNF al medio de cultivo revierte el efecto de la pérdida de PSA (Vutskits y cols, 2001). Por ello,

---

parece razonable proponer a priori una posible relación indirecta entre ambas moléculas en la corteza frontal.

Por otra parte, diversas evidencias sugieren que, ante una situación de estrés crónico, podría existir una capacidad de remodelamiento sináptica disminuida en la corteza frontal. De forma interesante, un reciente estudio ha puesto de manifiesto que en motoneuronas de ratones transgénicos para la enzima Cu-SOD, (enzima que elimina los aniones superóxido), se produce una pérdida de la inmunoreactividad para PSA-NCAM (Warita y cols, 2001). Por tanto, la elevada producción de radicales libres podría inducir un remodelamiento sináptico disminuido (Jorgensen y cols, 1997), a través, entre otros mecanismos, de unos niveles de PSA-NCAM disminuidos.

- **5.2.3.4. Estriado**

Se sabe que el estrés agudo/crónico puede modular la expresión de determinadas moléculas y de neurotransmisores en esta región. Los resultados obtenidos en nuestro estudio han mostrado que el "factor estrés" induce una disminución significativa tanto en la expresión NCAM como de su forma polisializada. También, el "factor condicionamiento" indujo un efecto significativo en la expresión de NCAM, que indica que como consecuencia del entrenamiento en nuestro estudio, disminuyó significativamente la expresión de NCAM en dicha región cerebral. Así, 24 horas post-entrenamiento, las ratas que se sometieron a estrés crónico y que se entrenaron en el CMC revierten (aumentan significativamente) la expresión de NCAM, como consecuencia del entrenamiento.

De nuevo, no existen trabajos disponibles en la literatura que nos permitan establecer los factores que pudieran estar determinando la expresión de moléculas de adhesión celular en esta región. Por tanto, se indican una serie de evidencias, que de forma indirecta pudieran ejercer una posible acción moduladora sobre la expresión de NCAM o de su forma polisializada.

Se sabe que el estrés crónico puede modular la actividad de determinados neurotransmisores en esta región. Así, la exposición crónica al frío durante 17 días (4 °C como estímulo estresor) (Moore y cols, 2001), es capaz de reducir tanto la actividad espontánea de neuronas dopaminérgicas, como el número de receptores de dopamina y los niveles de dopamina en el estriado (Isovich y cols, 2000).

---

Por otra parte, se observó la existencia de una expresión de L1 significativamente potenciada para el "factor estrés" en nuestro estudio. Evidencias en la literatura, indican la existencia de una relación indirecta entre la expresión de L1 y determinados neurotransmisores. En un reciente estudio con ratones transgénicos deficientes para L1, se ha evidenciado una distribución de neuronas dopaminérgicas alterada, que podría sugerir una relación indirecta entre la expresión de L1 y la dopamina en el estriado. Además, en dichos transgénicos, los axones que proyectan de la sustancia nigra al putamen exhibían un patrón de migración anormal posiblemente debido a la deficiencia de L1 (Demyanenko y cols, 2001).

No existen estudios en la literatura que permitan determinar si el aumento en la expresión de L1 constituye un mecanismo contrarregulador ante una posible pérdida neuronal inducida en ratas sometidas a estrés crónico específicamente en ésta región. Sin embargo, como ya hemos mencionado anteriormente, varias evidencias parecen otorgar un papel a L1 como molécula inductora de remodelamiento sináptico ante situaciones donde se induce un daño tisular. En esta línea, se ha visto que la administración de L1 a cultivos de células dopaminérgicas deprivadas de factores de crecimiento, actúa como un factor trófico en la sustancia nigra, que mantiene la supervivencia de los cultivos neuronales (Hulley y cols, 1998). Además, varias evidencias en la literatura indican que en situaciones de daño tisular se induce un aumento en la expresión de L1, que actúa como molécula reparadora, ya que (i) lesiones corticales frontales producen un aumento en la expresión de L1 en el estriado dorsomedial, que podría actuar como mecanismo contrarregulador al daño neuronal inducido (Poltorak y cols, 1993). (ii) Además, se ha visto que lesiones completas producen un incremento en la expresión de L1 en la zona dorsomedial y ventrolateral del lado lesionado del estriado, mientras que lesiones parciales muestran un decremento en la expresión de L1 (Poltorak y cols, 1997).

- **5.2.3.5. Hipotálamo**

Nuestros datos han puesto de manifiesto que tanto la expresión de NCAM como de su forma polisializada mostraron un efecto significativo del "factor condicionamiento", indicativo de que el entrenamiento en el CMC aumentó la expresión de NCAM y disminuyó la de PSA-NCAM. También se observó una disminución significativa en la expresión de PSA-NCAM para el "factor estrés", lo que indica que el estrés crónico disminuye la polisialización de NCAM en ésta región cerebral. También el "factor estrés" induce una tendencia a disminuir los niveles de NCAM

---

hipotalámicos, pero no se alcanzó la significación estadística. Aún cuando no existen estudios en la literatura que estudien el efecto del estrés crónico sobre la expresión de moléculas de adhesión celular en el hipotálamo, existe un trabajo donde se ha puesto de manifiesto, la existencia de un decremento en la fucosilación de glicoproteínas en el hipotálamo de ratas a las que se administraron pellets de corticosterona (150 mg/Kg) durante 21 días (Venero y cols, 1996).

Aunque, de nuevo debemos destacar la ausencia de trabajos en la literatura que nos permitan establecer los mecanismo/s que pudieran estar implicado/s en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión celular en el hipotálamo, se aportan, a continuación, una serie de evidencias indirectas, de diversos factores que pudieran influir sobre la expresión de CAMs en ésta región.

Dado que se sabe que la corticosterona puede potenciar la excitotoxicidad del glutamato (Moghadam y cols, 1994), y que recientemente se ha atribuido un papel a la activación de la enzima NOS, y a los receptores de NMDA en la regulación de la polisialización de NCAM (Bouzioukh y cols, 2001), parece razonable hipotetizar un posible papel de dichos factores (NOS y receptores de NMDA) como moduladores de la expresión de CAMs en el hipotálamo.

Existe un trabajo en la literatura, donde se ha puesto de manifiesto que 2 horas después de un estrés por inmovilización se produce un aumento en la expresión del mRNA de la enzima NOS -sintasa del óxido nítrico- en el núcleo paraventricular del hipotálamo de ratas viejas después de ser sometidas al estresor, mientras que ratas jóvenes mostraron un incremento significativo cuando se sacrificaron 3 horas después del procedimiento inductor de estrés (Calza y cols, 1993).

Además, en un reciente estudio se ha visto, aunque con ratas envejecidas (con altos niveles de corticosterona), la existencia de una actividad iNOS potenciada en el hipotálamo (Ferrini y cols, 2001). También se ha visto la existencia de una expresión de NCAM disminuida en ratas envejecidas en el hipotálamo (Linnemann y Skarsfel, 1994).

Dado que el estrés crónico aumentó la actividad de la iNOS, parece razonable proponer que un aumento en la expresión y en la actividad de la enzima iNOS, podría ser una de las vías a través de las cuales la corticosterona podría ejercer sus posibles acciones deletéreas en el hipotálamo, como consecuencia de un aumento en la excitotoxicidad mediada por niveles elevados de glutamato (Moghadam y cols, 1994). Aún cuando no se ha evidenciado una relación directa entre la expresión de moléculas de adhesión celular neural y la enzima NOS en el sistema

---

neurohipofisario, si se ha demostrado la relación existente durante el desarrollo en la migración celular de *guinea pig* entre la expresión de PSA-NCAM y NOS (Shariful Island y cols, 1998). Por ello, y a través de estas evidencias indirectas, se sugiere que quizás un aumento en la actividad iNOS pudiera producir un decremento en la expresión de PSA-NCAM en ratas sometidas a estrés crónico, como consecuencia del aumento de la excitotoxicidad y en la producción de radicales libres, que en ultima instancia inducirían una capacidad de remodelamiento sináptico disminuida (Jorgensen y cols, 1997).

---

## **6. CONCLUSIONES**

---

## 6. Conclusiones

Los resultados de esta Tesis nos permiten proponer las siguientes conclusiones:

- El entrenamiento de ratas adultas jóvenes en un modelo de entrenamiento de miedo al contexto induce un complejo patrón de modulación en la expresión de las moléculas de adhesión celular neural, NCAM, su forma polisializada, y L1, que depende de distintos factores, entre los que se encuentran: (i) el área cerebral; (ii) la molécula de adhesión celular estudiada; (iii) la intensidad de choque eléctrico a la que los animales fueron entrenados; y (iv) el tiempo post-entrenamiento (12 o 24 horas) seleccionado para el estudio.
- En concreto, en el hipocampo, todos los grupos experimentales muestran una modulación de dichas moléculas cuando se evalúan 12 horas post-entrenamiento, observándose como resultados más significativos una reducción de la expresión de NCAM en todos los grupos experimentales y un aumento en la expresión de L1 en los grupos entrenados con las intensidades de choque eléctrico leve (0,2 mA) y elevada (1 mA). La polisialización de NCAM se vio incrementada en el giro dentado en el grupo entrenado con la intensidad de choque intermedia (0,4 mA), pero disminuyó en el grupo entrenado en la condición estresante más elevada.
- Dicha reducción en la polisialización de NCAM 12 horas post-entrenamiento es un hallazgo novedoso, pues las evidencias existentes hasta el momento señalaban al incremento en la polisialización como mecanismo subyacente a la formación de la memoria a largo plazo. A partir de una serie de estudios conductuales en los que se mostró que el entrenamiento en el condicionamiento del miedo al contexto bajo condiciones altamente estresantes (1 mA) interfiere con la consolidación de la memoria para otro tipo de información previamente adquirida, se plantea la posibilidad de que un descenso en la expresión de PSA hipocampal pueda estar jugando un papel en los mecanismos implicados en la formación de memorias traumáticas.
- Los resultados observados 24 horas post-entrenamiento en el hipocampo, también apoyan la idea de que el entrenamiento en el condicionamiento del miedo con la intensidad de choque más elevada podría constituir un modelo de memoria.



---

traumática. De hecho, dicho entrenamiento indujo un incremento en la expresión de NCAM y L1, que sugiere la participación de dichas moléculas en la estabilización de sinapsis implicadas en el mantenimiento de la memoria de miedo.

- En lo que respecta al resto de las áreas cerebrales, cabe destacar que los resultados obtenidos 12 horas después del entrenamiento en el aprendizaje estresante leve (0,2 mA), tanto en la corteza frontal, como en la amígdala, sugieren la posible existencia de procesos de plasticidad sináptica, dada la existencia de un estado de polisialización incrementado (en ambas regiones), y de niveles de NCAM disminuidos en la amígdala.
- 24 horas después del entrenamiento, la forma polisializada de NCAM sigue un patrón de expresión bifásico en la corteza prefrontal y en el hipotálamo, en los diferentes grupos condicionados.
- Los resultados obtenidos en los estudios en los que se inyectó el inhibidor de la síntesis de corticosterona, metirapona, no apoyan la idea de que la corticosterona liberada durante el entrenamiento actúe como mediadora de la modulación de las CAMs inducida por el entrenamiento, al menos en lo que respecta a las alteraciones en la expresión de CAMs observadas en el hipocampo de animales entrenados en el condicionamiento del miedo bajo condiciones estresantes elevadas (1 mA).
- Sin embargo, dichos experimentos refuerzan la idea de que la liberación de corticosterona por el entrenamiento facilita los procesos de formación de memoria a largo plazo, extendiendo dicha posibilidad a la formación de memorias traumáticas.
- En esta Tesis, hemos replicado datos obtenidos en otros trabajos, en los que se mostró la existencia de una correlación entre los niveles plasmáticos de corticosterona liberados como consecuencia del entrenamiento en el CMC, y los niveles de miedo condicionado (que dependen de la intensidad de descarga eléctrica con que se entrenaron los animales en el CMC).
- En lo que respecta a los resultados obtenidos en el estudio de estrés crónico, podemos concluir que la exposición a un estrés mantenido de inmovilización durante 21 días (6 horas

---

diarias) induce una potenciación del condicionamiento del miedo al contexto, que se observa tanto en la fase de entrenamiento, como en la de retención.

