



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

EFFECTO DE LA SEPARACIÓN MATERNAL
PERIÓDICA SOBRE LA ONTOGENIA DEL GIRO
DENTADO DEL HIPOCAMPO Y SUS
CONSECUENCIAS NEUROENDOCRINAS Y
CONDUCTUALES EN EL ADULTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA:

LIBB NAIMA LAJUD AVILA

DIRECTOR DE TESIS

D. en C. Ma. DE LA LUZ TORNER AGUILAR

COMITÉ TUTORAL:

D. en C. GABRIEL GUTIERREZ OSPINA

D. en C. JULIO MORAN ANDRADE

JURIQUILLA, QRO. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroendocrinología de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la asesoría de la Dra. Luz Torner Aguilar.



Este trabajo de tesis se realizó con apoyo académico de la Dra. Carmen Clapp Jiménez (INB) y la Dra Inga Neumann (Uni. Regensburg). El proyecto contó con apoyo financiero del donativo a LT: CONACyT (85109 / 2007). La autora conto con apoyo parcial de beca CONACyT doctorado (3 semestres), apoyo financiero del Posgrado en Ciencias Biomédicas y el apoyo técnico del personal académico del INB:

Ing. Nydia Hernández Ríos, Unidad de Microscopía del INB-UNAM)

M. en C. Leonor Casanova Rico, Oficina de Posgrado del INB-UNAM

Ma. del Carmen Vázquez Rodríguez, Oficina de Posgrado del INB-UNAM

DEDICATORIA

A Carola,

A Luz,

A Jon.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a Carola.

A Jon, gracias por siempre creer...

A los Chicos: Jasso, Orlando, Lucero, Alexs, Tribis y Nadia; por los "miércoles", los viajes, los martinis y todas esas cosas que permiten seguir intentando hacer academia desde acá.

A las chicas del lab: Angie y Ere, por hacer llevadero el día a día.

A Luz. Gracias por ser mi jefa, amiga, tutor, ejemplo, punching bag y proveedora de café y esperanzas durante los últimos 6 años; pero sobre todo por estar dispuesta a apoyarme siempre y en contra de todas las adversidades.

A mi "jefe" Gabriel, a Julio y a Marco, por apoyarnos desde el principio y abrirnos las puertas a tantas cosas.

CONTENIDO

| | Pagina |
|-------------------------------|--------|
| I.RESUMEN | 6 |
| II. SUMMARY | 7 |
| III. INTRODUCCIÓN | 8 |
| IV. ANTECEDENTES | 18 |
| V. HIPÓTESIS | 28 |
| VI. OBJETIVOS | 29 |
| VII. ESTRATEGIA | 31 |
| VIII MATERIALES Y METODOLOGIA | 32 |
| IX. RESULTADOS | 42 |
| X. DISCUSIÓN | 52 |
| XI. CONCLUSIONES | 61 |
| XII. BIBLIOGRAFIA | 62 |

I. RESUMEN

Se ha propuesto que la exposición a experiencias adversas durante las etapas tempranas de la vida causa alteraciones en la reactividad del eje Hipotálamo - Hipófisis – Suprarrenales (HPA) mediante una elevación crónica de los niveles de Glucocorticoides (GC) durante periodos específicos del desarrollo. Esta elevación de GC durante las etapas más sensibles podría afectar la ontogenia del hipocampo y de esta forma alterar el asa de retroalimentación negativa del eje HPA, sin embargo esta posibilidad aún no ha sido evaluada directamente. Es por esto que nos planteamos el objetivo de evaluar si la exposición a experiencias adversas durante periodos críticos puede alterar la ontogenia del hipocampo. Para esto utilizamos crías de rata sometidas a separación maternal (3h/día, SM) por 14 días, iniciando al día posnatal (PND) 1. Al PND5 las crías fueron inyectadas con Bromodeoxiuridina (BrdU). Al PND15 observamos una disminución en el número de núcleos marcados contra BrdU y Doblecortina (Dcx) o BrdU y NeuN en el giro dentado (DG) del hipocampo de los animales SM comparados con los controles (CONT). Sorprendentemente las crías SM mostraron concentraciones similares de Corticosterona (CORT) entre el PND3 y el PND12, mientras que los machos adultos MS mostraron concentraciones significativamente mayores al compararlos con los animales control. Adicionalmente, las crías SM mostraron concentraciones mayores de CORT en respuesta al estrés al PND3 pero no al PND12. La separación maternal no causó efecto sobre la conducta de ansiedad de los animales adultos, evaluada en el laberinto elevado en cruz, pero evocó una respuesta más pasiva en la prueba del nado forzado. Nuestros resultados muestran que la disminución de la neurogénesis hipocampal es un fenómeno que se establece desde las etapas tempranas del desarrollo y sugieren que las experiencias adversas alteran la ontogenia del hipocampo sin causar una elevación crónica de los niveles de GC.

II. SUMMARY

It has been hypothesized that exposure to adverse early life experience alters the adult Hypothalamic Pituitary Adrenal axis (HPA) responsiveness by chronically elevating glucocorticoid (GC) levels during sensitive time windows. This early elevation of GC is also thought to damage hippocampal ontogeny, altering the hippocampus negative feedback on adult HPA axis, but it has not been directly evaluated. To test whether hippocampal ontogeny is affected by early adverse experience, here we estimated the survival of recently formed hippocampal granule cells in rat pups subjected to periodic maternal separation (3h/day) from postnatal day (PND) 1 to 14 (SM). Accordingly, SM pups injected with bromodeoxyuridine (BrdU, 50mg/kg, ip) at PND5, showed decreased density of doublecortin (DCX) positive BrdU-labeled cells at PND15. Interestingly, MS180 and control pups showed similar Corticosterone (CORT) basal levels between PND3-PND12, whereas adult SM rats presented higher CORT levels than control adults. Nonetheless both AFR and SM pups and adults showed similar transient increments of CORT levels in response to stress at PND12 but not before (PND3). In addition SM had no effect on the adult anxiety-like behavior evaluated in the elevated plus maze but evoked a passive coping strategy in the forced swimming test. Our results show that the decrease of hippocampal neurogenesis is an early onset phenomenon, and suggest the notion that adverse experiences alter hippocampal ontogeny without chronically elevating GC levels.

III. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo, el organismo es especialmente vulnerable a factores ambientales. Estudios retrospectivos en humanos han mostrado que las experiencias adversas durante las etapas tempranas de la vida (ej: abuso infantil, violencia familiar o social, estrés laboral de la madre durante el embarazo, un ambiente escolar agresivo, etc) aumentan la probabilidad de padecer enfermedades neurológicas (i.e. depresión, esquizofrenia, abuso de drogas...) y la vulnerabilidad al estrés en el adulto, lo cual desemboca en una hiper-actividad / hiper-reactividad del eje neuroendocrino del estrés (Eje HPA) [1-4]. Sin embargo, los mecanismos de esta programación durante el neurodesarrollo no han sido descritos.

Durante la ontogenia se establecen los parámetros de funcionamiento de diversos órganos y tejidos, por lo que se ha propuesto que la estructura y función de estos puede ser “programada” o alterada de forma permanente en respuesta a ciertos estímulos o agresiones durante períodos críticos del desarrollo (programación neuroendocrina, programación glucometabólica, etc) [5-9], de tal forma que las alteraciones relacionadas con la exposición a eventos adversos durante las etapas tempranas de la vida podrían ser causadas por la exposición al estrés durante dichos periodos críticos [6], posibilidad que aun no ha sido evaluada directamente.

La respuesta del organismo, en este caso la madre o el neonato, ante la presencia de un estresor estimula las estructuras del sistema nervioso central (SNC) que causan la activación del eje Eje HPA y conduce a la liberación de glucocorticoides (GC) por las glándulas suprarrenales [10, 11]. Mientras que la activación aguda del eje HPA es un mecanismo de defensa que permite contender con una amenaza, la exposición crónica al estrés está relacionada con la aparición de una gran variedad de patologías como deficiencias inmunológicas, enfermedades cardiovasculares y desordenes del afecto como la depresión y la ansiedad [12-14]. Específicamente, se cree que la sobre-activación del eje HPA y la subsecuente liberación de GC pueden causar efectos dañinos sobre el organismo [14, 15].

Estrés y el eje Hipotálamo – Hipófisis - Suprarrenales

La definición de estrés es un concepto amplio que ha sido modificado a lo largo del tiempo. Inicialmente Hans Selye introdujo el concepto de estrés y lo definió como “una respuesta inespecífica del cuerpo a cualquier demanda” [16]. Este concepto ha evolucionado, hasta llegar a la definición multidimensional que sostiene que el estrés es “un complejo repertorio de respuestas fisiológicas, tales como la activación del eje HPA y del eje simpático-adrenal, además de respuestas conductuales como la ansiedad, el miedo, la ira, etc., que se activan o manifiestan para restaurar amenazas a la homeostasis del organismo”.

En la actualidad es bien aceptado que la principal respuesta ante la presencia de un estresor es la activación del eje HPA junto con la activación rápida del sistema nervioso simpático (SNP) - adrenal y la subsecuente liberación de Adrenalina y Noradrenalina [11, 17, 18]. Si bien, la exposición a un estresor activa diversas estructuras y regiones del Sistema Nervioso Central (SNC), el Hipotálamo, es la

región considerada como el organizador principal de las respuestas al estrés (Figura 1), a través de la activación de la actividad celular del núcleo paraventricular (NPV) [18]. Durante la activación del eje HPA la región parvocelular del NPV libera la hormona, o factor liberador (a) de corticotropina (CRH/CRF) a la circulación del sistema portal hipotálamo-hipofisiario vía sus proyecciones neurales. Una vez en la hipófisis la CRH estimula la síntesis y liberación de corticotropina, también llamada hormona adrenocorticotrópica (ACTH), a la circulación sistémica. La ACTH viaja por la circulación alcanzando, entre otras estructuras, a las glándulas suprarrenales donde estimula la secreción de glucocorticoides [11]. En los humanos el principal glucocorticoide efector de la respuesta al estrés es el cortisol, mientras que su homólogo en ratas es la corticosterona (CORT). Los glucocorticoides (GC) tienen efectos catabólicos importantes orientados a promover la movilización de fuentes de energía (i.e. gluconeogénesis) lo cual da como resultado el aumento en la concentración de glucosa en sangre necesario para contender con situaciones de estrés [19, 20]. Los GC pueden atravesar la barrera hematoencefálica y entrar al cerebro en donde se unen a dos tipos de receptores a esteroides adrenales: el receptor a glucocorticoides (GCRs, Tipo II) y el receptor a mineralocorticoides (MRs Tipo I), este último de mayor afinidad [11, 21]. Se ha propuesto que algunos de los efectos dañinos del estrés son mediados por la activación de los GCRs [22].

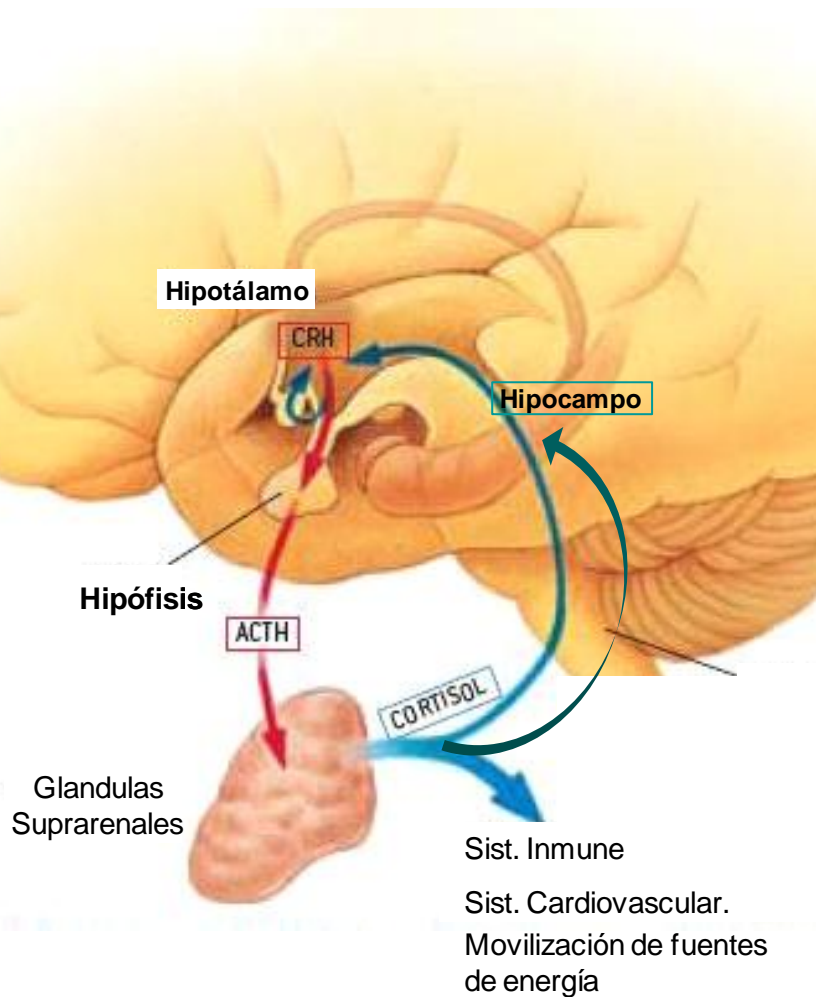


Figura 1: Esquema que ilustra a las estructuras involucradas en la activación del eje Hipotálamo – Hipófisis – Suprarrenales (HPA) en respuesta al estrés. Durante la respuesta al estrés el Hipotálamo libera CRH a la circulación sanguínea. Una vez en la Hipófisis la CRH estimula la síntesis y liberación de ACTH a la circulación periférica la cual viaja hasta las glándulas suprarrenales donde estimula la secreción de GC (flechas rojas). La CRH y los GC pueden activar sus propios receptores localizados en el hipotálamo y el hipocampo causando la inactivación del eje (flechas azules). (CRH: hormona liberadora de Corticotropina, ACTH: hormona adrenocorticotrópica)