- Dicho tratamiento de estrés crónico indujo un descenso en los niveles de NCAM en el hipocampo, que podría estar implicado en los procesos deletéreos que a nivel sináptico se han descrito en otros estudios a nivel de dicha estructura. Por el contrario, el incremento observado tanto en la polisialización de NCAM, como la tendencia de L1 a incrementar sus niveles, sugieren que dichas moléculas podrían participar en procesos de remodelamiento estructural de tipo compensatorio ante el daño neural inducido por el estrés crónico.
- El estrés crónico moduló la expresión de CAMs en otras áreas cerebrales. De particular interés por la implicación de esta área en el condicionamiento del miedo, son las alteraciones en dichas moléculas observadas a nivel de la amígdala, que registró una reducción tanto en los niveles de polisialización, como de L1, como consecuencia de la exposición crónica al estrés.
- El estrés crónico también indujo alteraciones en el contenido de las CAMs en otras regiones cerebrales, entre las que cabe destacar los descensos observados en la polisialización de NCAM en el hipotálamo y el estriado, así como en el contenido de NCAM en esta última región cerebral.
- En conjunto, los resultados del presente trabajo apoyan la modulación de las moléculas de adhesión celular en situaciones de estrés, tanto agudo, como crónico, y sugieren la posibilidad de que los cambios producidos en dichas moléculas como consecuencia del estrés participen en los mecanismos neurales implicados en diversas funciones cognitivas. Asimismo, los datos neuroendocrinos y conductuales de este estudio refuerzan las hipotetizadas acciones de los glucocorticoides sobre los procesos de formación de la memoria.

---

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

---

## BIBLIOGRAFIA

### A

---

Aaron L.I. y Chesselet M.F. (1989) Heterogeneous distribution of polysialylated neuronal cell adhesion molecule during post-natal development and in the adult: an immunohistochemical study in the rat brain. *Neuroscience*. **28**, 701-710.

Abel T y Kandel E. (1998) Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **26**, 360-378.

Abrous D.N., Montaron M.F., Petry K.G., Rougon G., Darnaudery M., Le Moal M y Mayo W. (1997) Decrease in highly polysialylated neuronal cell adhesion molecules and in spatial learning during ageing are not correlated. *Brain Res.* **744**, 285-292.

Acheson A., Sunshine J.L y Rutishauser U. (1991) NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J. Cell Biol.* **114**, 143-153.

Alcaraz G y Goridis C. (1991) Biosynthesis and processing of polysialylated NCAM by AtT-20 cells. *Eur. J. Cell Biol.* **55**, 165-173.

Alexis M., Stylianopoulou F., Kittraki E y Manz B. (1982) Glucocorticoid receptors in rat brain and pituitary. *Prog. Clin. Biol. Res.* **102**, 207-217.

Alexis M.N., Stylianopoulou F., Kittraki E y Sekeris C.E. (1983) The distribution and properties of the glucocorticoid receptor from rat brain and pituitary. *J. Biol. Chem.* **258**, 4710-4714.

Alvarez P., y Squire L.R. (1994) Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 7041-7045.

Anagnostaras S.G, Gale G.D y Fanselow M.S. (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*. **11**, 8-17.

Andersen P y Soleng A.F. (1998) Long-term potentiation and spatial training are both associated with the generation of new excitatory synapses. *Brain Res. Rev.* **26**, 353-359.

Angata K., Suzuki M y Fukuda M. (1998) Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX. *J. Biol. Chem.* **273**, 28524-28532.

Antelman S.M (1988) Stressor-induced sensitization to subsequent stress: implications for the development and treatment of clinical disorders. In Sensitization in the Central System (eds. Kalivas P.W y Barnes C.D, 227-259. *Academic Pres, New York*).

---

Aplin A.E., Howe A.K y Juliano R.L. (1999) Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 737-744.

Appel F., Holm J., Conscience J.F y Schachner M. (1993) Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in neurite outgrowth and cell body adhesion. *J. Neurosci.* **13**, 4764-4775.

Arami, S., Jucker M., Schachner M y Welzl H. (1996) The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial-learning in rats. *Behav. Brain Res.* **81**, 81-87.

Arce V., Gristina R., Buttiglione M., Cremer H., Gennarini G y Rougon G. (1996) Use of chimeric F3-NCAM molecules to explore the properties of VASE exon in modulating polysialylation and neurite outgrowth. *Cell. Adhes. Commun.* **3**, 541-554.

Arriza J.L., Weinberger C., Cerelli G y Glaser T.M., Handelin B.L., Housman D.E., y Evans R.M. (1987) Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* **237**, 268-275.

Atkins A.R, Chung J., Deechongkit S., Little E.B., Edelman G.M., Wright P.E., Cunningham B.A y Dyson H.J. (2001) Solution structure of the third immunoglobulin domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM: can solution studies define the mechanism of homophilic binding? *J. Mol. Biol.* **311**, 161-172.

Atkins A.R., Osborne M.J., Lashuel H.A., Edelman G.M., Wright P.E., Cunningham B.A y Dyson H.J. (1999) Association between the first two immunoglobulin-like domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *FEBS. Lett.* **21**; 451, 162-168.

Aubert I., Ridet J.L., Schachner M., Rougon G y Gage F.H. (1998) Expression of L1 and PSA during sprouting and regeneration in the adult hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* **399**, 1-19.

## **B**

---

Bahr B.A., Goldshall A.C., Murray B.A y Lynch G. (1993) Age-related changes in neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in the mouse telencephalon. *Brain Res.* **628**, 286-29.

Bailey C.H y Kandel ER. (1993) Structural changes accompanying memory storage *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 397-426.

Bailey C.H., Bartsch D y Kandel E.R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13445-13452.

---

Bailey C.H., Chen M., Keller F y Kandel E.R. (1992) Serotonin mediated endocytosis of apCAM: an early step of learning and memory-related synaptic growth in *Aplysia*. *Science* **258**, 645-648.

Baldwin T.J., Fazeli M.S y Doherty P (1996) Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules. *J. Cell Biochem.* **61**, 502-513.

Barbas J.A., Chix J.C., Steinmetz M y Goridis C. (1986) Differential splicing and alternative polyadenylation generates distinct NCAM transcripts and proteins in the mouse. *EMBO J.* **7**, 625-632.

Barbeau D., Liang J.J., Robitalille Y., Quirion R y Srivastava L.K. (1995) Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 2785-2789.

Barthels D., Vopper G y Wille W. (1988) NCAM-180, the large isoform of the neural cell adhesion molecule of the mouse, is encoded by an alternatively spliced transcript. *Nucleic. Acids Res.* **16**, 4217-4225.

Bateman A., Jouet M., MacFarlane J., Du J.S., Kenwick S y Chothia C. (1996) Outline structure of the human L1 cell adhesion molecule and the sites where mutations cause neurological disorders. *EMBO J.* **15**, 6050-6059.

Baunez C., Nieoullon A y Amalric M. (1994) N-methyl-D-aspartate receptor blockade impairs behavioural performance of rats in a reaction time task: new evidence for glutamatergic-dopaminergic interactions in the striatum. *Neuroscience.* **61**, 521-531.

Becker C.G., Artola A., Gerardy-Schahn R., Becker T., Welzl H y Schachner M. (1996) The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* **45**, 143-152.

Becker C.G., Becker T., Schmidt A y Roth G. (1994) Polysialic acid expression in the salamander retina is inducible by thyroxine. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **79**, 140-146.

Bennett MR. (2000) The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog. Neurobiol.* **60**, 109-137.

Berardi M., Hindelang C., Felix J.M y Stoeckel M.E. (1999) L1 and laminin: their expression during rat hypophysis ontogenesis and in adult neurohemal areas *Int. J. Dev. Neurosci.* **17**, 121-130.

Bjerregaard A, Jorgensen OS. (1994) Ontogeny of the cell adhesion molecule L1 in the cerebellum of weaver and reeler mutant mice. *Neurochem. Res.* **19**, 789-793.

Bliss T., Errington M., Fransen E., Godfraind J., Kauer J.A., Kooy R.F., Maness P.F y Furley A.J. (2000) Long-term potentiation in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr. Biol.* **10**, 1607-1610.

---

Bliss T.V.P y Collingridge G. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. **361**, 31-39.

Bliss T.V.P y Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**, 331-356.

Bock E., Edvardsen K., Gibson A., Linnemann D., Lyles J.M y Nybroe O. (1987) Characterization of soluble forms of NCAM. *FEBS. Lett.* **10**, 225, 33-36.

Bock E., Richter-Landsberg C., Faissner A y Schachner M. (1985) Demonstration of immunochemical identity between the nerve growth factor-inducible large external (NILE) glycoprotein and the cell adhesion molecule L1. *EMBO J.* **4**, 2765-2768.

Bodnoff S.R., Humphreys A.G., Lehman J.C., Diamond D.M., Rose G.M y Meaney M.J. (1995) Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J. Neurosci.* **15**, 61-69.

Bonfanti L y Theodosis D.T. (1994) Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience.* **62**, 291-305.

Bonfanti L., Olive S., Poulain D.A y Theodosis D.T. (1992) Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience* **49**, 419-436.

Borski R.J. (2000) Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 427-436.

Bouzioukh F., Tell F., Jean A y Rougon G. (2001) NMDA receptor and nitric oxide synthase activation regulate polysialylated neural cell adhesion molecule expression in adult brainstem synapses. *J. Neurosci.* **21**, 4721-4730.

Bowman R.E., Zrull MC y Luine V.N. (2001) Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. *Brain Res.* **904**, 279-289.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.

Breen K.C y Regan C.M. (1988a) Differentiation-dependent sialylation of individual neural cell adhesion molecule polypeptides during postnatal development. *J. Neurochem.* **50**, 712-716.

Breen K.C y Regan C.M. (1988b) Developmental control of N-CAM sialylation state by Golgi sialyltransferase isoforms. *Development.* **104**, 147-154.

---

Bremner J.D., Krystal J.H., Southwick S.M y Charney D.S. (1995) Functional neuroanatomical correlates of the effects of stress on memory. *J. Trauma Stress.* **8**, 527-253.

Brezun J.M y Daszuta A. (2000) Serotonergic reinnervation reverses lesion-induced in PSA-NCAM labeling and proliferation of hippocampal cells in adult rats. *Hippocampus.* **10**, 37-46.

Brown E.S., Rush A.J y McEwen B.S. (1999) Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacology.* **21**, 474-484.

Brümmendorf T y Lemmon V. (2001) Immunoglobulin superfamily receptors: *cis*-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 611-668.

Brümmendorf T y Rathjen F.G. (1995) Cell adhesion molecules: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile.* **2**, 963-108.

Brümmendorf T., Kenwrick S y Rathjen F.G. (1998) Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 87-97.

Bruses J.L, y Rutishauser U. (1998) Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation: evidence for nontranscriptional control and sensitivity to an intracellular pool of calcium. *J. Cell Biol.* **140**, 1177-1186.

Bruses J.L., Oka S y Rutishauser U. (1995) NCAM-associated polysialic acid on ciliary ganglion neurons is regulated by polysialyltransferase levels and interaction with muscle. *J. Neurosci.* **15**, 8310-8319.

Butler A.K., Uryu K y Chesselet M.F. (1998) A role for N-methyl-D-aspartate receptors in the regulation of synaptogenesis and expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *Dev. Neurosci.* **20**, 253-262.

Butler A.K., Uryu K., Morehouse V., Rougon G y Chesselet M.F. (1997) Regulation of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum: effects of cortical lesions. *J. Comp. Neurol.* **389**, 289-308.

Butler A.K., Uryu K., Rougon G y Chesselet M.F. (1999) N-methyl-D-aspartate receptor blockade affects polysialylated neural cell adhesion molecule expression and synaptic density during striatal development. *Neuroscience.* **89**, 1169-1181.

## C

---

Cahill L y McGaugh J.L. (1996) Modulation of memory storage. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 237-242.



---

Cahill L., Babinsky R., Markowitsch H.J y McGaugh J.L. (1995) The amygdala and emotional memory. *Nature*. **377**, 295-296.

Cahill L., McGaugh J.L y Weinberger N.M. (2001) The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci*. **24**, 578-581.

Cahill L., Vazdarjanova A y Setlow B. (2000) The basolateral amygdala complex is involved with, but is not necessary for rapid acquisition of Pavlovian 'fear conditioning'. *Eur. J. Neurosci*. **12**, 3044-3050.

Cahill L., Weinberger N.M., Roozendaal B y McGaugh J.L. (1999) Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. *Neuron*. **23**, 227-228.

Calvo N., Martijena I.D., Molina V.A y Volosin M. (1998) Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress. *Brain Res*. **800**, 227-235.

Calza L., Giardino L y Ceccatelli S. (1993) NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *Neuroreport* **4**, 627-630.

Canteras N.S., Simerly R.B y Swanson L.W. (1992) Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol*. **324**, 143-179.

Carew, T.J y Shaley C.J. (1986) Invertebrate learning and memory: from behavioral to molecules. *Ann. Rev. Neuroscience*. **9**, 435-487.

Castellano C y Puglisi-Allegra S. (1983) Strain-dependent modulation of memory by stress in mice. *Behav. Neural Biol*. **38**, 133-138.

Chen A., Haines S., Maxson K y Akeson R.A. (1994) VASE exon expression alters NCAM-mediated cell-cell interactions. *J. Neurosci. Res*. **38**, 483-492.

Chen A., Reyes A y Akeson R. (1990) Transcription initiation sites and structural organization of the extreme 5' region of the rat neural cell adhesion molecule gen. *Mol. Cell Biol*. **10**, 3314-3324.

Chen S., Mantei N., Dong L y Schachner M. (1999) Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J. Neurobiol*. **38**, 428-439.

Chung W.W., Lagenaur C.F., Yan Y.M y Lund J.S. (1991) Developmental expression of neural cell adhesion molecules in the mouse neocortex and olfactory bulb. *J. Comp. Neurol*. **314**, 290-305.

Cintra A., Bhatnagar M., Chadi G., Tinner B., Lindberg J., Gustafsson J.A., Agnati L.F y Fuxe K. (1994a) Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. **746**, 42-61.

---

Cintra A., Zoli M., Rosen L., Agnati L.F., Okret S., Wikstrom A.C., Gustaffsson J.A y Fuxe K. (1994b) Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. *Neuroscience*. **62**, 843-897.

Clairbone B. J., Amaral D.G y Cowan W. H. (1986) A light microscopic analysis of the mossy fibres of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* **246**, 435-458.

Close B.E y Colley K.J. (1998) *In vivo* autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. *J. Biol. Chem.* **273**, 34586-34593.

Conrad C.D., Galea L.A., Kuroda Y y McEwen B.S. (1996) Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav. Neurosci.* **110**, 1321-1334.

Conrad C.D., LeDoux J.E., Magarinos A.M y McEwen B.S. (1999) Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav. Neurosci.* **113**, 902-913.

Cordero M.I y Sandi C. (1998) A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. *Brain Res.* **786**, 11-17.

Cordero M.I., Merino J.J y Sandi C. (1998) Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* **112**, 885-891.

Cordero. M.I. Kruyt, N.D y Sandi C. (1999) Chronic stress induces differential effects in two hippocampus-dependent tasks, **31<sup>st</sup> Annual General Meeting of the European Brain and Behaviour Society (EBBS)**.

Coughlan C.M y Breen KC. (1998) Glucocorticoid induction of the alpha 2,6 sialyltransferase enzyme in a mouse neural cell line. *J. Neurosci Res.* **51**, 619-626.

Coughlan CM, Seckl JR y Breen KC. (1996) The expression of neural cell sialoglycoproteins following glucocorticoid regulation of sialyltransferase activity in vivo. *Cell Mol. Neurobiol.* **16**, 433-438.

Coutelle O., Nyakatura G., Taudien S., Elgar G., Brenner S., Platzer M., Drescher B., Jouet M., Kenwrick S., y Rosenthal A. (1998) The neural cell adhesion molecule L1: genomic organization and differential splicing is conserved between man and the *pufferfish Fugu*. *Gene*. **208**, 7-15.

Covault J y Sanes J.R. (1985) Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **82**, 4544-4548.

Creighton T.E. (1995) Protein structure: a practical approach. *Ed IRL press*.

---

Cremer H., Chazal G., Carleton A., Goridis C., Vincent J.D y Lledo P.M. (1998) Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 13242-13247.

Cremer H., Chazal G., Lledo P.M., Rougon G., Montaron M.F., Mayo W., Le Moal M y Abrous D.N ( 2000) PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18**, 213-220.

Cremer H., Lange R., Christoph A., Plomann M., Vopper G., Roes J., Brown R., Baldwin S., Kraemer P y Scheff S. (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* **367**, 455-459.

Crossin K.L y Krushell L.A. (2000) Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn.* **218**, 260-279.

Cunningham B.A., Hemperly J.J., Murray B.A., Prediger E.A., Brackenbury R y Edelman G.M. (1987) Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science.* **236**, 799-806

## D

---

D'Eustachio P., Owens G.C., Edelman G.M y Cunningham B.A. (1985) Chromosomal location of the gene encoding the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **82**, 7631-7635.

D'Hooge y Deyn P.P (2001) Applications of the Morris Water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* **36**, 60-90.

Dahme M., Bartsch U., Martini R., Anliker B., Schachner M y Mantei N. (1997) Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat. Genet.* **17**, 346-349.

Dalmaz C, Introini-Collison IB y McGaugh JL. (1993) Noradrenergic and cholinergic interactions in the amygdala and the modulation of memory storage. *Behav. Brain Res.* **58**, 167-174.

Davis J.Q., McLaughlin T y Bennett V. (1993) Ankyrin-binding proteins related to the nervous system cell adhesion molecules: candidates to provide transmembrane and intercellular connections in adult brain. *J. Cell Biol.* **121**, 121-133.

De Angelis E., MacFarlane J., Du J.S., Yeo G., Hicks R., Rathjen F.G., Kenwrick S y Brümmendorf T. (1999) Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *EMBO J.* **18**, 4744-4753.

---

de Kloet E.R., Oitzl M.S y Jöels M. (1999) Stress and cognition, are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* **22**, 422-426.

De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S y Joels M. (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* **19**, 69-301.

De Kloet R. (1990) Corticosteroids and the brain. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **37**, 387-394.

Deak T., Nguyen K.T., Cotter C.S., Fleshner M., Watkins L.R., Maier S.F y Spencer R.L. (1999a) Long-term changes in mineralocorticoid and glucocorticoid receptor occupancy following exposure to an acute stressor. *Brain Res.* **847**, 211-220.

DeBernardo A.P y Chang S. (1996) Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-Ng-CAM interactions involved in neurite extension. *J. Cell. Biol.* **133**, 657-666.

Demyanenko G.P., Shibata Y., Maness P.F. (2001) Altered distribution of dopaminergic neurons in the brain of L1 null mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **31**, 21-30.

Demyanenko G.P., Tsai A.Y y Maness P. (1999) Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J. Neurosci.* **19**:4 907-920.

Dhabhar F.S., McEwen B.S y Spencer R.L. (1993) Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin levels, a comparison between *Sprague-Dawley*, *Fischer 344* and *Lewis* rats. *Brain Res.* **616**, 89-98.

Diederich S., Grossmann C., Hanke .B, Quinkler. M, Herrmann. M, Bah.r V y Oelkers W (2000) In the search for specific inhibitors of human 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenases (11 $\beta$ -HSDs): chenodeoxycholic acid selectively inhibits 11-  $\beta$ -HSD. *Eur. J. Endocrinol.* **142**, 200-207.

DiFiglia M., Marshall P., Covault J y Yamamoto M. (1989) Ultrastructural localization of molecular subtypes of immunoreactive neural cell adhesion molecule (NCAM) in the adult rodent striatum. *J. Neurosci.* **9**, 4158-4168.

Doherty P y Walsh F.S. (1996a) CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol. Cell Neurosci.* **8**, 99-111.

Doherty P., Fazeli M.S y Walsh F.S. (1995a) The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J. Neurobiol.* **26**, 437-446.

Doherty P., Fruns M., Seato P., Dickson G., Barton C.H., Sears T.A y Walsh F.A. (1990) A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* **343**, 464-466.

Doherty P., Moolenaar C.E., Ashton S.V., Michalides R.J y Walsh F.S. (1992) The VASE exon downregulates the neurite growth-promoting activity of NCAM 140. *Nature.* **356**, 791-793.

---

Doherty P., Williams E y Walsh F.S. (1995b) A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron*. **14**, 57-66

Doyle E., Bell R y Regan C.M. (1992a) Hippocampal NCAM180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in the adult rat. *J. Neurosci. Res.* **31**, 513-523.

Doyle E., Nolan P.M., Bell R y Regan C.M (1992b) Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat. *J. Neurochem.* **59**, 1570-1573.

Doyle E., O'Boyle K.M., Shiotani T y Regan C.M. (1996) Nefiracetam (DM-9384) reverses apomorphine-induced amnesia of a passive avoidance response: delayed emergence of the memory retention effects. *Neurochem. Res.* **21**, 649-652.

Dubois C., Okandze A., Figarella-Branger D., Rampini C y Rougon G. (1995) A monoclonal antibody against Meningococcus group B polysaccharides used to immunocapture and quantify polysialylated NCAM in tissues and biological fluids. *J. Immunol Methods.* **181**, 125-135.

Dudai Y., Jan Y.N., Byers D., Quinn W.G y Benzer S. (1976) Dunce, a mutant *Drosophila melanogaster* deficient in learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1684-1688.

Dzhandzhugazyan K y Bock E. (1997) Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding. *Biochemistry.* **36**, 15381-15395.

Dzhandzhugazyan K, Bock E. (1993) Demonstration of (Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>)-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett.* **336**, 279-283.

## E

---

Eckhardt M., Bukalo O., Chazal G., Wang L., Goridis C., Schachner M., Gerardy-Schahn R., Cremer H y Dityatev A. (2000) Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SialV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **20**, 5234-5244.

Edelman G.M y Crossin K.L. (1991) Cell Adhesion Molecules: implications for a molecular histology. *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 155-190.

Edelman G.M y Jones F.S. (1998) Gene regulation of cell adhesion: a key step in neural morphogenesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **26**, 337-352.

---

Edelman G.M. (1984) Two antigenically related neuronal cell adhesion molecules of different specificities mediate neuron-neuron and neuron-glia adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 267-271.

Edelman G.M., Hoffman S., Chuong C.M., Thiery J.P., Brackenbury R., Gallin W.J., Grumet M., Greenberg M.E., Hemperly J.J y Cohen C. (1983) Structure and modulation of neural cell adhesion molecules in early and late embryogenesis. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **48**, 515-526.

Ehlers A y Clark D.M. (2000) A cognitive model of posttraumatic stress disorder. *Behav. Res. Ther.* **38**, 319-345.

Eichenbaum H. (1997) How does the brain organize memories?. *Science.* **277**, 330-332.

Eichenbaum H. (1999) Neurobiology. The topography of memory. *Nature.* **402**, 597-599.

Eichenbaum H., Schoenbaum G., Young B y Bunsey M. (1996) Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13500-13507.

Evans R.M y Arriza J.L. (1989) A molecular framework for the action of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron* **2**, 1105-1112.

## F

---

Faissner A., Kruse J., Nieke J y Schachner M. (1984) Expression of neural cell adhesion molecule L1 during development, in neurological mutants and in the peripheral nervous system. *Brain Res.* **317**, 69-82.

Faissner A., Teplow D.B., Kubler D., Keilhauer G., Kinzel V y Schachner M. (1985) Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1. *EMBO J.* **4**, 3105-3113.

Fanselow M.S. (1980) Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov. J. Biol. Sci.* **15**, 177-182.

Fazeli M.S., Breen K., Errington M.L y Bliss T.V.P. (1994) Increase in extracellular NCAM and amyloid precursors protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anesthetized rats. *Neurosci. Lett.* **169**, 77-80.

---

Feder H.H. (1981) Essentials of steroid structure, nomenclature, reactions, biosynthesis and measurements. N.T. Adler (ed) *Neuroendocrinology of Reproduction*. Plenum: New York.

Feder M.E y Hofmann G.E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 243-282.

Feldman S y Weidenfeld J. (1996) Involvement of amygdalar alpha adrenoceptors in hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses. *Neuroreport* **7**, 3055-3057.

Fendt M y Fanselow M.S. (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**, 743-760.

Ferrini M., Wang C., Swerdloff R.S, Sinha Hikim A.P., Rajfer J y Gonzalez-Cadavid N.F. (2001) Aging-related increased expression of inducible nitric oxide synthase and cytotoxicity markers in rat hypothalamic regions associated with male reproductive function. *Neuroendocrinology.* **74**, 1-11

Ferry B y McGaugh JL (2000) Role of amygdala norepinephrine in mediating stress hormone regulation of memory storage. *Acta Pharmacol. Sin.* **21**, 481-493.

Fields R.D e Itoh K. (1996) Neural cell adhesion molecule in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **19**, 473-480.

Finne J., Finne U., Deagostini-Bazin H y Goridis C. (1983) Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 482-487.

Fletcher P.C., Shallice T., Frith C.D., Frackowiak R.S, y Dolan RJ. (1996) Brain activity during memory retrieval. The influence of imagery and semantic cueing. *Brain.* **119**, 1587-1596.

Foley A.G., Hartz B.P., Gallagher H.C., Ronn L.C., Berezin V., Bock E y Regan C.M. (2000) A synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule (NCAM) Ig I domain prevents NCAM internalization and disrupts passive avoidance learning. *J. Neurochem.* **74**, 2607-2613.

Fox G.B., Fichera G., Barry T., O'Connell A.W., Gallagher H.C., Murphy K.J y Regan CM. (2000) Consolidation of passive avoidance learning is associated with transient increases of polysialylated neurons in layer II of the rat medial temporal cortex. *J. Neurobiol.* **45**, 135-141.

Fox G.B., Kennedy N., Regan C.M. (1995b) Polysialylated neural cell adhesion molecule expression by neurons and astroglial processes in the rat dentate gyrus declines dramatically with increasing age. *Int. J. Dev. Neurosci.* **13**, 663-672.