El Sistema Nervioso Central (SNC), principalmente el NPV y el hipocampo, es responsable de modular negativamente la respuesta al estrés, por lo que alteraciones en su estructura y funcionamiento contribuyen a la desregulación de la respuesta al estrés [11, 17, 18, 23]. La exposición a experiencias adversas modifica la reactividad al estrés y la función del hipotálamo a largo plazo[19, 24]. Se ha postulado que la sobre-activación del eje HPA durante el desarrollo

causada por la exposición al estrés, podría causar alteraciones en las zonas encargadas de la regulación y activación del eje HPA y aumentar la vulnerabilidad al estrés en el adulto [24, 25].

Estrés e hipocampo.

El sistema límbico es un complejo de estructuras cerebrales compuesto principalmente por el hipotálamo, el hipocampo, la amígdala, algunos núcleos talámicos, el septum, la circunvolución del cíngulo y la corteza entorrinal. Este sistema se ha relacionado ampliamente con las respuestas fisiológicas ante estímulos emocionales como el estrés [26]. Sus principales funciones son la modulación de la conducta sexual; aprendizaje y memoria; control de las emociones así como la regulación y activación de la respuesta al estrés [27, 28]. Durante la exposición a un estresor el sistema límbico interacciona velozmente (y al parecer de forma independiente a las estructuras cerebrales superiores) con el sistema endócrino y el sistema nervioso autónomo activando la respuesta al estrés [27].

Es una estructura bilaminar, formada por el cuerno de Ammón, o hipocampo propiamente dicho, y el giro dentado (GD) [29] que ejerce un papel importante como modulador de la actividad del eje HPA [11, 27, 30-33]. Anatómicamente el hipocampo es una arqueocorteza que se divide en cuatro áreas de las cuales CA1 y CA3 son las de mayor tamaño (Figura 2 inserto), conformado por tres capas celulares fundamentales: la capa polimórfica, la capa piramidal y la capa molecular.

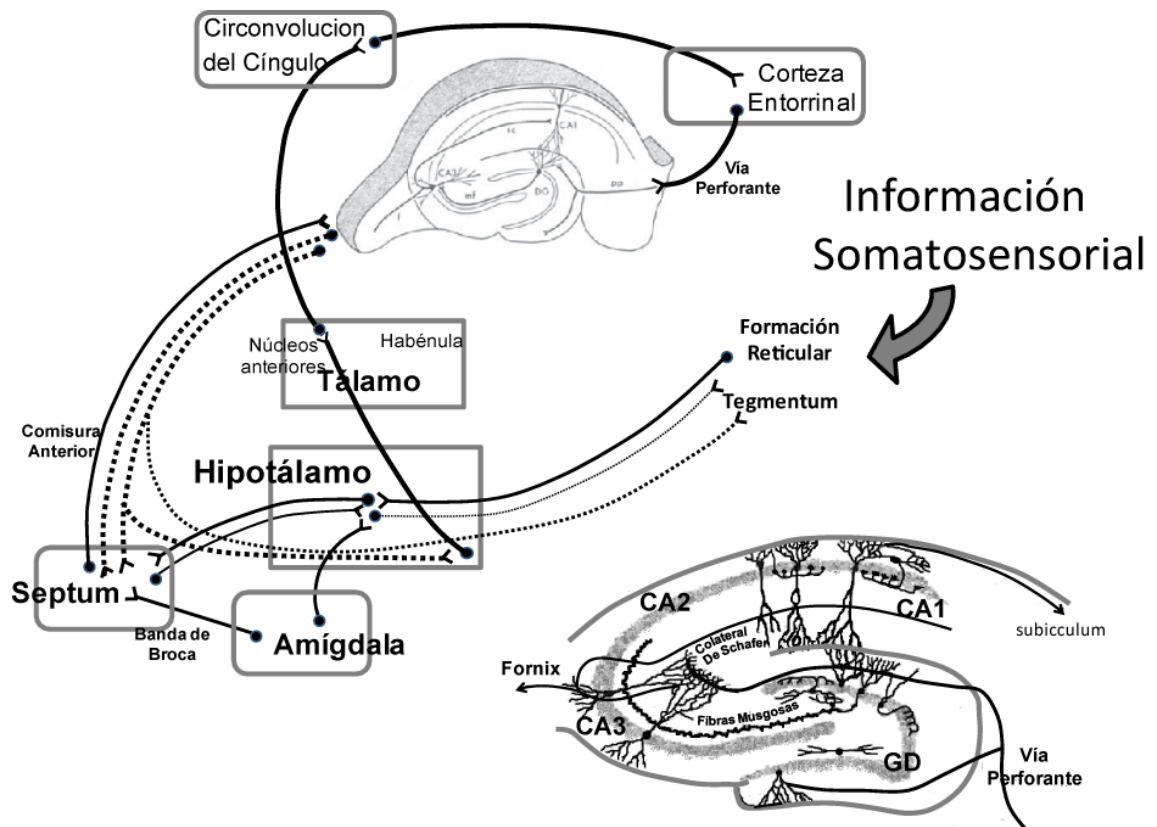


Figura 2: Diagrama esquematizado de la conectividad del sistema límbico y el hipocampo (inserto). Las líneas continuas muestran las aferentes somatosensoriales al hipotálamo a partir del cual la información sigue su ruta hacia la amígdala o el septo y permiten la llegada de información a la corteza cerebral vía el hipocampo. Las líneas punteadas muestran las eferentes de retroalimentación negativa desde el hipocampo hacia el hipotálamo, el septo y la zona tegmental mesoencefálica. El inserto muestra la conectividad detallada del circuito tri-sináptico del hipocampo a través de sus diversas áreas (vía perforante-giro dentado-CA3-CA1).

De la misma forma, el giro dentado también consta de tres capas denominadas capa molecular, granular (CG) y polimórfica [29]. La principal ruta de entrada de información al hipocampo es la vía perforante (Figura 2 inserto), la cual proviene de la corteza entorrinal y alcanza al GD [34]. Desde este las neuronas granulares emiten las llamadas fibras musgosas que inervan la región CA3 del hipocampo (Figura 2 inserto); que a su vez emite aferentes hacia la región CA1 formando el llamado circuito tri-sináptico (figura 2 inserto) [35]. Desde CA1 los axones se proyectan a través del fórnix hacia el *subícculum* y de aquí de nuevo a la corteza

entorrinal y el hipotálamo [29]. Además de la vía perforante, el hipocampo también recibe aferencias de la amígdala, la ínsula, el cíngulo anterior, el área temporal polar, así como de las cortezas somatosensorial, auditiva y visual primarias. Adicionalmente existen aferencias colinérgicas provenientes del septum, y noradrenérgicas y serotoninérgicas que provienen del *locus coeruleus* y los núcleos del rafé [29].

La vía eferente principal del hipocampo es el fórnix, que contiene los axones de las células del subículum y de las células piramidales del hipocampo [36]. Estas proyecciones forman el alveus y convergen en el margen medial de la superficie ventricular para formar la fimbria y posteriormente el fórnix [37]. La formación hipocámpal está interconectada directa o indirectamente con los núcleos septales, el tálamo, el hipotálamo, la formación reticular y la corteza cerebral [36-38].

El hipocampo es una estructura que se ha relacionado con muchas de las funciones que se ven alteradas a causa del estrés, ya que es un modulador negativo de la actividad del eje HPA y del comportamiento de ansiedad [11, 39, 40] y contiene una alta densidad de receptores a GC [41]. Se ha observado que las lesiones hipocámpales y del fórnix dan como resultado una recuperación más lenta de los niveles de actividad del eje HPA después de un estímulo estresor [42-45]. Por otro lado se ha visto que el hipocampo es una estructura implicada en la regulación del comportamiento de ansiedad [39] y forma parte del circuito emocional que controla la activación de la respuesta al estrés [46]. Así mismo se han caracterizado ampliamente los efectos del estrés sobre diversas regiones del hipocampo. En el caso del GD la exposición a estrés crónico o estrés psicosocial afecta el comportamiento de los animales en las pruebas de reconocimiento y localización de objetos [47] y ocasiona cambios en la densidad de las fibras

musgosas [42]. La región CA3 del hipocampo es un área reconocida por su capacidad plástica en respuesta a la elevación de glucocorticoides [11, 48] y la exposición crónica al estrés se asocia con una disminución tanto en el número de sinápsis como en la superficie de las densidades postsinápticas de esta región así como atrofia de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA1 [42, 49-51]. Todos estos cambios son acompañados de alteraciones en tareas de aprendizaje espacial [52-55] así como de una supresión de la potenciación a largo plazo (LTP) [56, 57]. Es posible que los GC, secretados por las glándulas suprarrenales después de la exposición a un estresor, pudieran influenciar la capacidad cognitiva [58, 59], sin embargo la elevación prologada de GC debido a la exposición crónica al estrés causa un efecto deletéreo sobre la estructura y función hipocampal [60].

Neurogénesis y Estrés.

Se denomina neurogénesis al proceso de generación de nuevas neuronas, su diferenciación, migración y el establecimiento de conexiones nuevas. La neurogénesis durante la ontogenia es el proceso de formación de las neuronas y dentro de un proceso más amplio, el de formación del sistema nervioso (SNC) o morfogénesis [29]. Durante la ontogenia el hipocampo se origina en el telencéfalo dorsomedial adyacente a la corteza. Los precursores de las células piramidales de las regiones CA1-CA3 del hipocampo nacen de las células troncales neuroepiteliales y migran de la región interna del cuerno de Amón hacia la externa. En roedores las células piramidales se originan principalmente prenatalmente con el pico máximo de neurogénesis durante la última semana de gestación (E14 - E15). Posteriormente hay una migración tangencial de

interneuronas GABAérgicas hacia el hipocampo, las cuales desarrollan sinápsis funcionales antes que las neuronas excitadoras. Una vez emplazadas las neuronas piramidales del CA3 extienden sus aferentes (colaterales de Schaffer) y establecen sinapsis con las neuronas de CA1. Las dendritas de las células piramidales de CA3 continúan madurando y generando espinas después del nacimiento. Estas espinas reciben la entrada sináptica de los axones de las fibras musgosas [61]. Las células granulares son la capa principal de células del GD y en los roedores cerca del 85% de su población se originan postnatalmente [62-64], haciéndolas especialmente vulnerables al daño causado por la activación de la respuesta al estrés. Se han descrito dos olas de migración de los precursores de células granulares. La primera de ellas denominada “dentada” (DM1) finaliza antes del nacimiento y contribuye principalmente al crecimiento de la capa subgranular (CSG). La segunda llamada DM2, da lugar a las células granulares de origen posnatal las cuales migran radialmente de la capa subgranular a la cara interna de la capa de células granulares (Figura 3.).

En el hipocampo la neurogénesis de la CG permanece activa hasta la etapa adulta, donde se propone forma parte de los procesos plásticos de esta estructura [65-67]. En el adulto se ha observado que factores ambientales como la exposición crónica al estrés, a un ambiente enriquecido, el ejercicio o sustancias como glucocorticoides, estrógenos o serotonina regulan la neurogénesis del GD promoviendo o disminuyendo tanto la proliferación como la supervivencia celular [66]. Particularmente, se ha demostrado que la exposición al estrés causa una disminución en la neurogénesis hipocampal, pero este efecto parece ser dependiente tanto de la naturaleza como de la duración del estresor [66]. Por ejemplo en ratas macho, el estrés causado por la exposición al olor de un

depredador, inmovilización o el estrés impredecible, causan una disminución en la neurogénesis del GD hasta una semana después de ser sometidos al estrés [67-72].