Fox G.B., Kjoller C., Murphy K.J y Regan C.M. (2001) The modulations of NCAM polysialylation state that follow transient global ischemia are brief on neurons but enduring on glia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 132-140.

---

Fox G.B., O'Connell A.W., Murphy K.J y Regan C.M. (1995a) Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus. *J. Neurochem.* **65**, 2796-2799.

Fredette B., Rutishauser U y Landmesser L. (1993) Regulation and activity-dependence of N-cadherin, NCAM isoforms, and polysialic acid on chick myotubes during development. *J. Cell Biol.* **123**, 1867-1888.

Frei T., von Bohlen Halbach F., Wille W y Schachner M. (1992) Different extracellular domains of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) are involved in different functions. *J. Cell Biol.* **118**, 177-194.

Friedlander D.R., Milev P., Karthikeyan L., Margolis R.K., Margolis R.U y Grumet M. (1994) The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion molecules. *J. Cell. Biol.* **113**, 139-1412.

Fucks E y Flugge G. (1998) Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus. *Neurosci. and Biochem. Rev.* **23**, 295-300.

Fuster J.M. (2000) Memory networks in the prefrontal cortex. *Prog Brain Res.* **122**, 309-316.

Fuxe K., Cintra A., Harfstrand A., Agnati L.F., Kalia M., Zoli M., Wikstrom A.C., Okret S., Aronsson M y Gustafsson J.A. (1987) Central glucocorticoid receptor immunoreactive neurons: new insights into the endocrine regulation of the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci. U.S.A.* **512**, 362-393.

## G

---

Gallagher H.C., Murphy K.J., Foley A.G y Regan C.M. (2001) Protein kinase C delta regulates neural cell adhesion molecule polysialylation state in the rat brain. *J. Neurochem.* **77**, 425-434.

Gallagher H.C., Odumeru O.A y Regan C.M. (2000) Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation state by cell-cell contact and protein kinase C delta. *J. Neurosci. Res.* **61**, 636-645.

Ganong W.F., Alpert L.C y Lee T.C. (1974) ACTH and the regulation of adrenocortical secretion. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1006-1011.

Garcia A., Marti O., Valles A., Dal-Zotto S y Armario A. (2000) Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology.* **72**, 114-125.



- 
- Garcia R. (2001) Stress, hippocampal plasticity, and spatial learning. *Synapse*. **40**, 180-183.
- Garcia R., Paquereau J., Vouimba R.M., y Jaffard R. (1998) Footshock stress but not contextual fear conditioning induces long-term enhancement of auditory-evoked potentials in the basolateral amygdala of the freely behaving rat. *Eur. J. Neurosci*. **10**, 457-463.
- Garcia R., Vouimba R.M., Baudry M y Thompson R.F. (1999) The amygdala modulates prefrontal cortex activity relative to conditioned fear. *Nature* **402**, 294-296.
- Garcia-Segura L.M., Canas B., Parducz A., Rougon G., Theodosis D., Naftolin F y Torres-Aleman I. (1995) Estradiol promotion of changes in the morphology of astroglia growing in culture depends on the expression of polysialic acid of neural membranes. *Glia*. **13**, 209-216.
- Gegelashvili G., Yersson A.M., Schousboe A y Bock E. (1993) Characterization of NCAM diversity in cultured neurons. *FEBS. Lett.* **324**, 337-340.
- Georgopoulou N y Breen K.C. (1999) Overexpression of the alpha 2,6 (N) sialyltransferase enzyme in human and rat neural cell lines is associated with increased expression of the polysialic acid epitope. *J. Neurosci. Res.* **58**, 641-651.
- Gillner M., Dong Y., Fuxe K y Cintra A (1987) Biochemistry, molecular biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocr. Rev.* **8**, 185-234.
- Goldowitz D., Barthels D., Lorenzon N., Jungblut A y Wille W. (1990) NCAM gene expression during the development of cerebellum and dentate gyrus in the mouse. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* **52**, 151-160.
- Good M y Honey R. (1997). Dissociable effects of selective lesions to hippocampal subsystem on exploratory behavior, contextual learning, and spatial learning. *Behav. Neurosci.* **111**, 487-493.
- Goosens K.A., Holt W y Maren S. (2000) A role for amygdaloid PKA and PKC in the acquisition of long-term conditional fear memories in rats. *Behav. Brain Res.* **114**, 145-152.
- Goridis C., Joher M.A., Horrsch M y Schachner M. (1978) Cell surface proteins of cultured brain cells and their recognition by anti-cerebellum (anti-NS-4) antiserum. *J. Neurochem.* **31**, 531-539.
- Grant N.J., Claudepierre T., Aunis D y Langley K. (1996) Glucocorticoids and nerve growth factor differentially modulate cell adhesion molecule L1 expression in PC12 cells. *J. Neurochem.* **66**, 1400-1408.
- Grollman E.F., Saji M., Shimura Y., Lau J.T y Ashwell G. (1993) Thyrotropin regulation of sialic acid expression in rat thyroid cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 3604-3609.

---

Grumet M y Edelman G.M. (1988) Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms. *J. Cell Biol.* **106**, 487-503.

Grumet M., Flaccus A y Margolis R.U. (1993a) Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. *J. Cell. Biol.* **120**, 815-824.

Grumet M., Friedlander D.R y Edelman G.M. (1993b) Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes.and Commun.* **1**, 177-190.

Grumet M., Rutishauser U y Edelman G.M. (1982) Neural cell adhesion molecule is on embryonic muscle cells and mediates adhesion to nerve cells in vitro. *Nature.* **295**, 693-69.

## H

---

Hai-Tao He, Finne J y Goridis C. (1987) Biosynthesis, membrane association, and release of NCAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule. *J. Cell. Biol.* **105**, 2490-2500.

Hall H., Walsh F.S y Doherty P. (1996) A role for the FGF receptor in the axonal growth response stimulated by cell adhesion molecules?. *Cell. Adhes. Commun.* **3**, 441-450.

Hall L.A y Gold E (1986). The effects of training, epinephrine, and glucose injections on plasma glucose levels in rats. *Behav. Neural Biol.* **46**, 156-167.

Hatfield T y McGaugh J.L. (1999) Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol. Learn. Mem.* **71**, 232-239.

Hebb D.O. (1976) Physiological learning theory. *J. Abnorm. Child. Psychol.* **4**, 309-314.

Heiland P.C., Griffith L.S., Lange R., Schachner M., Hertlein B., Traub O y Schmitz B. (1998) Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth. *Eur. J. Cell Biol.* **75**, 97-106.

Helmstetter F.J. (1992) Contribution of the amygdala to learning and performance of conditional fear. *Physiol. Behav.* **51**, 1271-1276.

Herman J.P y Cullinan W.E. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* **20**, 78-84.

---

Herman J.P y Spencer R. (1998) Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vivo. *J. Neurosci.* **18**, 7462-7473.

Hermann J.P., Adams D y Prewitt C. (1995) Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* **61**, 180-190.

Hildebrandt H., Becker C., Gluer S., Rosner H., Gerardy-Schahn R y Rahmann H. (1998) Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth. *Cancer Res.* **58**, 779-784.

Hoffman K.B., Kessler M y Lynch G. (1997) Sialic acid residues indirectly modulate the binding properties of AMPA-type glutamate receptors. *Brain Res.* **753**, 309-314.

Hoffman K.B., Larson J., Bahr B.A y Lynch G. (1998) Activation of NMDA receptors stimulates extracellular proteolysis of cell adhesion molecules in hippocampus. *Brain Res.* **811**, 152-155.

Hoffman S y Edelman G.M. (1983) Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 5762-5766.

Hoffman S y Edelman G.M. (1984) The mechanism of binding of neural cell adhesion molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.* **181**, 147-160.

Holm J., Appel F y Schachner M. (1995) Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in homophilic interactions. *J. Neurosci. Res.* **42**, 9-20.

Holm J., Hillenbrand R., Steuber V., Bartsch U., Moos M., Lubbert H., Montag D y Schachner M. (1996) Structural features of a close homologue of L1 (CHL1) in the mouse: a new member of the L1 family of neural recognition molecules. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1613-1629.

Holst B.D., Vanderklish P.W., Krushel L.A., Zhou W., Langdon R.B., McWhirter J.R., Edelman G.M y Crossin K.L. (1998) Allosteric modulation of AMPA-type glutamate receptors increases activity of the promoter for the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2597-2602.

Horger B.A y Roth R.H. (1996) The role of mesoprefrontal dopamine neurons in stress. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**, 395-418.

Horstkorte R., Schachner M., Magyar J.P., Vorherr T y Schmitz B. (1993b) The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* **121**, 1409-1421.

Hortsch M, O'Shea K.S., Zhao G., Kim F., Vallejo Y y Dubreuil R.R. (1998) A conserved role for L1 as a transmembrane link between neuronal adhesion and membrane cytoskeleton assembly. *Cell. Adhes. Commun.* **5**, 61-73.

---

Hortsch M. (1996) The L1 family of neural adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* **17**, 487-593.

Hortsch M. (2000) Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 1-10.

Hoyk Z., Parducz A y Theodosios D.T. (2001) The highly sialylated isoform of the neural cell adhesion molecule is required for estradiol-induced morphological synaptic plasticity in the adult arcuate nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 649-656.

Hu H., Tomasiewicz H., Magnuson T y Rutishauser U. (1996) The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron.* **16**, 735-743.

Hulley P., Schachner M y Lubbert H. (1998) L1 neural cell adhesion molecule is a survival factor for fetal dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* **53**, 129-134.

Hunkapiller T y Hood L. (1989) Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv. Immunol.* **44**, 1-63.

## I

---

Ibsen S., Berezin V., Norgaard-Pedersen B y Bock E. (1983) Enzyme-linked immunoabsorbent assay of the D<sub>2</sub>-glycoprotein. *J. Neurochem.* **41**, 356-362.

Isovich E., Mijster M.J., Flugge G y Fuchs E. (2000) Chronic psychosocial stress reduces the density of dopamine transporters. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1071-1078.

Itoh K., Sakurai Y., Asou H y Umeda M. (2000) Differential expression of alternatively spliced neural cell adhesion molecule L1 isoforms during oligodendrocyte maturation. *J. Neurosci. Res.* **60**, 579-586.

Izquierdo I., Medina J.H., Vianna M.R., Izquierdo L.A y Barros D.M. (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.* **103**, 1-11.

Izquierdo I y Medina J.H. (1997) Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learning and memory.* **68**, 285-316.

---

## J

---

Jacobson K.A., Moore S.E., Yang B., Doherty P., Gordon G.W y Walsh F.S. (1997) Cellular determinants of the lateral mobility of neural cell adhesion molecules. *Biochem. Biophys Acta.* **1330**, 138-144.

Jacobson L y Sapolsky R. (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.* **12**, 118-134.

Joels M y De Kloet R. (1992) Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *TINS.* **15**, 25-30.

Johnson E.O., Kamilaris T.C., Chrousos G.P y Gold P.W. (1992) Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci and Biobehav. Rev.* **16**, 115-130.

Jorgensen O.S, Bock E., Bech P y Rafaelsen O.J. (1977) Synaptic membrane protein D2 in the cerebrospinal fluid of manic-melancholic patients. *Acta Psychiatr. Scand.* **56**, 50-56.

Jorgensen O.S. (1995) Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochemical Res.* **20**, 533-547.

Jorgensen O.S., Hansen L.I., Hoffman S.W., Fulop Z y Stein D.G. (1997) Synaptic remodeling and free radical formation after brain contusion injury in the rat. *Exp. Neurol.* **144**, 326-338.

Jucker M., D'Amato F., Mondadori C., Mohajeri H., Magyar J., Bartsch U y Schachner M. (1996) Expression of the neural adhesion molecule L1 in the deafferented dentate gyrus. *Neuroscience.* **75**, 703-715.

## K

---

Kadmon G y Altevogt P. (1997) The cell adhesion molecule L1: species- and cell-type-dependent multiple binding mechanisms. *Differentiation* **61**, 143-150.

Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P y Schachner M. (1990b) The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* **110**, 193-208.

---

Kadmon G., Kowitz A., Alteogt P y Schachner M. (1990a) Functional cooperation between the neural cell adhesion molecule L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J. Cell. Biol.* **110**, 209-218.

Kamiguchi H., Long K.E., Pendergast M., Schaefer A.W., Rapoport I., Kirchhausen T y Lemmon V. (1998) The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J. Neurosci.* **18**, 5311-5322.

Kasper C., Rasmussen H., Berezin V., Bock E y Larsen I.K. (1999) Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the two amino-terminal Ig domains of the neural cell adhesion molecule (NCAM) *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **55**, 1598-1600.

Kasper C., Rasmussen H., Kastrup J.S., Ikemizu S., Jones E.Y., Berezin V., Bock E y Larsen I.K. (2000) Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 389-393.

Keilhauer G., Faissner A y Schachner M. (1985) Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature.* **316**, 728-730.

Kenwrick S y Doherty P (1998) Neural cell adhesion molecule L1: relating disease to function. *Bioessays.* **20**, 668-675.

Kenwrick S., Watkins A y Angelis E.D. (2000) Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 879-886.

Killcross S., Robbins T.W y Everitt B.J. (1997) Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature.* **388**, 377-380.

Kim D.H., Jung J.S., Kim H.S., Suh H.W., Son B.K., Kim Y.H y Song D.K. (2000) Inhibition of brain protein kinase C attenuates immobilization stress-induced plasma corticosterone levels in mice. *Neurosci. Lett.* **291**, 69-72.

Kim J.J., Lee H.J., Han J.S., Packard M.G. (2001) Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J. Neurosci.* **21**, 5222-5228.

Kinoshita Y y Hato F. (2001) Cellular and molecular interactions of thymus with endocrine organs and nervous system. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **47**, 103-107.

Kiselov V.V, Berezin B., Maar T.E., Soroka V., Edvarsen K.E., Schousboe A y Bock E. (1997) The first immunoglobulin-like domain is involved in double-reciprocal interaction with the second immunoglobulin-like NCAM domain and in heparin binding. *J. Biol. Chemistry.* **272**, 10125-10134.

Kiss J.Z y Rougon G. (1997) Cell biology of polysialic acid. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 640-646.

---

Klauer K.C., Musch J y Naumer B. (2000) On belief bias in syllogistic reasoning. *Psychol. Rev.* **107**, 852-884.

Kojima N., Kono M., Yoshida Y., Tachida Y., Nakafuku M y Tsuji S. (1996) Biosynthesis and expression of polysialic acid on the neural cell adhesion molecule is predominantly directed by ST8Sia II/STX during in vitro neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* **271**, 22058-22062.

Kolkova K., Novitskaya V., Pedersen N., Berezin V y Bock E. (2000a) Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* **20**, 2238-2246.

Kolkova K., Pedersen N., Berezin V y Bock E. (2000b) Identification of an amino acid sequence motif in the cytoplasmic domain of the NCAM-140 kDa isoform essential for its neuritogenic activity. *J. Neurochem.* **75**, 1274-1282.

Kramer I., Hall H., Bleistein U y Schachner M. (1997) Developmentally regulated masking of an intracellular epitope of the 180 kDa isoform of the neural cell adhesion molecule NCAM. *J. Neurosci. Res.* **15**, 161-175.

Krog L y Bock E. (1992) Glycosilation of neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *APMIS. Suppl.* **27**, 53-70.

Krug M., Wagner M., Staak S y Smalla K.H. (1994) Fucose and fucose-containing sugar epitopes enhance hippocampal long-term potentiation in the freely moving rat. *Brain Res.* **643**, 130-135.

Kruglikov R.I., Orlova N.V y Getsova V.M. (1991) The noradrenaline and serotonin content in symmetrical parts of the normal rat brain and during learning and peptide administration. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P Pavlova.* **41**, 359-363.

Kucherer A., Faissner A y Schachner M. (1987) The novel carbohydrate epitope L3 is shared by some neural cell adhesion molecules. *J. Cell Biol.* **104**, 1597-1602.

Kudo M., Kitajima K., Inoue S., Shiokawa K., Morris H.R., Dell A y Inoue Y. (1996) Characterization of the major core structures of the alpha2->8-linked polysialic acid-containing glycan chains present in neural cell adhesion molecule in embryonic chick brains. *J. Biol. Chem.* **271**, 32667-32677.

Kuhn T.B., Stoeckli E.T., Condrau M.A., Rathjen F.G y Sonderegger P. (1991) Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4) *J. Cell. Biol.* **115**, 1113-1126.

Kunemund V., Jungalwala F.B y Fischer G., Chou D.K., Keilhauer G y Schachner M. (1988) The L2/HNK-1 carbohydrate of neural cell adhesion molecules is involved in cell interactions. *J. Cell Biol.* **106**, 213-223.

---

## L

---

Lahr G., Mayerhofer A., Bucher S., Barthels D., Wille W y Gratzl M. (1993) Neural cell adhesion molecules in rat endocrine tissues and tumor cells: distribution and molecular analysis. *Endocrinology* **132**, 1207-1217.

Lahrtz F., Horstkorte R., Cremer H., Schachner M y Montag D. (1997) VASE-encoded peptide modifies NCAM- and L1-mediated neurite outgrowth. *J. Neurosci Res.* **50**, 62-68.

Landmesser I.T., Dahm L., Tang J y Rutishauser U. (1990) Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron* **4**, 655-667.

Lanuza E., Martinez-Marcos A y Martinez-Garcia F. (1999) What is the amygdala? A comparative approach. *Trends Neurosci.* **22**, 207-208.

Le Gal La Salle., Rougon G y Valin A. (1992) The embryonic form of neural cell adhesion molecule in the rat hippocampus and its reexpression on glial cells following kainic-induced status epilepticus. *J. Neurosci.* **12**, 872-882.

LeDoux JE. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**,155-184.

LeDoux. J.E. (1992) Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr.Opin. Neurobiol.* **2**, 191-197.

Lee W, Watanabe M y Glass JD. (1995) Photoperiod affects the expression of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in the hypothalamus of the Siberian hamster. *Brain Res.* **690**, 64-72.

Lepage M., Habib R., Cormier H., Houle S y McIntosh (2000) Neural correlates of semantic associative encoding in episodic memory. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* **9**, 271-280.

Lindner J. (1983). *Nature* **305**, 427-430.

Linnemann D y Bock E. (1989) Cell adhesion molecules in neural development. *Dev. Neurosci.* **11**, 149-173.

Linnemann D y Skarsfelt T. (1994) Regional changes in the expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. *Neurobiol. Aging* **15**, 651-655.

Linnemann D., Gaardsvoll H., Olsen M y Bock (1993) Expression of NCAM mRNA and polypeptides in aging rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **11**, 71-81.



---

Linnemann D., Lyles J.M y Bock E. (1985) A developmental study of the biosynthesis of the neural cell adhesion molecule. *Dev. Neurosci.* **7**, 230-238.

Loscertales M., Rose S.P y Sandi C. (1997) The corticosteroid synthesis inhibitors metyrapone and aminoglutethimide impair long-term memory for a passive avoidance task in day-old chicks. *Brain Res.* **769**, 357-361.

Lowy M.T., Gault L y Yamamoto B.K. (1993) Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J. Neurochem.* **61**, 1957-1960.

Lupien S.J y McEwen B.S. (1997) The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **24**, 1-27.

Lupien S.J., de Leon M., de Santi S., Convit A., Tarshish C., Nair N.P., Thakur M., McEwen B.S., Hauger R.L y Meaney M.J. (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat. Neurosci.* **1**, 69-73.

Luthi A., Laurent J.P., Figurov A., Muller D y Schachner M. (1994) Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature.* **372**, 777-779.

Luthi A., Mohajeri H., Schachner M y Laurent J.P. (1996) Reduction of hippocampal long-term potentiation in transgenic mice ectopically expressing the neural cell-adhesion molecule L1 in astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **46**, 1-6.

Lyles J.M., Linnemann D y Bock E. (1984) Biosynthesis of the D2-cell adhesion molecule: post-translational modifications, intracellular transport, and developmental changes. *J. Cell Biol.* **99**, 2082-2091

## M

---

Magarinos A.M y McEwen B.S. (1995a) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience.* **69**, 89-98.

Magarinos A.M y McEwen B.S. (1995b) Stress-induced atrophy of apical dendrites CA3c neurons of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience.* **69**, 83-88.

Magariños A.M., Deslandes A y McEwen B.S. (1999) Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur. J. Pharmacol.* **371**, 113-122.

---

Magariños A.M., McEwen B.S., Flugge G y Fuchs E. (1996) Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J. Neurosci.* **16**, 3534-3540.

Magarinos A.M., Verdugo J.M y McEwen B.S. (1997) Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. Natl Acad. Sci..U.S.A.* **94**, 14002-14008.

Maguire T.M y Breen K.C. (1995) A decrease in neural sialyltransferase activity in Alzheimer's disease. *Dementia.* **6**, 185-190.

Maguire T.M., Coughlan C.M., Seckl J.R y Breen K.C. (1998) The effect of corticosteroids on serum sialyltransferase enzyme activities in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **379**, 23-28.

Maguire T.M., Thakore J., Dinan T.G., Hopwood S y Breen K.C. (1997) Plasma sialyltransferase levels in psychiatric disorders as a possible indicator of HPA axis function. *Biol. Psychiatry.* **41**, 1131-1136.

Maier S.F. (1990) The role of fear in mediating the shuttle escape learning deficit produced by inescapable shock. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Proc.* **16**, 137-150.

Malva J.O., Carvalho A.P y Carvalho C.M. (1998) Kainate receptors in hippocampal CA3 subregion: evidence for a role in regulating neurotransmitter release. *Neurochem. Int.* **32**, 1-6.

Maren S y Braudy M. (1995) Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **63**, 1-18.

Maren S y Fanselow M.S. (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron.* **16**, 237-240.

Maren S y Fanselow M.S. (1997b) Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* **67**, 142-149.

Maren S y Holt W. (2000) The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behav. Brain Res.* **110**, 97-108.

Maren S. (1999) Neurotoxic or electrolytic lesions of the ventral subiculum produce deficits in the acquisition and expression of Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav. Neurosci.* **113**, 283-290.

Maren S., Aharonov G y Fanselow M.S. (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav. Brain Res.* **88**, 261-274.

Martin, S.J. Grimwood P.D y Morris R.G.M. (2000) Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Ann. Rev. Neurosci.* **23**, 649-711.

---

Martini R y Schachner M. (1995) Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci.* **18**, 183-191.

Martini R y Schachner M. (1997) Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* **19**, 298-310.

Martini R., Xin Y y Schachner M. (1994) Restricted localization of L1 and N-CAM at sites of contact between Schwann cells and neurites in culture. *Glia* **10**, 70-74.

Martynov N.N y Bessonova O.A. (1984) Avoidance conditioning in rats following changes in activity of the noradrenergic and cholinergic systems of the brain. *Neurosci. Behav. Physiol.* **14**, 368-372.

Mayford M., Barzilai A., Keller A., Schauer K y Kandel E.R. (1992) Modulation of NCAM related adhesion molecules with long term synaptic plasticity in *Aplysia*. *Science* **256**, 638-644.

McEwen B.S y Magarinos A.M. (1997) Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **821**, 271-84.

McEwen B.S, y Sapolsky R.M. (1995) Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 205-216.

McEwen B.S. (1997) Possible mechanisms for atrophy of the human hippocampus. *Mol. Psychiatry.* **2**, 255-262.

McEwen B.S. (1998) Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.* **338**, 171-179.

McEwen B.S. (1999) Stress and the aging hippocampus. *Front. Neuroendocrinol.* **20**, 49-70.

McEwen B.S., Biron C.A., Brunson K.W., Bulloch K., Chambers W.H., Dhabhar F.S., Goldfarb R.H., Kitson R.P., Miller A.H., Spencer R.L y Weiss J.M (1997) The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain. Res. Brain Res. Rev.* **23**, 79-133.

McEwen B.S., de Leon M.J., Lupien S.J y Meaney M.J. (1999) Corticosteroids, the Aging Brain and Cognition. *Trends. Endocrinol. Metab.* **10**, 92-96.

McGaugh J.L y Cahill L. (1997) Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. *Behav. Brain Res.* **83**, 31-38.

McGaugh J.L y Izquierdo I. (2000) The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 208-210

---

McGaugh J.L., Cahill L y Roozendaal B. (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13508-135014.

McGaugh J.L. (1989) Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 55-87.

McGaugh J.L. (1999) The perseveration-consolidation hypothesis: Mueller and Pilzecker, 1900. *Brain Res Bull.* **50**, 445-446.

McGaugh J.L. (2000) Memory, a century of consolidation. *Science.* **287**, 248-51

McKittrick C.R., Magarinos A.M., Blanchard D.C., Blanchard R.J., McEwen B.S, y Sakai R.R. (2000) Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse.* **36**, 85-94.

Meaney M.J., Sapolsky R.M y McEwen B.S. (1985a) The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. II. An autoradiographic study. *Brain Res.* **350**, 165-168.

Meaney M.J., Sapolsky R.M., Aitken D.H y McEwen B.S. (1985b) [<sup>3</sup>H] dexamethasone binding in the limbic brain of the fetal rat. *Brain Res.* **355**, 297-300.

Medina J.H., Schroder N e Izquierdo I. (1999) Two different properties of short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.* **103**, 119-121.