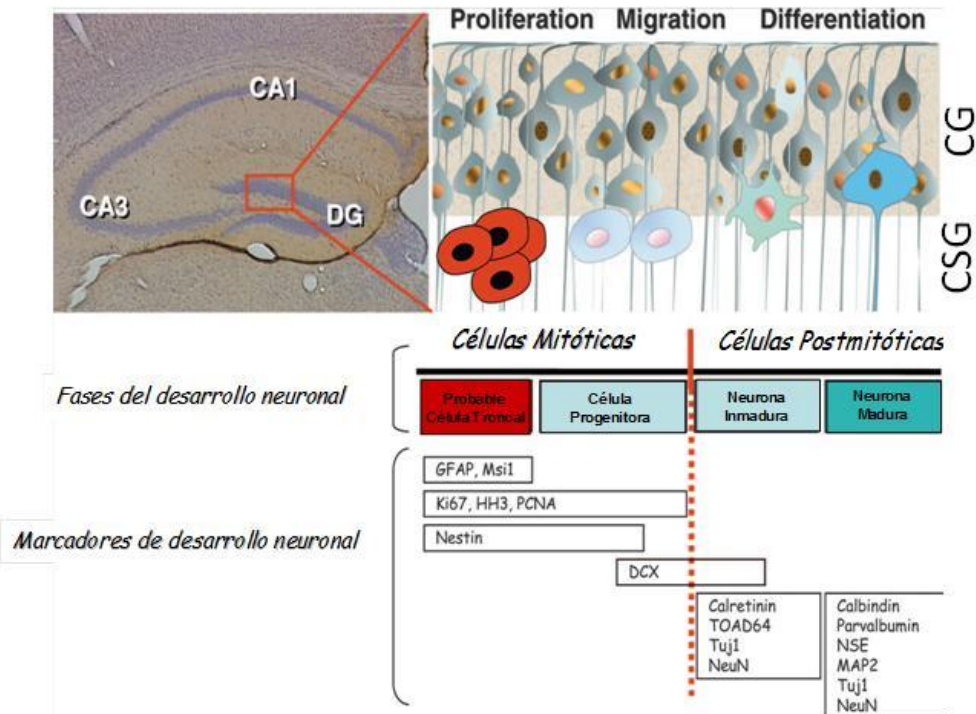


Figura 3: Neurogénesis postnatal en el hipocampo. En el panel superior se observa una vista coronal del hipocampo de roedores, mostrando las diferentes regiones del hipocampo. La proliferación celular se lleva a cabo en la CSG del GD, la cual se encuentra localizada en la interfase entre la CG y el hilus. Las células migran de la CSG hacia la CG, mientras se diferencian a neuronas maduras. En el panel inferior observamos la secuencia de fenotipos celulares involucrados en el desarrollo neuronal junto con los marcadores que permiten su identificación. (Tomado de Abreus y le Moal 2005; DG: giro dentado, CG: capa granular, CSG: capa subgranular)

Debido a que el hipocampo es una estructura con una alta concentración de GCR y los efectos del estrés sobre la neurogénesis del GD pueden ser prevenidos mediante la adrenalectomía [73, 74], el tratamiento con antagonistas de GC [75] o el bloqueo crónico de los receptores a CRF: CRF1 y V1B [76] se ha propuesto que el efecto del estrés sobre la neurogénesis hipocampal podría ser causado directamente por las altas concentraciones de GC durante la activación del eje HPA [67, 72, 75, 77-79].

IV. ANTECEDENTES

La separación maternal (MS) en ratas es el modelo experimental más utilizado para estudiar los efectos de las experiencias adversas durante las etapas tempranas de la vida [80-82]. Al analizar el comportamiento de los animales sometidos a MS en la etapa adulta, se ha visto que presentan un repertorio de alteraciones conductuales y neuroendocrinas similares a aquellas observadas en pacientes con depresión o ansiedad [83, 84].

Modelo Experimental.

La separación maternal (SM) en roedores se ha utilizado tanto como un modelo de estrés crónico (separación maternal periódica) como un modelo de estrés agudo (SM aguda). La SM periódica consiste en una separación diaria con una duración de una (SM60) a 3 horas (SM180), mientras que la SM aguda consiste en mantener a las crías lejos de su madre por un periodo de 24 horas (SM24 hrs). En ambos casos las crías son removidas del cuidado de su madre por un tiempo determinado en algún momento durante las primeras dos semanas de vida. Se ha observado que en condiciones silvestres las madres nunca permanecen separadas de sus crías por más de 15 min, por lo que se cree que periodos mayores a éste son percibidos por la cría como una amenaza a su supervivencia [85, 86]. Por esta razón la MS breve o menor a 15 min. no es un estímulo lo suficientemente fuerte como para desencadenar la activación del eje HPA, y no se

considera un evento adverso. En el caso de la SM prolongada, se ha demostrado que es necesario que las crías permanezcan un mínimo de 60 minutos separadas de su madre para desencadenar por completo la respuesta al estrés [87-90].

Durante la etapa postnatal, la madre se encuentra continuamente limpiando y acicalando a la progenie [91]. Este tipo de estimulación es crucial para el desarrollo neurológico de las crías y se encuentra estrechamente relacionada con la respuesta neuroendocrina al estrés en el adulto y la conducta de ansiedad. Se ha observado que la progenie de madres que limpian y acicalan poco a sus crías, son más vulnerables al estrés en el adulto y viceversa y este efecto puede ser emulado por la estimulación táctil realizada por el investigador [92]. Por ello, la SM es uno de los estresores más potentes a los cuales se puede exponer a las crías durante el periodo postnatal, ya que esta, no solo los priva de la estimulación proveniente de la madre, sino que también afecta el comportamiento materno al momento de la reunión con la camada [90],

Respuesta Neuroendocrina Postnatal a la SM.

Durante la ontogenia el estado de maduración del eje HPA lo vuelve más vulnerable a ser “programado” por la influencia de la experiencia temprana. En roedores, el espacio de tiempo que va del día postnatal (PND) 4 al 14, se ha denominado “periodo hiporesponsivo al estrés” (SHRP) y se caracteriza por una falta de liberación de GC en respuesta a muchos estímulos que son considerados estresores en el adulto [90]. Se ha propuesto que la inhibición constante y sostenida del eje HPA durante este periodo, permite la organización correcta de las estructuras del SNC que controlan la respuesta al estrés y en consecuencia una reactividad normal del eje en el adulto [73, 93, 94]. La SM es un evento

adverso lo suficientemente fuerte como para sobrepasar los mecanismos inhibidores del SHRP y activar la respuesta del eje HPA [93, 95, 96] (Figura 4). En la cría, a diferencia de los adultos, la activación de la respuesta de ACTH y CORT al estrés depende principalmente de AVP más que de CRH [97-99]. Además de que durante el SHRP las respuestas centrales de CRH y AVP a estresores moderados se encuentran presentes aún cuando el resto del eje se encuentra atenuado [100]. Por otro lado se ha observado que durante el SHRP los estresores moderados como la inmovilización no logran activar la respuesta del eje HPA por si solos, pero sí lo hacen en aquellas crías que han sido sometidas a SM180. Esta activación de la respuesta del eje HPA va acompañada de una desregulación de los sistemas de AVP y CRH en el NPV [101] por lo que se ha propuesto que estos neuropéptidos modulan de forma sinérgica la respuesta al estrés durante la ontogenia.

Debido a que los GC pueden ejercer efectos deletéreos sobre el desarrollo del hipocampo y el SNC en general [32, 73, 93, 94, 102-104], se ha propuesto que la elevación crónica de CORT debida a la exposición continua a la SM podría causar alteraciones en la ontogenia del hipocampo y de esta forma programar la actividad del eje HPA en el adulto [19, 99, 105] (Figura 4). Si bien, la respuesta de la cría a un episodio agudo de SM (24 hrs) ha sido ampliamente descrita, existen pocas evidencias que determinen el efecto de la SM sobre la actividad basal del eje HPA durante el SHRP. Por un lado, se ha mostrado que al PND7 crías sometidas a SM no presentaban diferencias en los niveles basales de CORT al compararlos con el grupo SM15, pero que estas concentraciones aumentan en respuesta a la separación [106].

Alteraciones Fisiológicas causadas por la SM.

Originalmente se demostró que los periodos de SM largos causan una serie de alteraciones conductuales y cardiacas en el neonato [107, 108]. Mientras que las respuestas conductuales (ej: aumento de vocalizaciones ultrasónicas) son consecuencia de los trastornos neuroendocrinos ocasionados por la falta de contacto con la madre, las alteraciones cardiovasculares y metabólicas, como la disminución en el ritmo cardiaco, son ocasionadas por deficiencias nutricionales [90]. Por esta razón se ha propuesto que la SM24 es un modelo de estrés agudo que involucra tanto el componente neuroendocrino como el nutricional. Por el contrario la SM periódica (SM180, SM120, SM60) es un modelo que no involucra el factor nutricional, ya que las crías no permanecen lejos de la madre por periodos lo suficientemente largos como para alterar su ciclo alimenticio [109]. A largo plazo, los animales sometidos a SM presentan un gran repertorio de alteraciones fisiológicas y conductuales.

a) Neuroendocrinas:

Una de las principales alteraciones a largo plazo que se observan en los animales sometidos a SM es una desregulación del eje HPA y su capacidad de responder al estrés en la etapa adulta, y se ha propuesto que esta desregulación es una de las causas de las alteraciones fisiológicas y del comportamiento que se observan en el adulto.

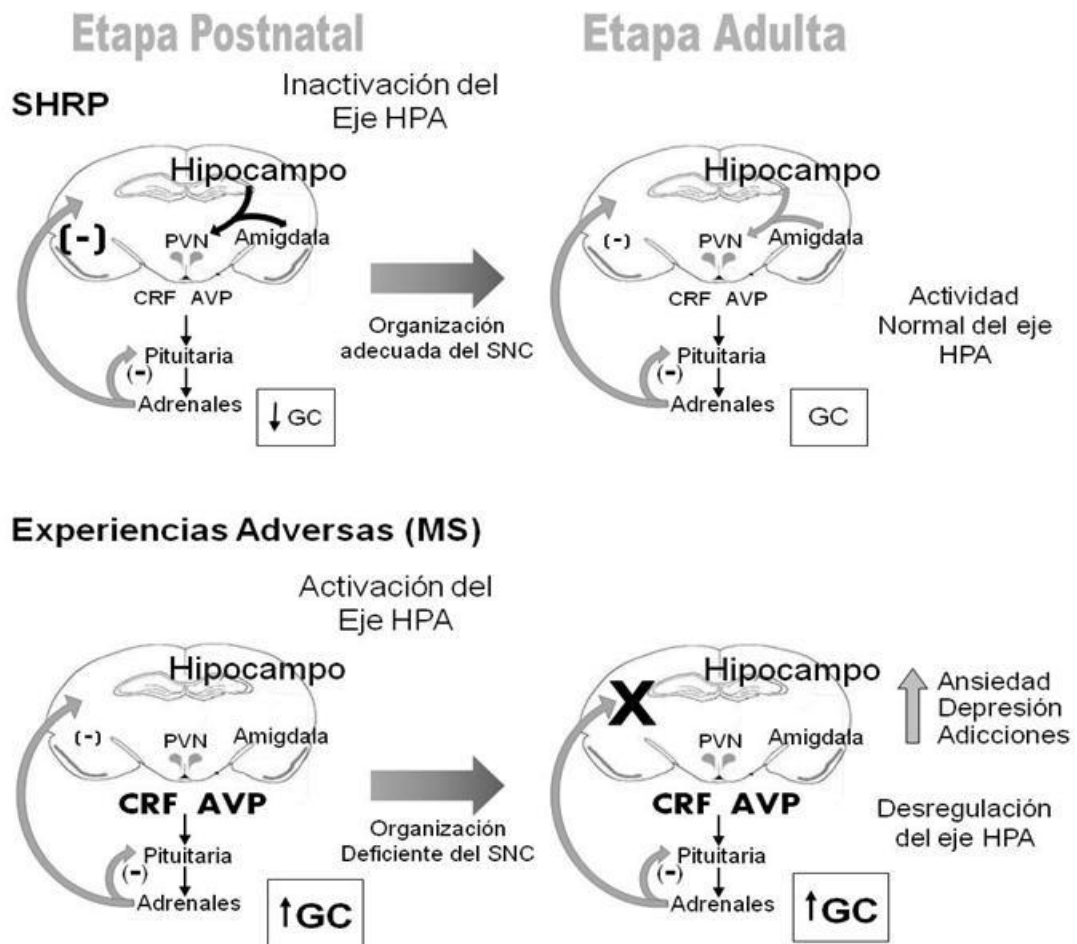


Figura 4: Modelo teórico del efecto de la SM sobre la actividad del eje HPA durante el SHRP y las consecuencias neuroendocrinas a largo plazo. En condiciones normales las concentraciones de GC se encuentran disminuidas debido al mecanismo protector del SHRP, esto permite la adecuada organización del SNC y las estructuras encargadas de la modulación del eje HPA. La SM causa una elevación en la respuesta de CRH y AVP en el NPV del Hipotálamo de las crías, lo cual repercute en una elevación crónica de los niveles de GC y una organización deficiente del SNC. Esto causa una deficiencia en el asa de retroalimentación negativa del eje HPA en el adulto, lo cual repercute en una hiper – actividad / hiper – reactividad del eje. (SHRP: periodo hiporesponsivo al estrés; HPA: hipotálamo – Hipófisis – Suprarrenales; CRF: factor liberador de corticotropina; AVP: arginina- vasopresina; PVN: núcleo paraventricular, GC: glucocorticoides).