Mikkonen M., Soininen H., Kalvianen R., Tapiola T., Ylinen A., Vapalahti M., Paljarvi L y Pitkanen A. (1998) Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Ann. Neurol.* **44** , 923-934.

Mikkonen M., Soininen H., Tapiola T., Alafuzoff I y Miettinen R. (1999) Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 1754-1764.

Miller E.K. (2000) The prefrontal cortex and cognitive control. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 59-65.

Miller P.D., Chung W.W., Lagenaur C.F y DeKosky S.T. (1993) Regional distribution of neural cell adhesion molecule (N-CAM) and L1 in human and rodent hippocampus. *J. Comp Neurol.* **327**, 341-349.

Miñana R., Duran J.M., Tomas M., Renau-Piqueras J y Guerri C. (2001) Neural cell adhesion molecule is endocytosed via a clathrin-dependent pathway. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 749-756.

Miragall F., Kadmon G y Schachner M. (1989) Expression of L1 and N-CAM cell adhesion molecules during development of the mouse olfactory system. *Dev. Biol.* **135**, 272-286.

---

Miragall F., Kadmon G., Husmann M y Schachner M. (1988) Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: presence of the embryonic form of N-CAM. *Dev. Biol.* **129**, 516-531.

Miura R., Ethell I.M y Yamaguchi Y. (2001) Carbohydrate-protein interactions between HNK-1-reactive sulfoglucuronyl glycolipids and the proteoglycan lectin domain mediate neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *J. Neurochem.* **76**, 413-424.

Moghaddam B., Bolinao M.L., Stein-Behrens B y Sapolsky R. (1994) Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res.* **655**, 251-254.

Montaron M.F., Petry K.G., Rodriguez J.J., Marinelli M., Arousseau C., Rougon G., Le Moal M y Abrous D.N. (1999) Adrenalectomy increases neurogenesis but not PSA-NCAM expression in aged dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 1479-1485.

Moore F.L y Orchinik M. (1994) Membrane receptors for corticosterone: a mechanism for rapid behavioral responses in an amphibian. *Horm. Behav.* **28**, 512-529.

Moore H, Rose H, y Grace AA. (2001) Chronic cold stress reduces the spontaneous activity of ventral tegmental dopamine neurons. *Neuropsychopharmacology* **24**, 410-419.

Moos M., Tacke R., Scherer H., Teplow D., Fruh K y Schachner M. (1988) Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* **334**, 701-703.

Morales G., Hubbert M., Brummendorf T., Treubert U., Tarnok A., Schwart U y Ratjhen F.G (1993) Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* **11**, 1113-1122.

Moran N y Bock E. (1988) Characterization of the kinetics of neural cell adhesion molecule homophilic binding. *FEBS Lett.* **242**, 121-124.

Morris R.G, Garrud P., Rawlins J.N y O'Keefe J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* **297**, 681-683.

Muhlenhoff M., Eckhardt M., Bethe A., Frosch M y Gerardy-Schahn R. (1996) Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *EMBO J.* **15**, 6943-6950.

Muller D., Djebbara-Hannas Z., Jourdain P., Vutskits L., Durbec P., Rougon G y Kiss J.Z. (2000) Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 4315-4320.

Muller D., Stoppini L., Wang C y Kiss J. Z. (1994) A role for polysialylated neural cell adhesion molecule in lesion-induced sprouting in hippocampal organotypic cultures. *Neuroscience.* **61**, 441-445.

---

Muller D., Wang C., Skibo G., Toni N., Cremer H., Calaora V., Rougon G., Kiss J.Z. (1996) PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*. **17**, 413-422.

Munck A., Guyre P.M y Holbrook N.J. (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* **5**, 25-44.

Murase S y Schuman E.M. (1999) The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 549-553.

Murburg M.M. (1997) The psychobiology of posttraumatic stress disorder: an overview. *Ann. NY. Acad. Sci.* **821**, 352-358.

Murphy K.J y Regan C.M. (1999) Sequential training in separate paradigms impairs second task consolidation and learning-associated modulations of hippocampal NCAM polysialylation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **72**, 28-38.

Murphy K.J y Regan C.M. (1998) Contributions of cell adhesion molecules to altered synaptic weightings during memory consolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **70**, 73-81.

Murphy K.J., Lynch M.A y Regan C.M. (2000) Opiate addiction impairs neuroplastic events associated with memory formation. *Eur. J Neurosci.* **12** (11) 206. 101.18.

Murphy K.J., Fox G.B., Kelly J y Regan C.M. (1995) Influence of toxicants on neural cell adhesion molecule-mediated neuroplasticity in the developing and adult animal: persistent effects of chronic perinatal low-level lead exposure. *Toxicol Lett.* **82-83**, 271-276.

Murphy K.J., O'Connell A.W y Regan C.M. (1996) Repetitive and transient increases in hippocampal neural cell adhesion molecule polysialylation state following multitrail spatial training. *J. Neurochem.* **67**, 1268-1274.

Murray B.A., Owens G.C., Prediger E.A., Crossin K.L., Cunningham B.A., Edelman G.M. (1986) Cell surface modulation of the neural cell adhesion molecule resulting from alternative mRNA splicing in a tissue-specific developmental sequence. *J. Cell Biol.* **103**, 1431-1439.

## N

---

Nader K., Schafe G.E y LeDoux JE. (2000) The labile nature of consolidation theory. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 216-219.

---

Nakayama J., Angata K., Ong E., Katsuyama T y Fukuda M. (1998) Polysialic acid, a unique glycan that is developmentally regulated by two polysialyltransferases, PST and STX, in the central nervous system: from biosynthesis to function. *Pathol. Int.* **48**, 665-677.

Needham L.K., Thelen K y Maness P.F. (2001) Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-ankyrin interactions. *J. Neurosci.* **21**, 490-500.

Nelson R.W., Bates P.A y Rutishauser U. (1995) Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* **270**, 7171-7179.

Nguyen C., Mattei M.G., Mattei J.F., Santoni M.J., Goridis C y Jordan B.R. (1986) Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J. Cell Biol.* **102**, 711-715.

Ni Dhuill C.M., Fox G.B., Pittock S.J., O'Connell A.W., Murphy K.J y Regan CM. (1999) Polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the dentate gyrus of the human hippocampal formation from infancy to old age. *J. Neurosci. Res.* **55**, 99-106.

Nibuya M., Takahashi M., Russell D.S y Duman R.S. (1999) Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **267**, 81-84.

Nishiyama. (2001) Thymectomy-induced deterioration of learning and memory. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **47**, 161-165.

Nothias F., Vernier P., von Boxberg Y., Mirman S y Vicent J.D. (1997) Modulation of NCAM polysialylation is associated with morphofunctional modifications in the hypothalamoneurohypophysial system during lactation. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 1553-1557.

Nybroe E., Linneman D y Bock E. (1988) NCAM biosynthesis in the brain. *Neurochem. Int.* **12**, 251-262.

Nybroe O., Moran N y Bock E. (1989) Equilibrium binding analysis of neural cell adhesion molecule binding to heparin. *J. Neurochem.* **52**, 1947-1949.

## O

---

O'Connell A.W., Fox G.B., Barry T., Murphy K.J., Fichera G., Foley A.G., Kelly J y Regan C.M. (1997) Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J. Neurochem.* **68**, 2538-2546.

---

O'Malley B.W y Tsai M-J. (1992) Molecular pathways of steroid receptor action. *Biology of Reproduction* **46**, 163-167.

Oitzl, M.S y de Kloet. E.R. (1992) Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav. Neurosci.* **106**, 62-71.

Olsen M., Krog L., Edvardsen K., Skovgaard L.T y Bock E. (1993) Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane *J. Biochem.* **295**, 833-840.

Ong E., Nakayama J., Angata K., Reyes L., Katsuyama T., Arai Y y Fukuda M. (1998) Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology.* **8**, 415-424.

Ono K., Tomaszewicz H., Magnuson T y Rutishauser U. (1994) N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron.* **13**, 595-609.

Orchinik M., Moore F.L y Rose J.D. (1994) Mechanistic and functional studies of rapid corticosteroid actions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **746**, 112-114.

Orchinik M., Murray T.F y Moore F.L. (1991) A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science.* **252**, 1848-1851.

## P

---

Park T.U., Lucka L., Reutter W, y Horskorte R. (1997) Turnover studies of the neural cell adhesion molecule NCAM: degradation of NCAM in PC12 cells depends on the presence of NGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 66-689.

Pavlidis C y McEwen B.S. (1999) Effects of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors on long-term potentiation in the CA3 hippocampal field. *Brain Res.* **85**, 204-214.

Pavlidis C., Kimura A., Magarinos A.M y McEwen B.S. (1995) Hippocampal homosynaptic long-term depression/depotentiation induced by adrenal steroids. *Neuroscience.* **68**, 379-385.

Pavlidis C., Watanabe Y y McEwen B.S. (1993) Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus.* **3**, 183-192.



---

Paxinos G y Watson C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2<sup>nd</sup> edit. Academic Press, New York.

Penick S y Solomon P.R. (1991) Hippocampus, context, and conditioning. *Behav. Neurosci.* **105**, 611-617.

Penick S y Solomon PR. (1991) Hippocampus, context, and conditioning. *Behav. Neurosci.* **105**, 611-617.

Persohn E y Schachner M. (1990) Immunohistological localization of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the developing hippocampus of the mouse. *J. Neurocytol.* **19**, 807-819.

Persohn E., Pollerberg G.E y Schachner M. (1989) Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes. *J. Comp Neurol.* **288**, 92-100.

Phillips R.G y LeDoux J.E. (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* **106**, 274-285.

Phillips R.G y LeDoux J.E. (1994) Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn. Mem.* **1**, 34-44.

Pierre K., Bonhomme R., Dupouy B., Poulain D.A y Theodosis D.T. (2001) The polysialylated neural cell adhesion molecule reaches cell surfaces of hypothalamic neurons and astrocytes via the constitutive pathway. *Neuroscience.* **103**, 133-142.

Plioplys A.V., Hemmens S.E y Regan C.M. (1990) Expression of a neural cell adhesion molecule serum fragment is depressed in autism. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2**, 413-417.

Plotnikov A.N., Schlessinger J., Hubbard S.R y Mohammadi M. (1999) Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell.* **98**, 641-650.

Pollerberg G.E., Burridge K., Krebs K.E., Goodman S.R., y Schachner M. (1987) The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in a cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tissue Res.* **250**, 227-236.

Poltorak M., Frye M.A., Wright R., Hemperly J.J., George M.S., Pazzaglia P.J., Jerrels S.A., Post R.M y Freed W.J. (1996) Increased neural cell adhesion molecule in the CSF of patients with mood disorder. *J. Neurochem.* **66**, 1532-1538.

Poltorak M., Herranz A.S., Williams J., Lauretti L y Freed W.J. (1993) Effects of frontal cortical lesions on mouse striatum: reorganization of cell recognition molecule, glial fiber, and synaptic protein expression in the dorsomedial striatum. *J. Neurosci.* **13**, 2217-2229.

Poltorak M., Williams J.R., Moore K.D y Freed W.J. (1997) Changes in L1 antigen expression in the rat striatum after substantia nigra lesions. *J. Neural Transplant. Plast.* **6**, 59-62.

---

Pradel G., Schmidt R y Schachner M. (2000) Involvement of L1 in memory consolidation after active avoidance conditioning in zebrafish. *J. Neurobiol.* **43**, 389-403.

Probstmeier R., Kuhn K y Schachner M. (1989) Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *J. Neurochem.* **53**, 1794-1801.

## Q

---

Quirarte G.L., Roozendaal B y McGaugh J.L. (1997) Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14048-14053.

## R

---

Ramanathan R., Wilkemeyer M.F, Mittal B., Perides G y Charness M.E. (1996) Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *J. Cell Biol.* **133**, 381-390.

Ranheim T.S., Edelman G.M y Cunningham B.A. (1996) Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecules involves multiple immunoglobulin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 4071-4075.

Rao Y., Zhao X y Chi-Hung S. (1994) Mechanism of homophilic binding mediated by the neural cell adhesion molecule NCAM. *J. Biol. Chem.* **269**, 27540-27548.

Rathjen F.G., Norenberg U., Volkmer H. (1992) Glycoproteins implicated in neural cell adhesion and axonal growth. *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 405-409.

Rathjen F.G., Wolff J.M., Chang S y Raper J. (1990) Membrane glycoproteins involved in neurite-neurite interactions. *Acta Histochem. Suppl.* **38**, 59-63.

Rathjen F.G., Wolff J.M., Frank R., Bonhoeffer F y Rutishauser U. (1987) Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation. *J. Cell Biol.* **104**, 343-353.

- 
- Reagan L.P., McKittrick C.R y McEwen B. S. (1999) Corticosterone and phenytoin reduce neuronal nitric oxide synthase messenger RNA expression in rat hippocampus. *Neuroscience*. **91**, 211-219.
- Redies C. (2000) Cadherins in the central nervous system. *Progress in Neurobiol.* **61**, 611-648.
- Regan C.M y Fox G.B. (1995) Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochem. Res.* **20**, 593-598.
- Regan C.M. (1991) Regulation of neural cell adhesion molecule sialylation state. *Int. J. Biochem.* **23**, 513-523.
- Regan CM. (1998) Memory, cell adhesion molecules, and psychotic states. *Neurosci. News.* **1**, 1-8.
- Reichardt L.F., Bixby J.L., Hall D.E., Ignatius M.J., Neugebauer K.M., y Tomaselli K.J. (1989) Integrins and cell adhesion molecules: neuronal receptors that regulate axon growth on extracellular matrices and cell surfaces. *Dev. Neurosci.* **11**, 332-347.
- Reul J.M y de Kloet. (1985) Two receptor system for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* **117**, 2505-2511.
- Reul J.M., van den Bosch F.R y de Kloet E.R. (1987b) Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *J. Endocrinol.* **115**, 459-467.
- Reyes A.A., Akesson R., Brezina L y Cole G.J. (1990) Structural requirements for neural cell adhesion molecule-heparin interaction. *Cell Regul.* **1**, 567-576.
- Richter-Levin G. (1998) Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma, potential relevance to stress and post-stress syndromes. *Psychiatry Res.* **79**, 73-83.
- Riga T.N., Getsova V.M., Kruglikov R.I. (1986) Effect of beta-endorphin on the processes of learning and memory. *Izv. Akad. Nauk. S.S.S.R Biol.* **5**, 697-703.
- Rivier C y Vale. W. (1983) Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopresin. *Nature* **205**, 325-327.
- Roberts A.J., Gallaher E.J., y Keith L.D. (1993) Dissociation of the effect of aminoglutethimide on corticosterone biosynthesis from ataxic and hypothermic effects in DBA and C57 mice. *Neuroendocrinology* **58**, 303-309.
- Rodriguez J.J., Montaron M.F., Petry K.G., Arousseau C., Marinelli M., Premier S., Rougon G., Le Moal M., Abrous D.N. (1998) Complex regulation of the expression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 2994-3006.

---

Roemer L., Litz B.T y Orsillo S.M. (1997) Consistency of traumatic memories. *Am. J. Psychiatry.* **154**, 1628-1629.

Rogan M.T., Staubli U.V y LeDoux J.E. (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature.* **390**, 604-607.

Ronn L.C., Berezin V., Bock E. (2000a) The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int.J. Dev. Neurosci.* **18**, 193-199.

Ronn L.C., Bock E., Linnemann D y Jahnsen H. (1995) NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res.* **677**, 145-151.

Ronn L.C., Doherty P., Holm A., Berezin V y Bock E. (2000b) Neurite outgrowth induced by a synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule requires fibroblast growth factor receptor activation. *J. Neurochem.* **75**, 665-671.

Ronn L.C., Hartz B.P y Bock E. (1998) The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp. Gerontol.* **33**, 853-864.

Ronn L.C., Pedersen N., Jahnsen H., Berezin V y Bock E. (1997) Brain plasticity and the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Adv. Exp. Med. Biol.* **429**, 305-322.

Roozendaal B y McGaugh J.L. (1996) Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol. Learn. Mem.* **165**, 1-8.

Roozendaal B y McGaugh J.L. (1997a) Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 76-83.

Roozendaal B y McGaugh J.L. (1997b) Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiol. Learn. Mem.* **67**, 176-179.

Roozendaal B. (1999) Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology.* **25**, 213-238.

Roozendaal B., Bohus B y McGaugh J.L. (1996) Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone. Effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology* **21**, 681-693.

Roozendaal B., Koolhaas J.M y Bohus B. (1993) Posttraining norepinephrine infusion into the central amygdala differentially enhances later retention in Roman high-avoidance and low-avoidance rats. *Behav. Neurosci.* **107**, 575-579.

---

Roozendaal B., Nguyen B.T., Power A.E y McGaugh J.L. (1999) Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11642-11647.

Rose J.D., Moore F.L y Orchinik M. (1993) Rapid neurophysiological effects of corticosterone on medullary neurons: relationship to stress-induced suppression of courtship clasping in an amphibian. *Neuroendocrinology*. **57**, 815-824.

Rose S.P. (1995) Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term-memory formation. *Trends Neurosci.* **18**, 502-506.

Rose S.P. (1996) Cell adhesion molecules and the transition from short- to long-term memory. *J. Physiol. Paris* **90**, 387-391.

Rougon G. (1993) Structure, metabolism and cell biology of polysialic acid. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 197-207.

Rougon G., Dubois C., Buckley N., Magnani J.L y Zollinger W. (1986) A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J. Cell Biol.* **103**, 2429-2437.

Rudy J.W y O'Reilly R.C. (1999) Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behav. Neurosci.* **113**, 867-880.

Rudy J.W. (1993) Contextual conditioning and auditory cue conditioning dissociate during development. *Behav. Neurosci.* **107**, 887-891.

Rusakov D.A., Davies H.A., Stewart M.G y Schachner M. (1995) Clustering and co-localization of immunogold double labelled neural cell adhesion molecule isoforms in chick forebrain. *Neurosci. Lett.* **183**, 50-53.

Rutishauser U y Landmesser L. (1996) Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.* **19**, 422-427.

Rutishauser U. (1996) Polysialic acid and the regulation of cell interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 679-684.

Rutishauser U. (2000a) Defining a role and mechanism for IgCAM function in vertebrate axon guidance. *J. Cell Biol.* **149**, 757-760.

Rutishauser U. (2000b) Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 539-541.

Rutishauser U., Hoffman S y Edelman G.M. (1982) Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 685-689.

---

## S

---

Sadoul K., Sadoul R., Faissner A y Schachner M. (1988) Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* **50**, 510-521.

Sadoul R., Hirn M., Deagostini-Bazin H., Rougon G y Goridis C. (1983) Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature.* **304**, 347-349.

Sadoul R., Kirchhoff F y Schachner M. (1989) A protein kinase activity is associated with and specifically phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* **53**, 1471-1478.

Saffell J.L., Walsh F.S y Doherty P. (1994) Expression of NCAM containing VASE in neurons can account for a developmental loss in their neurite outgrowth response to NCAM in a cellular substratum. *J. Cell Biol.* **125**, 427-436.

Saffell J.L., Williams E.J., Doherty P y Walsh F.W. (1995) Axonal growth mediated by cell adhesion molecules requires activation of fibroblast growth factor receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 469-470.

Saffell J.L., Williams E.J., Mason I.J., Walsh F.S y Doherty P. (1997) Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* **18**, 231-242.

Sandi C y Loscertales M. (1999) Opposite effects on NCAM expression in the rat frontal cortex induced by acute vs. chronic corticosterone treatments. *Brain Res.* **828**, 127-134.

Sandi C y Rose S. P. R., Mileusnic R y Lancashire C. (1995) Corticosterone facilitates long-term memory formation via enhanced glycoprotein synthesis. *Neuroscience.* **69**, 1087-1093.

Sandi C y Rose S.P. (1994a) Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1292-1297.

Sandi C y Rose S.P. (1997a) Training-dependent biphasic effects of corticosterone in memory formation for a passive avoidance task in chicks. *Psychopharmacology (Berl).* **133**, 152-160.

Sandi C y Rose S.P. (1997b) Protein synthesis and fucosylation-dependent mechanisms in corticosterone facilitation of long-term memory in the chick. *Behav. Neurosci.* **111**, 1098-1104.

---

Sandi C. (1998) The role and mechanisms of action of glucocorticoids in memory formation. *Neural Plasticity* **6**, 41-52.

Sandi C., Loscertales M y Guaza C. (1997) Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 637-42.

Sandi, C y Rose S.P.R. (1994b) Corticosterone enhances long-term retention in one-day-old chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm. *Brain Res.* **647**, 106-112.

Sapolsky R.M (1996) Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion. *Stress.* **1**, 1-19.

Sapolsky R.M. (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp. Gerontol.* **34**, 721-732

Sapolsky R.M. (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry.* **57**, 925-935.

Sapolsky R.M., Krey L.C y McEwen B.S. (1984) Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **81**, 6174-6177.

Sapolsky R.M., Krey L.C y McEwen B.S. (1986) The adrenocortical axis in the aged rat: impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. *Neurobiol. Aging.* **7**, 331-335.

Sarifull Island A.T.M., Nakamura K., Seki T., Kuraoka A., Hirata K., Emson PC y Kawabuchi M. (1998) Expression of NOS, PSA-NCAM and S100 protein in the granule cell migration pathway of the adult guinea pig forebrain. *Dev. Brain Res.* **107**, 191-205.

Schachner M y Martini R. (1995) Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci.* **18**, 183-191.

Schachner M. (1994) Neural recognition molecules in disease and regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 726-734.

Schachner M. (1997) Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 627-634.

Schacter D.L., Koustaal W y Norman K.A. (1996) Can cognitive neuroscience illuminate the nature of traumatic childhood memories? *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 207-214.

Schaefer A.W., Kamiguchi H., Wong E.V., Beach C.M., Landreth G y Lemonn V. (1999) Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule requires L1 internalization. *J. Biol.* **274**, 37965-37973.

---

Schafe G.E., Atkins C.M., Swank M.W., Bauer E.P., Sweatt J.D y LeDoux J.E. (2000) Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J. Neurosci.* **20**, 8177-8187.

Schafe G.E., Nadel N.V., Sullivan G.M., Harris A y LeDoux J.E. (1999) Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem.* **6**, 97-110.

Schafer M y Stein C. (1998) The sympathetic nervous system and pain. *Anaesthesist.* **47**, 2-3.

Schmid R.S, Graff R.D, Schaller M.D, Chen S., Schachner M., Hemperly J.J y Maness P.F. (1999) NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J. Neurobiol.* **38**, 542-558.

Scholey A.B., Mileusnic R., Schachner M y Rose S.P. (1995) A role for a chicken homolog of the neural cell adhesion molecule L1 in consolidation of memory for a passive avoidance task in the chick. *Learn Mem.* **2**, 17-25.

Scholey A.B., Rose S.P., Zamani M.R., Bock E y Schachner M. (1993) A role for the neural cell adhesion molecule in a late, consolidating phase of glycoprotein synthesis six hours following passive avoidance training of the young chick. *Neuroscience.* **55**, 499-509.

Schuster T., Krug M., Hassan H y Schachner M. (1998) Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation. *J. Neurobiol.* **37**, 359-372.

Sedykh A.I., Leshchinskaia I.A., Duka T.I, Nerush P.A y Pavlov V.A. (1999) Effect of chronic emotional stress and low dose ethanol on the level of neuronal cell adhesion molecule and glial fibrillary acidic protein in rat brain. *W.M.J.* **71**, 97-103.

Seidenfaden R., Gerardy-Schahn y Hildebrandt H. (2000) Control of NCAM polysialylation by the differential expression of polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *Eur. J. Cell. Biol.* **79**, 680-688.

Seki T y Arai Y. (1991) The persistent expression of a highly polysialylated NCAM in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci. Res.* **12**, 503-513.

Seki T y Arai Y. (1993a) Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing adult central nervous system. *Neurosci. Res.* **17**, 265-290.

Seki T y Arai Y. (1993b) Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J. Neurosci.* **13**, 2351-2358.



---

Seki T y Arai Y. (1999a) Different polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression patterns in distinct types of mossy fiber boutons in the adult hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **410**, 115-125.

Seki T y Arai Y. (1999b) Temporal and spacial relationships between PSA-NCAM-expressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* **410**, 503-513.

Selden N.R., Everitt B.J., Jarrard L.E y Robbins T.W. (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience.* **42**, 335-350.

Shapiro M.L y Eichenbaum H. (1999) Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus.* **9**, 365-384.

Siemiatkowski M., Rokicki D., Czlonkowska A.I., Sienkiewicz-Jarosz H., Bidzinski A y Plaznik A. (2000) Locomotor activity and a conditioned fear response: correlation with cortical and subcortical binding of the dopamine D1 receptor antagonist. *Neuroreport.* **11**, 3953-3956.

Skladchikova G., Ronn L. C. B., Berezin V y Bock E (1999) Extracellular adenosine triphosphate affects neural cell adhesion molecule (NCAM)-mediated cell adhesion and neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* **57**, 207-218.

Slater E.P., Hesse H y Beato M. (1994) Regulation of transcription by steroid hormones. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **733**, 103-112.

Small S.J., Haines S.L y Akesson R. (1988) Polypeptide variation in an N-CAM extracellular fold is developmentally regulated though alternative splicing. *Neuron* **1**, 1007-1017.

Soares S., von Boxberg Y., Ravaille-Veron M., Vincent J.D y Nothias F. (2000). Morphofunctional plasticity in the adult hypothalamus induces regulation of polysialic acid-neural cell adhesion molecule through changing activity and expression levels of polysialyltransferases. *J. Neurosci.* **20**, 2551-2557.