Los animales sometidos a SM muestran una mayor tasa de actividad del eje HPA en condiciones basales [110-112] y en respuesta al estrés [113-116]. Este aumento en la respuesta neuroendocrina al estrés va acompañado de un aumento en los niveles de mRNA a CRH en el núcleo PVN del hipotálamo [116]. En casi todos los casos estos efectos persisten a lo largo de la vida y van acompañados de un aumento en los niveles hipotalámicos de mRNA a CRH y AVP [19, 117,

118]. La regulación negativa de la síntesis de los factores liberadores de ACTH es controlada, en parte, por el asa de retroalimentación negativa en la cual los niveles de GC circulantes actúan a diferentes niveles del SNC para disminuir la expresión de los genes de CRH y AVP. Las experiencias durante la vida temprana, como la SM, pueden afectar la densidad y expresión génica de los GCR en el SNC y de esta forma regular la síntesis de CRH y AVP [19, 119, 120]. Adicionalmente se ha observado que cuando estas diferencias en la densidad de GCR se revierten de forma transitoria, también lo hacen las diferencias en la reactividad del eje HPA [90], por lo que se propone que la SM causa alteraciones en el sistema de retroalimentación negativa del eje HPA tanto a nivel del NPV como en el hipocampo [19, 121] que ocasionan una desregulación en la función del eje HPA en el adulto.

b) Sistema Nervioso Central:

Se cree que la hiper-reactividad del eje HPA observada en los animales SM, podría ser causada por una mayor respuesta de CRF a nivel del Hipotálamo [90], ya que se ha observado un aumento en la concentración del mRNA a esta hormona en el PVN de animales adultos [122, 123] .En estos animales también se ha visto que existe una disminución en la densidad de receptores a GC en el PVN, por lo que se ha propuesto que existen deficiencias en la retroalimentación negativa del eje, que dan origen a las respuesta exacerbadas al estrés [19, 122].

HIPOCAMPO Y SM

Se observado que las manipulaciones postnatales como la SM y la SM15 modifican la densidad de GCR en el hipocampo y la corteza prefrontal [19, 123] y

una disminución en la densidad de las fibras musgosas de la región CA3 del hipocampo [106] y el marcador de plasticidad sináptica NCAM [124]. El tratamiento con antagonistas de GCR y adrenoreceptores revierten completamente estas deficiencias cognitivas, por lo que se propone que el efecto de la SM podría ser mediado por estos sistemas [122]. Adicionalmente, se sabe que la actividad del receptor a GC nuclear en esta región del hipocampo puede ser regulada por el ambiente y que esta modulación se ve alterada en los animales sometidos a SM. [120].

Se ha propuesto uno de los mecanismos responsables de los efectos a largo plazo de la SM podría ser la disminución de la neurogénesis hipocampal [72]. Los animales sometidos a SM se caracterizan por una disminución en la neurogénesis [125, 126] y el número de células [127] de la capa granular del GD, así como del número total de células en el hipocampo adulto [128]. En 2004, Mirescu y colaboradores demostraron que la SM causa una disminución en la proliferación de neuronas inmaduras del giro dentado en ratas adultas y que este efecto se puede revertir disminuyendo los niveles de glucocorticoides por debajo del control. Además estos estudios mostraron que la SM reduce el número de neuronas inmaduras, pero no de neuronas maduras, que se incorporan al GD en el adulto [126]. Por otro lado también se demostró que la disminución en la neurogénesis inducida por la SM puede ser bloqueada en animales adrenalectomizados, por lo que se propone que la CORT podría ser un factor mediador esencial del efecto observado en los animales sometidos a SM en el adulto. Este efecto puede ser causado por una hipersensibilidad de los precursores neurales hipocampales a la CORT.[126].

Mientras que el efecto de la SM sobre la estructura y función hipocampal en el adulto está ampliamente descrito, aun es poco claro el efecto que esta ejerce durante la ontogenia. Se ha mostrado la SM del PND1 al 21 disminuye el número de células no marcadas contra el marcador neuronas maduras NeuN ni el marcador de células gliales GFAP en la CSG del GD al PND21 [127] cuando las crías se encuentran fuera del SHRP y próximas al destete.

c) Alteraciones Conductuales causadas por la SM:

Conducta de ansiedad

En roedores, las principales pruebas conductuales para evaluar la conducta de ansiedad son: el laberinto elevado en cruz (EPM) y la prueba del campo abierto (OF). En ambas pruebas se expone al animal a un conflicto emocional entre su necesidad de permanecer en lugares oscuros y protegidos, y su necesidad innata de explorar su ambiente, de tal forma que una conducta de menor exploración/movilidad se asocia con una mayor conducta de ansiedad [129]. Es ampliamente aceptado que la SM afecta la respuesta de ansiedad evaluada mediante ambas pruebas [80, 84, 113, 130]. Sin embargo, aún existe una gran cantidad de discrepancias a lo largo de los datos concernientes al comportamiento de ansiedad en los animales sometidos a SM [125, 131-133].

Conducta depresiva.

Se ha observado que la SM causa un comportamiento parecido a la depresión desde etapas juveniles [84] y que prevalece hasta la edad adulta [84, 90, 134]. Estos animales mostraron una disminución en la actividad exploratoria en la prueba del campo abierto, lo cual también está relacionado con un aumento en la conducta tipo depresiva [84]. En la prueba del nado forzado se ha observado que

los animales sometidos a SM durante la etapa postnatal presentan un mayor tiempo de inmovilidad, lo cual se interpreta como una estrategia más pasiva en respuesta al estrés y por lo tanto una conducta tipo depresiva [84, 122, 135] y no muestran desesperanza aprendida al segundo día de prueba [84].

Por otro lado, los machos sometidos a SM durante la etapa postnatal son más vulnerables en un modelo de inducción de síndrome de estrés post-traumático o PTSD [136], pero esta vulnerabilidad no aumenta cuando se presenta la SM sumada a la exposición a un evento estresor en la vida adulta [137].

Aprendizaje y memoria.

La SM periódica durante la etapa postnatal causa una disminución moderada en el aprendizaje espacial evaluado mediante el laberinto acuático de Morris [90], [122, 126] el cual se encuentra relacionado con una disminución en las fibras musgosas del hipocampo [90]. También se ha observado que los animales sometidos a SM muestran deficiencias cognitivas en la prueba del reconocimiento de objetos [122] las cuales podrían ser explicadas por la disminución en la neurogénesis del Giro Dentado del Hipocampo que se observa en estos animales [138].

A pesar de que los efectos de la SM sobre el hipocampo y la actividad del eje HPA del adulto han sido ampliamente caracterizados, los mecanismos del neurodesarrollo de esta programación no han sido determinados. Debido a que las concentraciones elevadas de GC causadas por la activación de la respuesta al estrés pueden alterar la estructura y función hipocampal, Se ha propuesto que la exposición a experiencias adversas durante las etapas tempranas de la vida causa alteraciones en la reactividad del eje Hipotálamo - Hipófisis –Suprarrenales

(HPA) mediante una elevación crónica de los niveles de Glucocorticoides (GC) durante periodos específicos del desarrollo. Esta elevación de GC durante las etapas más sensibles podría afectar la ontogenia del hipocampo y de esta forma alterar el asa de retroalimentación negativa del eje HPA, Sin embargo esta hipótesis no ha sido demostrada ya que no existen estudios que evalúen de forma detallada el efecto de la SM sobre la ontogenia de esta estructura y la respuesta neuroendocrina del neonato durante el periodo de tiempo en el cual las crías son sometidas al estrés.

V. HIPÓTESIS

La exposición a experiencias adversas durante las etapas tempranas de la vida causa alteraciones en la reactividad del eje HPA debidas a una deficiencia en la modulación negativa del eje a nivel hipocampal. En el presente trabajo proponemos que el estrés por separación maternal periódica perjudicara el desarrollo del hipocampo, influenciando la sobrevivencia de las células granulares recién generadas, sin elevar crónicamente los niveles de GC circulantes. Esto contribuirá a la programación de la actividad del eje HPA y resultará en alteraciones conductuales y neuroendocrinas en el adulto.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto de la activación del eje HPA causada por la Separación Maternal (SM) sobre la ontogenia del hipocampo así como sus efectos neuroendocrinos y conductuales en el adulto

Objetivos Particulares:

1. Evaluar el efecto de la SM sobre la ontogenia del hipocampo.

1.1. Realizar una estimación estereológica del número y la densidad de los núcleos marcados con Bromodeoxiuridina (BrdU) que sobreviven en el GD del hipocampo de crías de 15 días de edad (PND15) control y sometidas a separación maternal (SM).

1.2. Determinar el fenotipo celular de los núcleos marcados con BrdU que sobreviven en el GD del hipocampo al PND15 .

1.3. Evaluar el efecto de la SM sobre la distribución septo-temporal de las células marcadas con BrdU que sobreviven en el GD del hipocampo de crías de 15 días de edad (PND15) control y sometidas a separación maternal (SM)

2. Evaluar el efecto de la SM sobre la actividad del eje HPA durante el desarrollo.

2.1. Evaluar el efecto de la SM sobre la curva de crecimiento posnatal y el peso corporal, la talla y el peso relativo de las glándulas suprarrenales y el timo al PND15.

2.2. Determinar la concentración basal de CORT en sangre troncal al PND 3, 6, 9 y 12 de crías control y sometidas a SM

2.3. Determinar las concentraciones de CORT en respuesta al estrés en sangre troncal antes (PND3) y durante el periodo hiporesponsivo al estrés (PND12) de crías control y sometidas a SM

3. Confirmar las alteraciones neuroendocrinas y conductuales causadas por la SM en el adulto.

3.1. Determinar la concentración de CORT basal y en respuesta al estrés en animales adultos control y sometidos a SM.

3.2. Evaluar la conducta tipo depresiva y la conducta de ansiedad de los animales adultos control y sometidos a SM en la prueba de nado forzado y el laberinto elevado en cruz.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron camadas de ratas (*rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawlwy control (CONT) y sometidos a separación maternal (SM). El día de nacimiento se designó como día postnatal (PND) cero. Al PND1 se determinó el sexo de las crías y las camadas fueron ajustadas a 8. La mitad de las camadas se utilizaron como control y permanecieron sin perturbar durante todo el periodo anterior al destete excepto para la limpieza rutinaria de cajas. El resto de las camadas se sometieron a un esquema de separación maternal periódica (SM, Figura 5).