Sorkin B.C., Hoffman S., Edelman G.M y Cunningham B.A. (1984) Sulfation and phosphorylation of the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Science* **225**, 1476-1478.

Sousa N., Lukoyanov N.V., Madeira M.D., Almeida O.F y Paula-Barbosa M.M. (2000) Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience.* **97**, 253-266.

Spencer R.L., Miller A.H., Stein M y McEwen B.S. (1991) Corticosterone regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in brain, pituitary, and immune tissue. *Brain Res.* **549**, 236-246.

Squire L.R y Zola-Morgan S. (1988) Memory: brain systems and behavior. *Trends Neurosci.* **11**, 170-5.

---

Squire L.R. y Zola-Morgan S. (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science*. **253**, 1380-1386.

Squire L.R., Knowlton B y Musen G. (1993) The structure and organization of memory. *Annu. Rev. Psychol.* **44**, 453-495.

Squire L.R., Zola S.M. (1996) Memory, memory impairment, and the medial temporal lobe. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **61**, 185-95.

Stallcup W.B y Beasley L.L (1985) Involvement of the nerve growth factor inducible large external (NILE) glycoprotein in neurite fasciculation in primary cultures of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1276-1280.

Stallcup W.B. (2000) The third fibronectin type III repeat is required for L1 to serve as an optimal substratum for neurite extension. *J. Neurochem. Res.* **61**, 33-43.

Stein-Behrens B.A., Lin W.J y Sapolsky R.M. (1994) Physiological elevations of glucocorticoids potentiate glutamate accumulation in the hippocampus. *J. Neurochem.* **63**, 596-602.

Sugawa M., Ono K., Yasui Y., Kishi T y Tsumori T. (1997) Enhancement of neurite outgrowth by the soluble form of human 1 (neural cell adhesion molecule). *Neuroreport.* **29**, 143157-143162.

## T

---

Tarcic N., Ovadia H., Weiss D.W y Weidenfeld J. (1998) Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *J. Neuroimmunol.* **82**, 40-46.

Theodosis D.T., Bonhomme R., Vitiello S., Rougon G y Poulain D.A. (1999) Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J. Neurosci.* **19**, 10228-10236.

Theodosis D.T., Pierre K y Poulain D.A. (2000) Differential expression of two adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, F3 and polysialylated NCAM, in hypothalamic magnocellular neurones capable of plasticity. *Exp. Physiol.* **85**, 187S-196S.

Thompson J., Dickson G., Moore S.E., Gower H.J., Putt W., Kenimer J.G., Barton C.H y Walsh F.S. (1989) Alternative splicing of the neural cell adhesion molecule gene generates variant extracellular domain structure in skeletal muscle and brain. *Genes Dev.* **3**, 348-357.

---

Tinnikov A.A. (1999) Responses of serum corticosterone and corticosteroid-binding globulin to acute and prolonged stress in the rat. *Endocrine*. **11**, 145-50.

Tombaugh G y Sapolsky R. (1992) Corticosterone accelerates hypoxia-induced ATP loss in cultured hippocampal astrocytes. *Brain Res*. **588**, 154-159.

Tully T., Preat T., Boynton S.C y Del Vecchio M. (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell*. **79**, 35-47.

Tulving E y Markowitsch H.J. (1997) Memory beyond the hippocampus. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 209-216.

## U

---

Uryu K., Butler A.K y Chesselet M.F. (1999) Synaptogenesis and ultrastructural localization of the polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *J. Comp. Neurol.* **405**, 216-232.

Uyemura K., Asou H., Yazaki T y Takeda Y. (1996) Cell-adhesion proteins of the immunoglobulin superfamily in the nervous system. *Essays Biochem.* **31**, 37-48.

## V

---

Van der Kolk BA. (1994) The body keeps the score: memory and the evolving psychobiology of posttraumatic stress. *Harv. Rev. Psychiatry*. **1**, 253-265.

Van Eekelen J.A., Jiang W., De Kloet E.R y Bohn M.C. (1988) Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **21**, 88-94.

Varki A. (1998) Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* **8**, 34-40.

---

Vater C.A., Reid K., Bartle L.M y Goldmacher V.S. (1995) Characterization of antibody binding to cell surface antigens using a plasma membrane-bound plate assay. *Anal. Biochem.* **224**, 39-50.

Vawter M.P. (2000) Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur. J. Pharmacol.* **405**, 385-395.

Vawter M.P., Cannon-Spoor H.E., Hemperly J.J., Hyde T.M., VanderPutten D.M., Kleinman J.E y Freed W.J. (1998) Abnormal expression of cell recognition molecules in schizophrenia. *Exp. Neurol.* **149**, 424-432.

Vawter M.P., Howard A.L., Hyde T.M., Kleinman J.E., Freed W.J. (1999) Alterations of hippocampal secreted N-CAM in bipolar disorder and synaptophysin in schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* **4**, 467-475.

Venero C y Borrell J. (1999) Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 2465-2473.

Venero C, Guaza C y Sandi C. (1996) Regional and temporal modulation of brain glycoprotein synthesis by corticosterone. *Neuroreport.* **7**, 2819-2822.

Vianna M.R., Barros D.M., Silva T., Choi H., Madche C., Rodrigues C., Medina J.H e Izquierdo I. (2000b) Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **150**, 77-84.

Vicente A.M., Macciardi F., Verga M., Bassett A.S., Honer W.G., Bean G y Kennedy J.L. (1997) NCAM and schizophrenia: genetic studies. *Mol. Psychiatry.* **2**, 65-69.

Viola H., Furman M., Izquierdo L.A., Alonso M., Barros D.M., de Souza M.M., Izquierdo I y Medina J.H. (2000) Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *J. Neurosci.* **20**, RC112.

Vutskits L., Djebbara-Hannas Z., Zhang H., Paccaud J.P., Durbec P., Rougon G., Muller D y Kiss J.Z. (2001) PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 1391-1402

## W

---

Wallenstein R.E., Simeral J.D y Deadwyler S.A. (1999) Distribution of spatial and nonspatial information in dorsal hippocampus. *Nature.* **402**, 610-614.

---

Walsh F.S y Doherty P. (1996) Cell adhesion molecules and neuronal regeneration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 707-713.

Walsh F.S y Doherty P. (1997) Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 425-556.

Walsh F.S, Meiri K y Doherty P. (1997) Cell signalling and CAM-mediated neurite outgrowth. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **52**, 221-226.

Walsh F.S. (1989) Generation of multiple neural cell adhesion molecule proteins from a single gene. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 975-976.

Walsh F.S., Furness J., Moore S.E., Ashton S y Doherty P. (1992) Use of the neural cell adhesion molecule VASE exon by neurons is associated with a specific down-regulation of neural cell adhesion molecule-dependent neurite outgrowth in the developing cerebellum and hippocampus. *J. Neurochem.* **59**, 1959-1962.

Wang C., Pralong W.F., Schulz M.F., Rougon G., Aubry J.M., Pagliusi S., Robert A y Kiss J.Z. (1996) Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. *J. Cell. Biol.* **135**, 1565-1581.

Wang C., Rougon G y Kiss J.Z. (1994) Requirement of polysialic acid from the migration of the O-2A glial progenitor cell from neurohypophyseal explants. *J. Neurosci.* **14**, 4446-4457.

Warita H., Murakami T., Manabe Y., Sato K., Hayashi T., Seki T y Abe K. (2001) Induction of polysialic acid-neural cell adhesion molecule in surviving motoneurons of transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Neurosci. Lett.* **300**, 75-78.

Watanabe Y, Gould E, and McEwen BS. (1992a) Stress induce atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* **588**, 341-345.

Watanabe Y., Gould E., Cameron H.A., Daniels D.C y McEwen B.S. (1992b) Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus.* **2**, 431-435.

Watanabe Y., Gould E., Daniels D.C., Cameron H y McEwen B.S. (1992c) Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **222**, 157-162.

Weeber EJ, Atkins CM, Selcher JC, Varga AW, Mirnikjoo B, Paylor R, Leitges M, y Sweatt J.D. (2000) A role for the  $\beta$  isoform of protein kinase C in fear conditioning. *J. Neurosci.* **20**, 5906-5914.

Weiland N.G., Orchinik M y Tanapat P. (1997) Chronic corticosterone treatment induces parallel changes in N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA levels and antagonist binding sites in the hippocampus. *Neuroscience.* **78**, 653-662.

---

Werz W y Schachner M. (1988) Adhesion of neural cells to extracellular matrix constituents. Involvement of glycosaminoglycans and cell adhesion molecules. *Dev. Brain Res.* **43**, 225-234.

Williams E.J., Furness J., Walsh F.S y Doherty P. (1994a) Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* **13**, 583-594.

Williams E.J., Walsh F.S y Doherty P. (1994b) The production of arachidonic acid can account for calcium channel activation in the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by NCAM, N-cadherin, and L1. *J. Neurochem.* **62**, 1231-1234.

Winocur G y Moscovitch M. (1999) Anterograde and retrograde amnesia after lesions to frontal cortex in rats. *J. Neurosci.* **19**, 9611-9617.

Winocur G., Rawlins J.N y Gray T.A. (1987) The hippocampus and conditioning to contextual cues. *Behav. Neurosci.* **101**, 617-625.

Wolfer D.P., Mohajeri H.M., Lipp H.P y Schachner M. (1998) Increased flexibility and selectivity in spatial learning of transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 708-717.

Wong E.V., Cheng G.H., Payne H.R y Lemmon V. (1995a) The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule L1 is not required for homophilic adhesion. *Neurosci. Lett.* **200**, 155-158.

Wong E.V., Kenwrick S., Willems P y Lemmon V. (1995b) Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation. *Trends Neurosci.* **18**, 168-172.

Wood E.R., Dudchenko P.A y Eichenbaum H. (2001) Cellular correlates of behavior. *Int. Rev. Neurobiol.* **45**, 293-312.

Wood G.K., Liang J.J., Flores G., Ahmad S., Quirion R y Srivastava L.K. (1997) Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **51**, 69-81.

Woolley C.S., Gould E y McEwen B.S. (1990) Exposure to excess glucocorticoids alters dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* **588**, 341-345.

## Y

---

Yee C.S., Chandrasekhar A., Halloran M.C., Shoji W., Warren J.T y Kuwada J.Y. (1999) Protein, Nucleotide Molecular cloning, expression, and activity of zebrafish semaphorin Z1a. *Brain Res. Bull.* **48**, 581-593.

---

Yehuda R y Antelman S.M. (1993) Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* **34**, 479-486.

Yin J.C y Tully T. (1996) CREB and the formation of long-term memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 264-268.

## **Z**

---

Zola-Morgan S y Squire L.R. (1993) Neuroanatomy of memory. *Ann. Rev. Neurosci.* **16**, 547-563.

Dado que las glicoproteínas denominadas moléculas de adhesión celular neural (NCAM, su forma polisializada, -PSA-NCAM-, y L1) desempeñan un papel importante en la consolidación de la memoria, se estudió su expresión en diferentes regiones cerebrales, en ratas entrenadas en el paradigma conductual del condicionamiento del miedo al contexto, bajo diferentes niveles de estrés intrínseco (ligado a la tarea de aprendizaje), y a diferentes tiempos post-entrenamiento (12 y 24 horas).

También se estudiaron los posibles efectos del estrés crónico sobre la expresión de dichas moléculas de adhesión celular neural en ratas sometidas a inmovilización y/o entrenadas en el condicionamiento del miedo al contexto.

Los resultados obtenidos mostraron una diferencial implicación de la polisialización de NCAM hipocampal en el almacenamiento de información relativa a experiencias que implican diferentes grados de estrés. En conjunto, los resultados mostrados en esta Tesis, apoyan la idea de una modulación de las moléculas de adhesión celular en situaciones de estrés, tanto agudo, como crónico, y sugieren la posibilidad de que los cambios producidos en los niveles de dichas moléculas como consecuencia del estrés participen en los mecanismos neurales implicados en diversas funciones cognitivas. Asimismo, los datos neuroendocrinos y conductuales refuerzan las hipotetizadas acciones de los glucocorticoides sobre los procesos de formación de la memoria, incluidas las memorias traumáticas.

Por otro lado, el estrés crónico indujo un descenso de los niveles de NCAM hipocampales, que podría estar implicado en los procesos deletéreos que a nivel sináptico se han descrito en otros estudios a nivel de dicha estructura. Por el contrario, incrementó los niveles de PSA-NCAM y de L1, moléculas implicadas en el remodelamiento estructural de tipo compensatorio ante el daño neural inducido por el estrés crónico. Además, el estrés crónico también indujo alteraciones en el contenido de dichas moléculas de adhesión en otras regiones cerebrales.