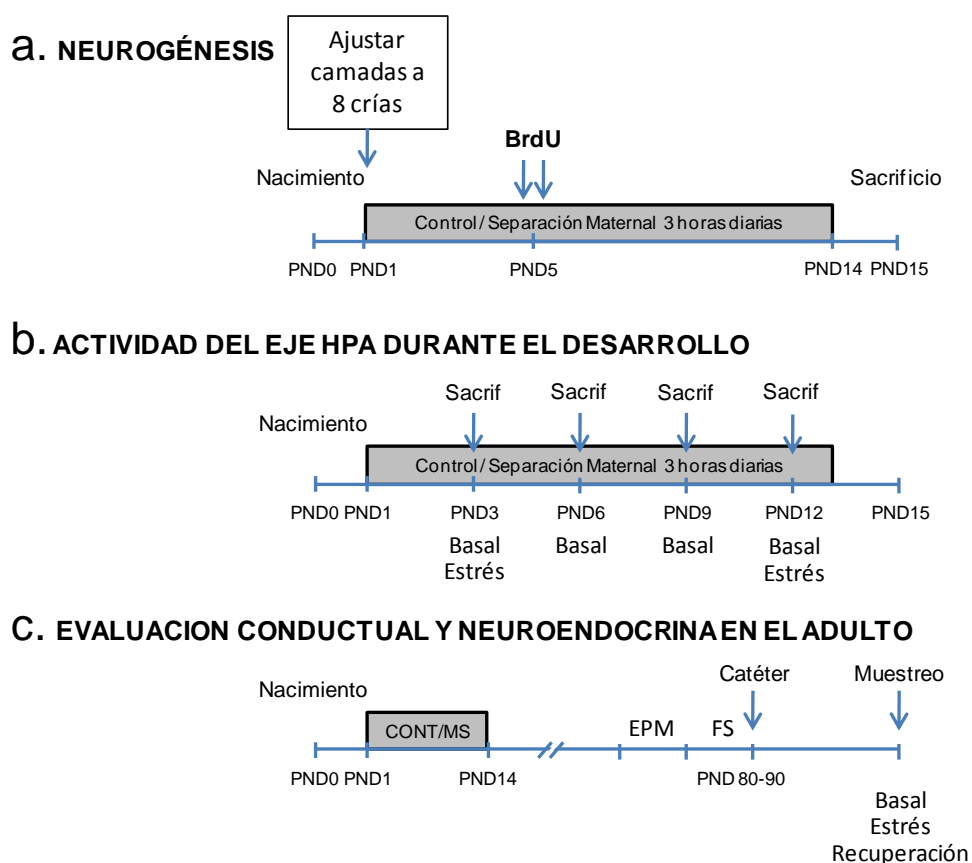


Figura 5: Diseño experimental. Línea de tiempo representando el diseño experimental para a) la administración de BrdU y la evaluación del efecto de la SM sobre la neurogénesis hipocampal; b) la actividad del eje HPA durante el desarrollo y c) la evaluación neuroendocrina y conductual de los animales adultos. (PND: día postnatal, BrdU: Bromodeoxiuridina HPA: Hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenales, CONT: control, SM: separación maternal, EPM: laberinto elevado en cruz y FS: prueba de nado forzado.)

Para la SM las camadas completas fueron separadas de su madre diariamente por tres horas del PND1 al PND14 (9:00 a 12:00 aprox.). Con el objetivo de evaluar el efecto de la SM sobre la ontogenia del hipocampo los animales fueron inyectados con Bromodeoxiuridina (BrdU) al PND5 y se dejaron sobrevivir por diez días más (Figura 5a). Adicionalmente se utilizaron grupos de crías CONT y SM sacrificadas al PND3, PND6, PND9 y PND12 para la determinación de la actividad postnatal del eje HPA (Figura 5b). Al día del sacrificio se determinó el peso y la talla de las crías para monitorear su desarrollo postnatal. Adicionalmente se consideró el peso de las glándulas suprarrenales y el Timo como parámetros de estrés. Un grupo adicional de camadas se dejó sobrevivir hasta la etapa adulta para la evaluación conductual y neuroendocrina (Figura 5c).

VIII. MATERIALES Y METODOS

Animales y separación maternal.

Se utilizaron camadas de ratas de la cepa Sprague.Dawley para todos los experimentos. En cada camada el número de animales se ajustó a 8 después del nacimiento (4 hembras y 4 machos) para disminuir los efectos del tamaño de la camada y la competencia por el alimento. Los animales tuvieron libre acceso a comida y agua y se les mantuvo en un cuarto con temperatura y luz controlada de acuerdo a las normas nacionales e internacionales de uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, NRC-USA[139]). El día de nacimiento se consideró como PND0. Al PND1 las madres fueron separadas brevemente del nido con la ayuda de un panel y se determinó el sexo y número de las crías. Posteriormente, las camadas completas fueron separadas en una caja de acrílico con aproximadamente 2 cm de una mezcla de aserrín y material del nido de la madre por tres horas diarias desde el PND1 hasta el PND14 en un cuarto independiente a la colonia y a temperatura controlada (30-35°), mientras que los animales control permanecieron sin perturbar con su madre hasta el destete, excepto para la limpieza rutinaria de cajas.

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la guía del Instituto de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el cuidado y uso e animales de laboratorio (Publicación NIH No. 80-23, 2008) y la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-Z00-1999) de Especificaciones Técnicas para el

Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. El protocolo de Investigación fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

Evaluación de la neurogénesis hipocampal durante la ontogenia.

Imunohistoquímica (ICQ)

Los animales se inyectaron con una doble dosis de Bromodeoxiuridina (BrdU, 50mg/Kg.) al PN5 y se sacrificaron al PN15 con una sobredosis de pentobarbital sódico (45 mg. /Kg. de peso corporal). Posteriormente fueron perfundidos por vía cardiaca con 200ml de solución salina (NaCl 0.9%) y fijador (Paraformaldehído 4% en amortiguador de Fosfatos 0.1M, pH 7.4). Se extrajeron los cerebros y se colocaron en fijador por 24 horas y posteriormente se lavaron dos veces con Amortiguador de Fosfatos (PB 0.1M, pH 7.4) y se colocaron en una solución de sacarosa al 30% en PB hasta su procesamiento. Los cerebros se congelaron y se obtuvieron cortes sagitales seriados de 40µm de grosor en un criostato a -22°C y se colocaron en solución crioprotectora (Glicerol 25%, Etilenglicol 25%, PB 50%) hasta la inmunotinción.

Se estandarizaron las inmunocitoquímicas (ICQ) sencilla para BrdU y doble para el marcador de neuroblastos doblecortina (DCX) y BrdU (BrdU-DCX), el marcador de neuronas maduras NeuN y BrdU o el marcador de células gliales GFAP y BrdU. Las rebanadas fueron pre-tratadas con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (Sigma) en amortiguador de fosfatos con tritón (PBT 0.1M, tritón X-100 0.3%) para bloquear las peroxidasas endógenas. Posteriormente se agregó una solución de formamida al 50% en Buffer de Citratos (2xSSC: 0.3M NaCl,

Citrato de Sodio 0.03M) a 67°C y HCl 1N a 37°C para desnaturalizar y exponer el DNA, como previamente se ha descrito (Mendoza-Torreblanca y cols. 2007). Al finalizar el pre-tratamiento las rebanadas fueron incubadas en amortiguador de boratos (0.1M, pH 8.5) para regresarlas a pH fisiológico y se realizó una ICQ contra BrdU (Mouse anti BrdU, Roche Molecular, 1:10 000, 48 hrs a 4°C) utilizando un anticuerpo secundario acoplado a biotina (Goat anti Mouse 1:750, Vector Laboratories); o una doble ICQ para BrdU-DCX (Goat anti human Dcx, 1:1000, Santa Cruz. CA, 48 hrs a 4°C), para BrdU-NeuN (Ms anti NeuN, 1:10,000, Chemicon-Millipore, 48 hrs a 4°C) o para BrdU-GFAP (Rbt anti GFAP, 1:10,000 Chemicon-Millipore, 48 hrs a 4°C); utilizando un anticuerpo secundario biotinilado (rbt anti Goat, 1:750, Chemicon: Dky anti Ms 1:750, Vector o Goat anti rbt, 1:750, Sigma.). A todas las ICQ se les realizó una amplificación con avidina-biotina (Elite ABC kit, Vector Laboratories.) y se revelaron con el método de la peroxidasa utilizando como sustrato Ni-DAB para BrdU, DAB para Dcx o NeuN (Hoffman y cols., 1992) y NovaRed TM (Vector) para GFAP. Todo el proceso se realizó por flotación a temperatura ambiente.

Conteo celular.

Se realizó un muestreo sistemático aleatorio a lo largo de todo el plano sagital del hipocampo (eje septo-temporal) de las crías CONT (n = 7) y SM (n = 7) diez días después de la inyección con BrdU (Figura 6). Este muestreo consiste en seleccionar de manera aleatoria una serie de cortes (240 µm de distancia entre cada uno) de cada rata, de tal forma que todas las partes de la estructura tengan la misma probabilidad de ser evaluadas. Para esto se obtuvieron cortes sagitales de 40µm de grosor de todo el hipocampo y se colocaron de forma secuencial en

12 tubos de microcentrifuga conteniendo solución crioprotectora (25% etilenglicol, 25% glicerol, 50% buffer de fosfatos). Posteriormente se selecciono una serie de uno de cada seis cortes (ej: tubo 1 y 7) de cada rata mediante un sorteo (Figura 6) para la ICQ. Al terminar el protocolo de ICQ los cortes se colocaron sobre laminillas y se montaron con Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific). Las laminillas se observaron con un microscopio de campo claro (Axioscope, Karl Zeiss) y un objetivo de 40X. Se obtuvieron datos de las hojas ventral y dorsal del GD y sus áreas correspondientes así como de la zona rostral del Hilus. La evaluación del área (mm²) de la capa Granular y Subgranular del GD se realizó mediante el sistema de análisis de imágenes Axiovision Rel 4.0 (Karl Zeiss) y el uso de un objetivo 5X. Se utilizaron estos datos para calcular el volumen de la capa granular del GD mediante el principio de Cavalieri; en el cual el volumen de una muestra

se puede estimar mediante el uso de la fórmula: $V_{(e)} = T \sum_{\ell=1}^n A_{\ell}$. Donde el volumen es la suma de las áreas de cada corte con un grosor T (40µm) multiplicado por la distancia de muestreo (240µm). La densidad total de células marcadas contra BrdU (No de cels/mm³) fue estimada mediante el uso de la fórmula: $N_v = Q_{-}/ah$, donde Q_{-} es el número de núcleos positivos, a es el área de cada corte y h es la distancia entre cada corte (240µm) [127, 140].

Para la evaluación del efecto de la SM sobre la región del Hilus calculamos la densidad promedio de células marcadas contra BrdU en la zona rostral del Hilus mediante la división del conteo de núcleos positivos sobre su área correspondiente (No cels/mm²).

Adicionalmente se analizó la distribución de las células marcadas contra BrdU a lo largo del eje septo – temporal de la capa granular y subgranular del GD. Para esto

se utilizaron los datos de las estimaciones del No de núcleos positivos y la densidad de cada corte iniciando en la coordenada 4.2L (Figura 6) y considerando como factor la localización en el eje septo – temporal (No de corte) de cada una de las secciones.

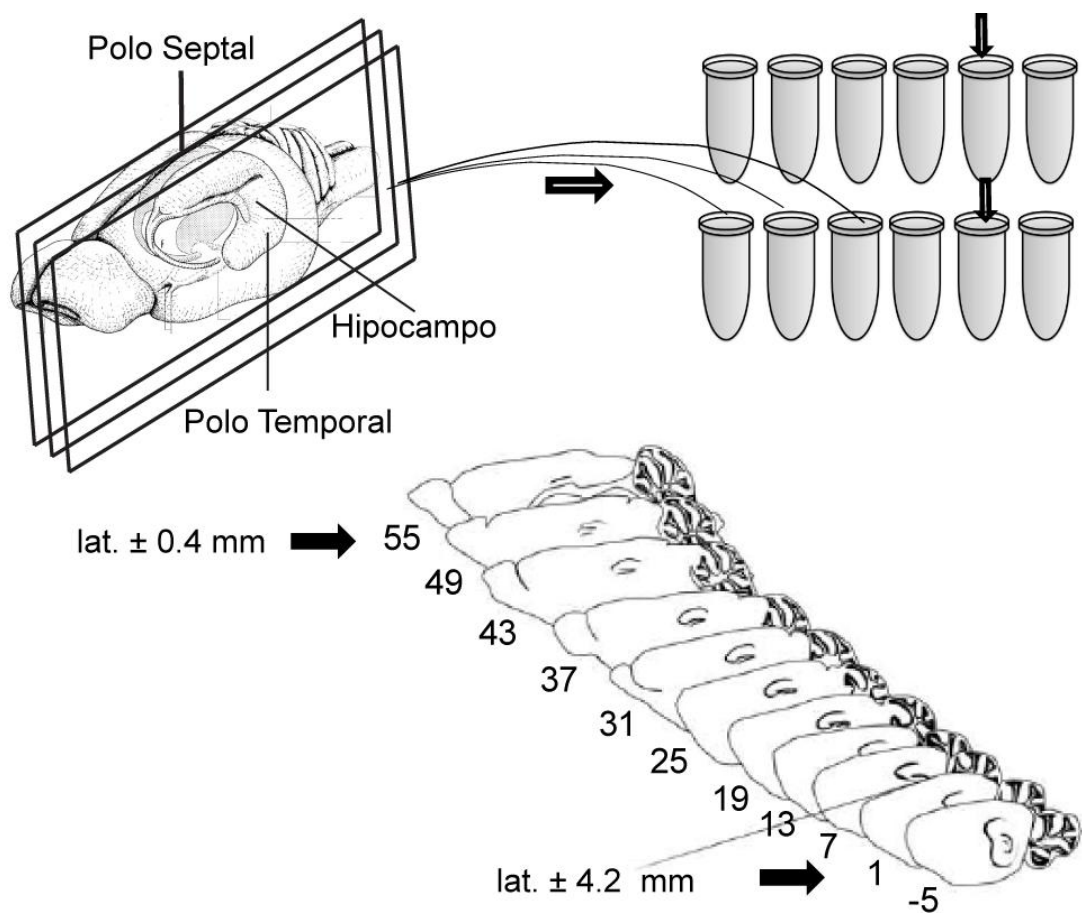


Figura 6: Análisis sagital a lo largo del eje septo – temporal del hipocampo. Diagrama esquematizado de la obtención de una serie de cortes sagitales a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo. En la parte superior se muestran las secciones temporales del GD (inicio de la numeración) mientras que en la parte inferior se muestran las secciones septales del GD. Las flechas representan el rango de secciones utilizadas para el análisis (desde lateral ± 4.2 hasta ± 0.4 mm; GD: Giro Dentado).

ACTIVIDAD DEL EJE HPA DURANTE EL DESARROLLO.

Se obtuvieron muestras de sangre troncal de animales CONT y SM sacrificados por decapitación al PND3 (n = 5), PND6 (n = 5), PND9 (n = 5) y PND 12 (n = 5) en condiciones basales. Grupos adicionales de camadas se utilizaron para la determinación de la magnitud de la respuesta al estrés antes del inicio del SHRP (PND3) y durante el SHRP (PND12). Para esto las crías CONT y SM (n = 4 por grupo) fueron sacrificadas por decapitación después de someterse a un episodio de estrés por separación maternal (3hrs, 37°C en un cuarto independiente a la colonia). Las muestras de sangre se colectaron en tubos conteniendo 5µl de EDTA al 8% y 15µl de aprotinina, se centrifugaron por 10 min (2X, 5000rpm, 4°C) para separar el plasma y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

EVALUACION NEUROENDOCRINA EN EL ADULTO.

Los animales machos CONT y SM adultos (PN70-80) fueron implantados con un catéter en la vena yugular para la recolección de muestras de sangre. El día de la cirugía los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (80 mg/kg) más Xilacina (6 mg/kg) y se les realizó una incisión de aproximadamente 1 cm de largo sobre la clavícula para disecar la vena yugular. Se insertó un catéter de 10 cm de longitud (sylastic, 2cm, Tubería de polietileno 1mm OD, 8 cm) lleno con heparina en solución salina (100u/ml), en la vena yugular interna derecha y se aseguró con hilo de seda negra (3-0). El extremo libre se extrajo por la nuca y se aseguró fuera del alcance de la rata. Los animales fueron manipulados diariamente para habituarlos al manejo y se dejaron recuperar. Una semana después de la implantación del catéter los animales se sometieron a un periodo de 15 minutos de estrés por inmovilización y se tomaron muestras de sangre basales,

5, 15 y 60 min. posteriores al estrés. Las muestras de sangre se colectaron en tubos conteniendo 5 μ l de EDTA al 8% y 15 μ l de aprotinina, se centrifugaron por 10 min (2X, 5000rpm, 4°C) para separar el plasma y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

ENSAYOS HORMONALES (ELISA).

Las concentraciones de CORT. se analizaron por el método de ELISA mediante el uso de un estuche comercial (Corticosterone Immunoassay kit, Assay Designs) con el protocolo modificado para muestras de volumen pequeño de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Brevemente: las muestras de plasma provenientes de crías se diluyeron 20 veces en solución de ensayo (assay buffer) y se les agregaron 10 μ l de reactivo para desplazar esteroides (SDR). Las muestras de plasma proveniente de adultos se diluyeron 40 veces en la misma solución y se les agregaron 5 μ l de reactivo SDR. Posteriormente se colocaron en una caja de 96 pozos junto con los controles correspondientes (blanco: solución de ensayo) y la curva estándar. A todos los pozos menos el blanco se les agregó 50 μ l de solución de conjugado y 50 μ l de solución con un anticuerpo primario anti CORT de rata. Las muestras se dejaron incubar 2 hrs a TA en agitación (500rpm) y se lavaron 5 veces con solución de lavado (wash buffer). A los pozos secos se les agregó 50 ml de solución de revelado (PNpp substrate) durante una hora. Para detener la reacción se utilizó 50 ml de solución stop. Leer a 405nm con una corrección a 570-560.

EVALUACION CONDUCTUAL EN EL ADULTO

Laberinto elevado en cruz

Este laberinto (EPM, por sus siglas en inglés) ha sido validado para la detección de respuestas emocionales a sustancias ansiogénicas y ansiolíticas (Pellow y cols, 1985). Esta prueba se basa en la creación de un conflicto entre la naturaleza exploratoria de la rata y su miedo innato a las áreas abiertas y expuestas. En esta prueba se toman en cuenta las entradas a los brazos abiertos o cerrados del laberinto, así como el tiempo que permanecen en dichos brazos. Las entradas pueden ser parciales o completas dependiendo de si el cuerpo del animal se encuentra totalmente dentro de un compartimento (completa) o si este únicamente lo explora con la cabeza y las extremidades superiores. En el laberinto en cruz elevada evaluamos los siguientes parámetros: a) Porcentaje de entradas a los brazos abiertos con respecto al total, b) Porcentaje de tiempo que los animales permanecen en el brazo abierto con respecto al tiempo total de la prueba (5 min), c) Número de entradas completas al brazo abierto y c) número de entradas al brazo cerrado (locomoción). El comportamiento de las ratas durante la prueba fue registrado mediante la ayuda de un programa de cómputo de manufactura casera (PLUSMAZE, MSDOS)

Prueba de Nado Forzado

La prueba del nado forzado es un ensayo ampliamente caracterizado para la evaluación de comportamientos depresivos así como la validación de sustancias antidepresivas en la rata. En esta prueba se evalúa si la rata mantiene una estrategia pasiva o activa en respuesta a un estresor; para esto se utilizó un cilindro de acrílico transparente de 30 cm de diámetro y 50 cm de altura, el cual se

llenó con agua destilada hasta los 40 cm a 21°C. El día de la prueba los animales se colocaron en el tanque por un periodo de 10 minutos durante los cuales se registró su comportamiento con la ayuda de un programa de cómputo de manufactura casera (EVENTLOG, MSDOS). En la prueba de nado forzado evaluamos el tiempo que los animales permanecen pataleando o escalando (romper activamente el plano del agua), nadando (movimiento de alguna de las extremidades) o en actitud de flotación (las cuatro extremidades inmóviles), al igual que la latencia a flotar.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se presentan como promedios \pm error estándar de la media de la muestra (n biológica). En los casos apropiados, se realizaron comparaciones estadísticas por la prueba de la t de student o por análisis de varianza seguidos por una corrección post-hoc de Tukey o Newman-keuls para las pruebas conductuales. Para el análisis sagital del hipocampo los datos fueron graficados como densidad o número de núcleos en cada sección del eje, se realizó una prueba de análisis de varianza utilizando el tratamiento y el número de sección como factores y una comparación post-hoc de Newmann-keuls. Un valor de $p \leq 0.05$ es considerado como estadísticamente significativo.

IX. RESULTADOS

1. LA SM ALTERA LA ONTOGENIA DEL HIPOCAMPO.

1.1. La SM disminuye la estimación estereológica del número de núcleos marcados con BrdU en el GD.

Al realizar la estimación del volumen de la capa granular del GD observamos una disminución del 12.22% en las crías SM con respecto a los animales control ($p \leq 0.05$. $n = 7$). Adicionalmente la estimación estereológica mostró una disminución del 25.5% en el número total de células marcadas con BrdU que sobreviven al PND15 en los machos SM comparados con las crías control ($p \leq 0.05$. $n = 7-8$, Figura 9c). Sin embargo no encontramos efecto significativo al evaluar la densidad total de células marcadas con BrdU por mm^3 ($p = 0.06$, $n = 7-8$, Figura 7d) en la CG ni en el Hilus (No cels / mm^2 ; Figura 7e, $p = 0.16$).

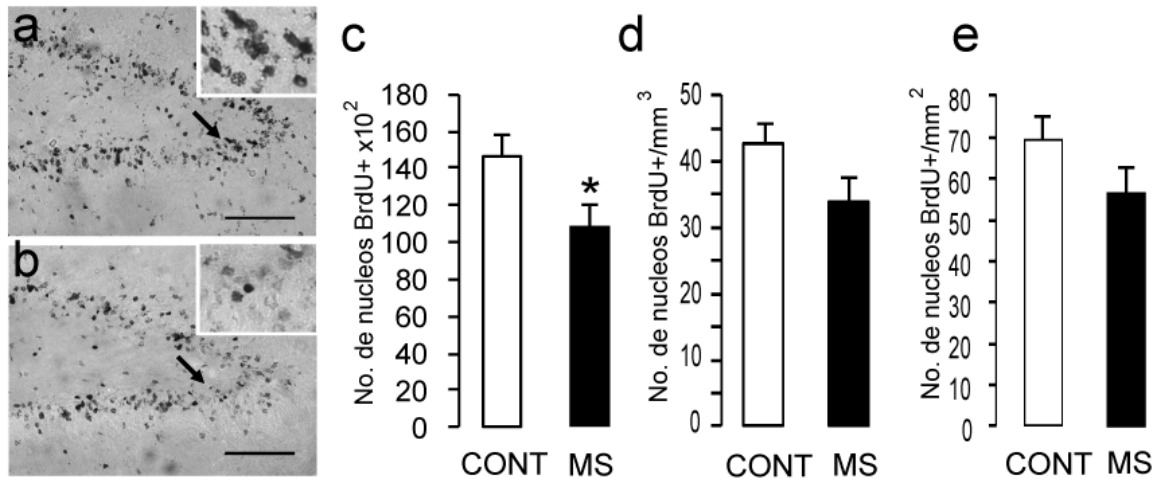


Figura 7: Efecto de la SM sobre el número de células marcadas contra BrdU que sobreviven en la capa granular del GD diez días después de la inyección. Imágenes representativas de una inmunotinción contra BrdU en crías macho de 15 días de edad a) control (CONT) y b) y sometidas a separación maternal (SM). c) Estimación del volumen del GD, d) el número total y e) la densidad de células (No de cels. /mm³) marcadas contra BrdU en el GD y f) en la zona rostral del Hilus (No de cels. /mm²). (Paneles: 40X, insertos 100X, barra de escala: 50μm, GD: giro dentado; Prom ± SEM, ANOVA * $p \leq 0.05$, $n = 7$)

1.2 Fenotipo celular.

Nuestros resultados muestran que al PND15 las células marcadas con BrdU que sobreviven diez días después de la inyección (PND5) se localizan principalmente en la capa granular y subgranular (CSG) del giro dentado (GD) en ambos grupos. Observamos que las células marcadas contra BrdU localizadas en la muestran poca co-distribución con el marcador de neuronas maduras NeuN (Figura 8a y b), sin embargo co-distribuyen principalmente con el marcador de neuroblastos Dcx. (Figura 8c y d) pero no con el marcador de células gliales GFAP (Figura 8e y f).

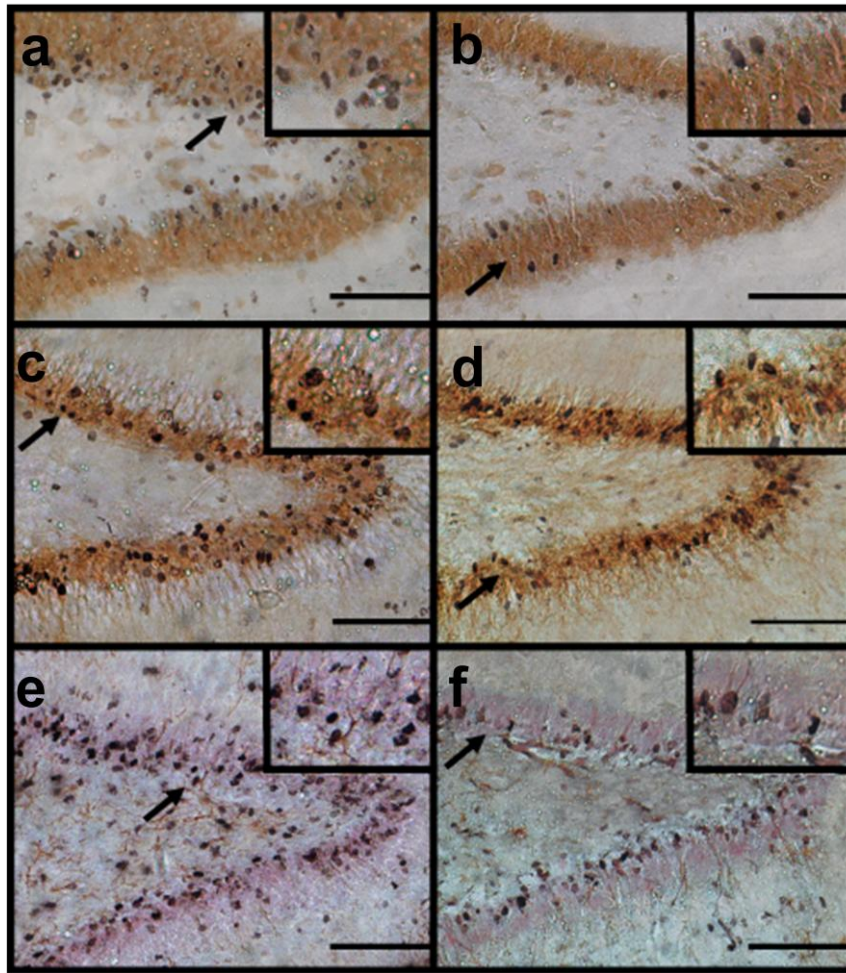


Figura 8: Fenotipo celular de los núcleos marcados contra BrdU que sobreviven en la CG y CSG del GD. a) y b) Doble inmunotinción contra BrdU (negro) y NeuN (naranja), c) y d) BrdU y Dcx (café) o e) y f) BrdU y GFAP (rojo) en crías CONT (paneles a, c y e) y SM (paneles b, d y f). (Paneles: 40X, insertos 100X, barra de escala: 100 μ m; BrdU: Bromodeoxiuridina, NeuN: proteína nuclear neuronal, Dcx: doblecortina, GFAP: proteína fibrilar ácida glial).

Nuestros resultados muestran que la SM disminuye la neurogénesis del GD del hipocampo desde la etapa postnatal (Figura 9a y b). El análisis por microscopía confocal mostró que en los animales control aproximadamente el 50% de las células marcadas contra BrdU co-localizan con el marcador de neuronas maduras NeuN y que la SM causa una disminución significativa en el porcentaje de células marcadas contra BrdU que co-localizan con este marcador (BrdU+/NeuN+; $p \leq 0.05$, $n = 4$) sin afectar el número de células que no co-localizan para BrdU+/NeuN- (Figura 9c).

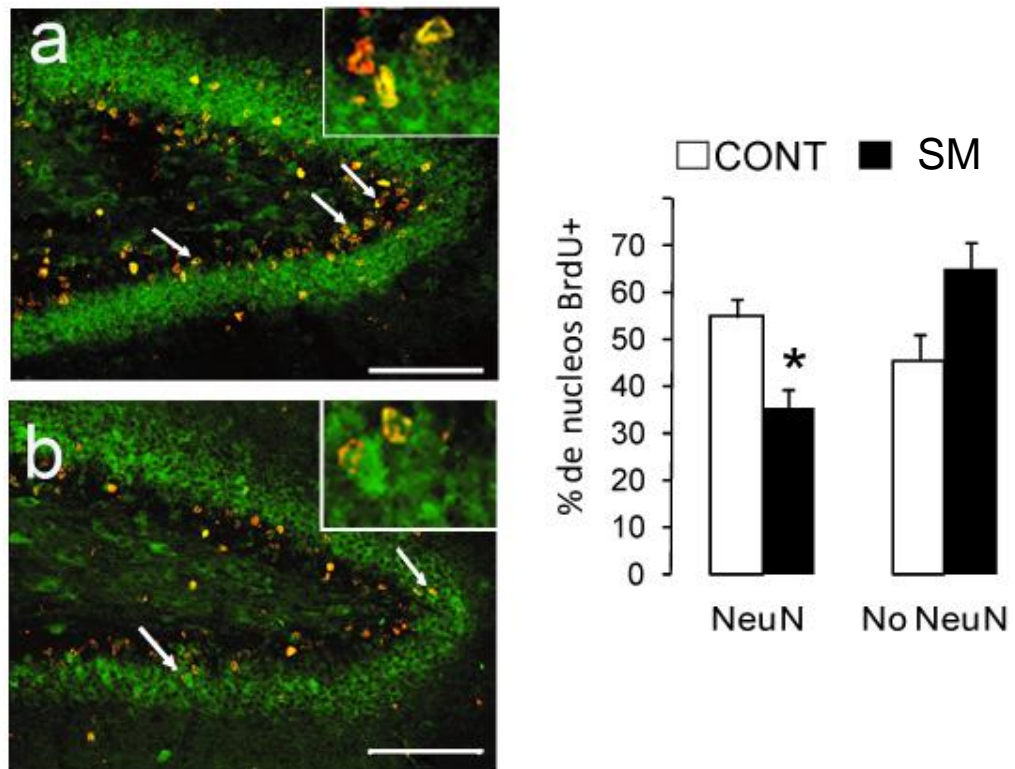


Figura 9: Efecto de la SM sobre la neurogénesis hipocámpal al PND 15. Imágenes de microscopía confocal de una doble inmunofluorescencia contra BrdU (rojo) y NeuN (verde) en crías a) CONT y b) SM. c) Efecto de la SM sobre el porcentaje de células marcadas contra BrdU que co-localizan para NeuN. (Paneles: 40X, insertos 100X, barra de escala: 100 μ m; SM: separación maternal, PND: día posnatal, BrdU: Bromodeoxiuridina, NeuN: proteína nuclear neuronal, CONT: control. Prom \pm SEM, * $p \leq 0.05$, $n = 4$)

1.3. Análisis en el eje septo-temporal.

Al graficar el número de células marcadas contra BrdU a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo observamos que el número de células es mayor en la región temporal del hipocampo y disminuye hacia la región septal (Figura 10b). La SM causó una disminución ($F_{1, 129} 41.5$; $p < 0.001$) en el número de células marcadas contra BrdU (Figura 11b) y a diferencia de lo observado al comparar la densidad promedio del hipocampo completo (No cels/mm³), encontramos un efecto altamente significativo de la SM sobre la densidad celular (No cels/mm²) al

realizar el análisis a lo largo del eje septo - temporal del hipocampo (Figura 10c; $F_{1, 139} 18.6$; $p < 0.001$). El análisis estadístico no mostró efecto del número de rebanada o la interacción en ninguno de los casos. De forma similar al realizar el análisis septo – temporal no encontramos efecto en la densidad de células marcadas contra BrdU en el Hilus ($F_{1, 147} 7.57$; $p = 0.068$)

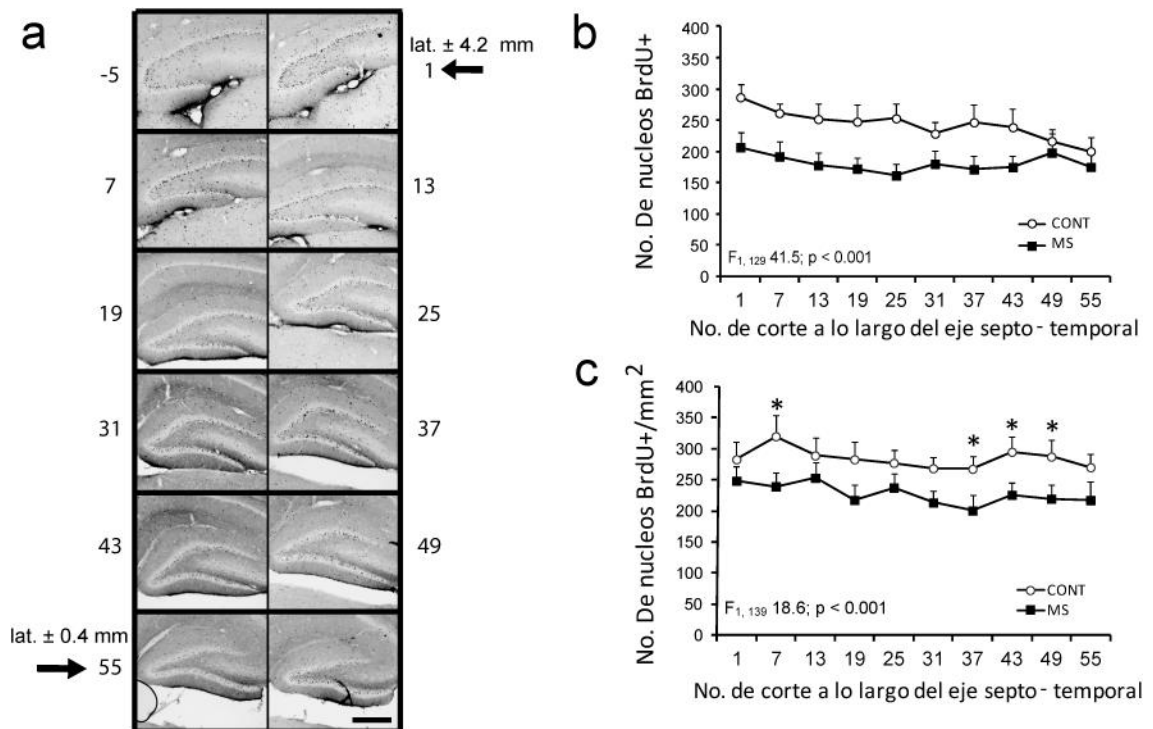


Figura 10: Análisis sagital a lo largo del eje septo – temporal del hipocampo. Imágenes representativas de una serie de cortes inmunoteñidos contra BrdU en crías de 15 días de edad. b) Estimación del número y c) la densidad de núcleos (No de núcleos/mm²) marcados contra BrdU en el GD de cada corte. (CONT: control, SM: separación maternal, GD: giro dentado; Prom ± SEM, * $p \leq 0.05$, $n = 7$)

2. EFECTO DE LA SM SOBRE LA ACTIVIDAD DEL EJE HPA DURANTE EL DESARROLLO.

2.1. Curva de crecimiento posnatal, peso corporal, talla y peso relativo de las glándulas suprarrenales y el timo.

La SM se asocio con una menor ganancia de peso corporal durante las dos primeras semanas de vida (Factor peso: $F_{1,72} 48.1$; $p \leq .0001$, Figura 11) de forma independiente a la edad (AXB: $F_{4,81} 0.37$; $p = 0.82$). Al PND3 las crías SM mostraron una disminución de 31% en el peso corporal con respecto a las crías control y este efecto disminuyo con la edad (Factor edad: $F_{4,72} 168.2$; $p \leq .0001$). Debido a que no encontramos diferencias significativas respecto al sexo se consideraron hembras y machos para el análisis.

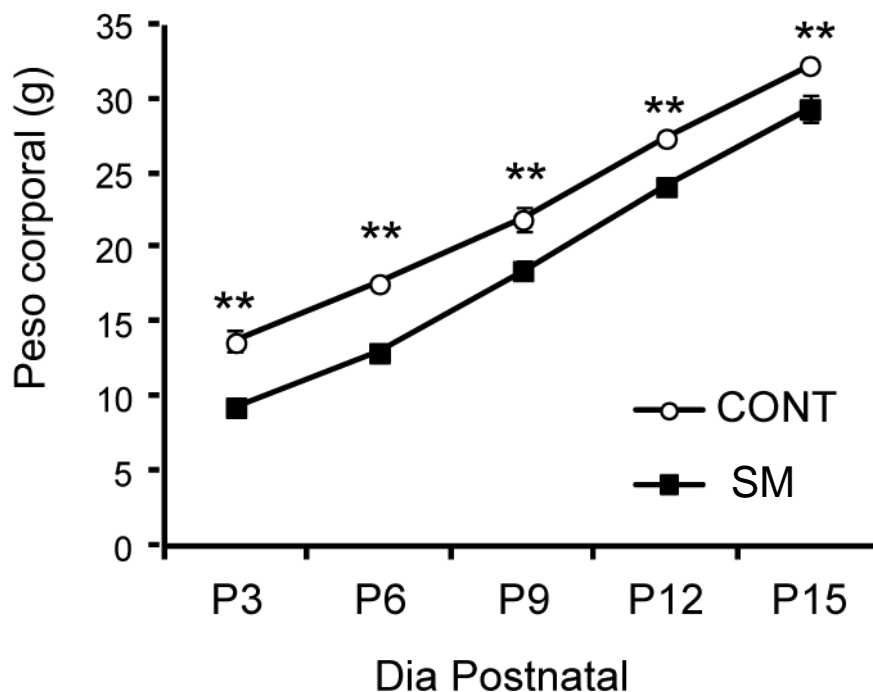


Figura 11: Curva de crecimiento posnatal. Peso (g) de las crías CONT (círculos blancos) y SM (círculos negros) al PND1, PND3, PND6, PND9, PND12 y PND15. (CONT: control, SM: separación maternal, P: día posnatal; Prom \pm SEM. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; $n=8$)

Al PND15 observamos una disminución del 9% en el peso corporal ($p \leq 0.01$) y del 4% en la talla ($p \leq 0.01$) de las crías SM comparados con los controles de la

misma edad, pero no en el peso relativo (mg de tejido/g peso corporal) de las suprarrenales y el Timo (Tabla 1).

| Grupo | Peso | Talla | Timo | Adrenales |
|--------------|-----------------|-----------------|----------------------|------------------------|
| CONT (n = 8) | 32.3 ± 0.3 g | 16.7 ± 0.1 cm | 3.74 ± 0.4 mg /mg PC | 0.254 ± 0.009 mg/mg PC |
| SM (n = 8) | 29.3 ± 0.8 g ** | 16.0 ± 0.1 cm** | 3.59 ± 0.4 mg /mg PC | 0.447 ± 0.117 mg/mg PC |

Tabla 1: Parámetros corporales de las crías al día postnatal 15 (PND15). Peso, talla y peso relativo (mg de tejido/mg peso corporal) de las Suprarrenales y el timo de crías control (CONT) y sometidos a separación maternal (SM). (Prom ± SEM. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$)

2.2. Concentración basal de CORT durante el desarrollo.

Al evaluar la concentración de CORT en plasma observamos que en condiciones basales, esta se encuentra elevada al PND3 y disminuye con la edad conforme las crías establecen la modulación característica del SHRP, alcanzando el nivel más bajo al PND9 ($F_{3,28} 43.7$, $p \leq 0.001$). Sorprendentemente la SM no modificó la concentración basal de CORT en ninguna de las edades evaluadas (Figura 12; $F_{1,28} 0.58$, $p = 0.44$).

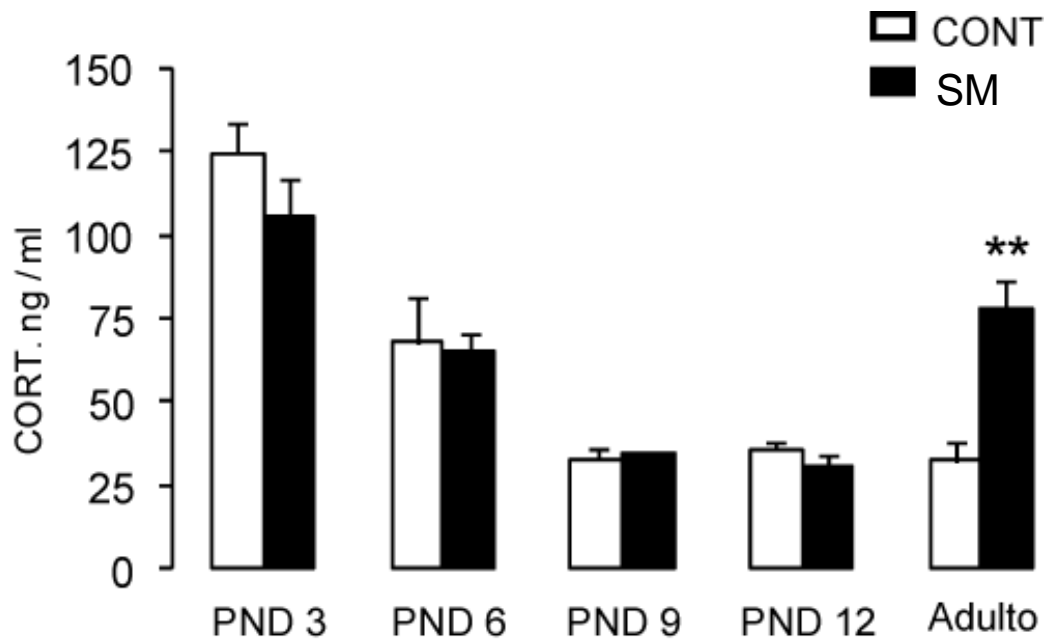


Figura 12: Actividad basal del eje HPA durante el desarrollo. Concentraciones basales de CORT en plasma de crías CONT (barras blancas) y SM (barras negras).al PND3, PND6, PND9, PND12 y adultos. (CONT: control, SM: separación materna, CORT: corticosterona, PND: día postnatal, HPA: hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenales, SHRP: periodo hiporresponsivo al estrés; Prom. \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, $n = 5$)

2.3. Concentraciones de CORT en respuesta al estrés en sangre troncal antes y durante el SHRP.

Analizamos la reactividad del eje HPA antes (PND3) y durante (PND12) el SHRP. Observamos una elevación significativa de la concentración de CORT en respuesta a un episodio de separación en ambas edades tanto en las crías CONT como las SM. Al PND3 las crías CONT mostraron un aumento del 55% en la concentración de CORT en respuesta al estrés ($p \leq 0.01$), mientras que la concentración de CORT en las crías SM aumento aumentó a más del doble (Figura 12b; $55.5 \pm 17.6\%$ VS $129.4 \pm 4.6\%$. $p \leq 0.05$). Durante el SHRP (PND12) observamos un aumento similar de la concentración de CORT en las crías CONT

(Figura 13b, $p \leq 0.05$) y SM ($p \leq 0.05$) sin mostrar diferencias significativas entre grupos ($498.6 \pm 174.4\%$ VS $343.0 \pm 153.1\%$).

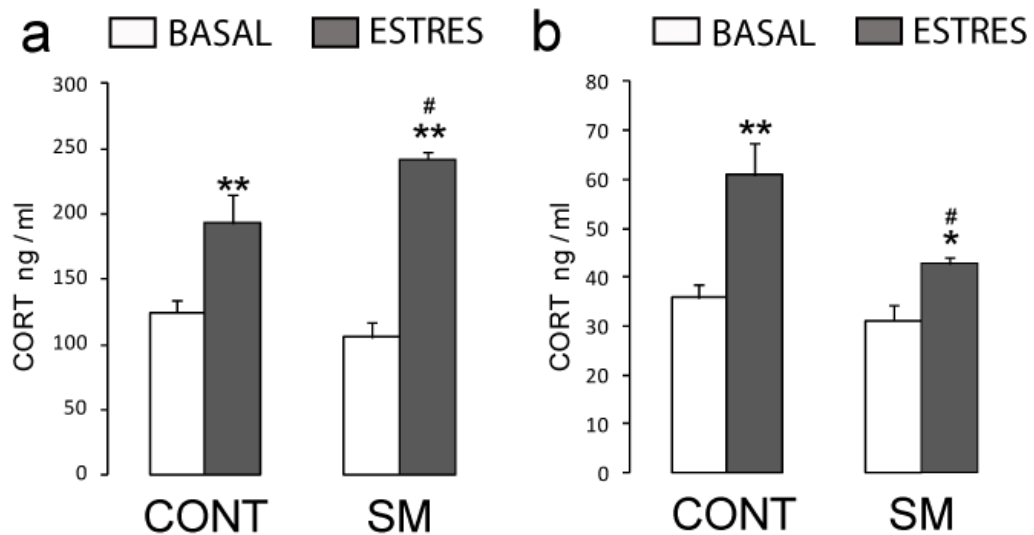


Figura 13: Actividad del eje HPA en respuesta al estrés durante el desarrollo. a) Concentraciones de CORT en plasma, basales (barras blancas) y en respuesta a un episodio de estrés agudo por separación maternal (barras grises) en crías CONT y SM antes del inicio del SHRP (PND3) y b) durante el SHRP (PND12). (CONT: control, SM: separación maternal, CORT: corticosterona, PND: día postnatal, HPA: hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenales, SHRP: periodo hipo-responsivo al estrés; Prom. \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, # $p \leq 0.05$ vs CONT, # # $p \leq 0.01$ vs CONT; $n=4$)

3. ALTERACIONES NEUROENDOCRINAS Y CONDUCTUALES EN EL ADULTO.

3.1. Concentración de CORT basal y en respuesta al estrés en animales adultos.

De acuerdo a lo previamente reportado, la SM causó una mayor actividad / reactividad del eje HPA en el adulto. La concentración de CORT basal de los machos adultos SM fue significativamente mayor ($p \leq 0.01$) que la de los CONT, de la misma forma observamos un aumento en la concentración de CORT 5 ($p \leq 0.05$) y 15 ($p \leq 0.01$) minutos después de someterlos a un episodio de estrés por

inmovilización (Figura 14). No encontramos diferencias en la concentración de CORT 60 minutos después de la inmovilización. Un análisis más detallado mostró que la liberación neta (delta) de CORT en respuesta al estrés fue similar en ambos grupos (Figura 14 inserto)

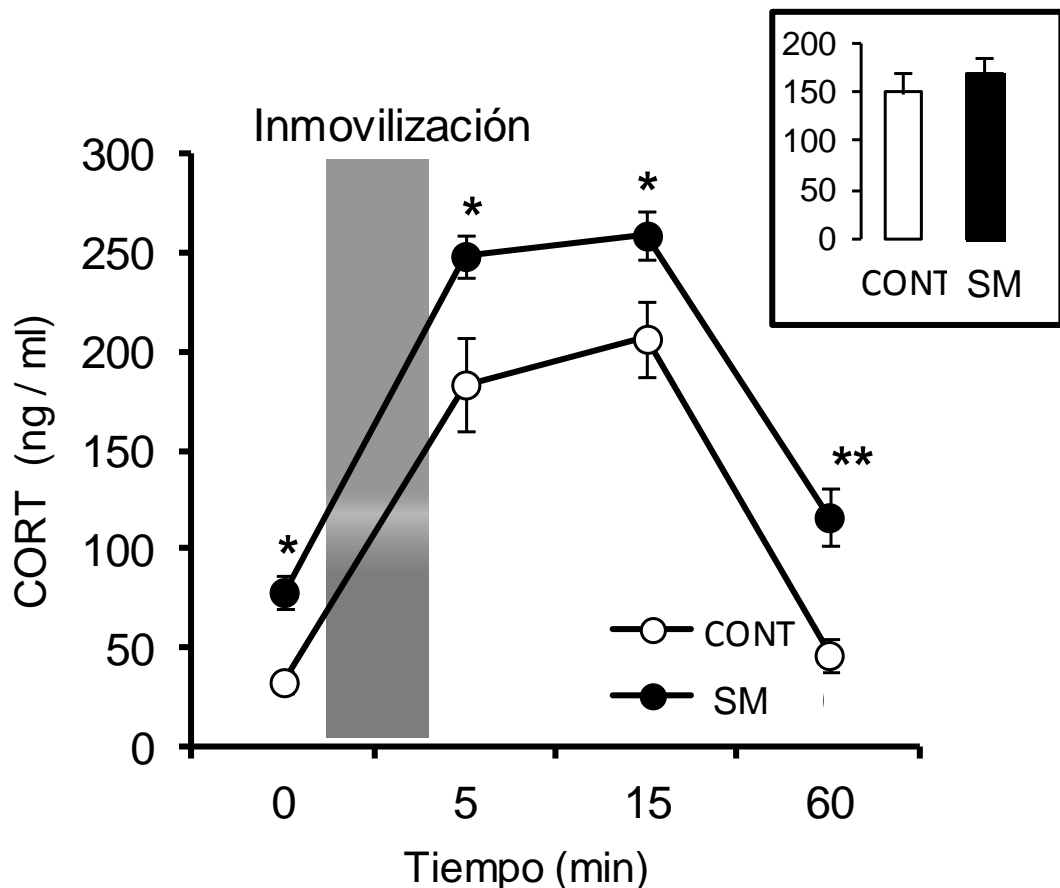


Figura 14: Actividad del eje HPA en el adulto. Curva de respuesta de CORT a un episodio de 15 min de estrés por inmovilización (barra gris) en machos adultos CONT (círculos blancos) y SM (círculos negros). El inserto muestra la liberación neta (delta) de CORT con respecto a la basal (CONT: control, SM: separación materna, CORT: corticosterona, HPA: hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenales, Prom. \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, $n=7$)

3.2. Conducta tipo depresiva y la conducta de ansiedad en el adulto.

No observamos efecto de la SM sobre la conducta tipo ansiedad evaluada en el laberinto elevado en cruz (Tabla 2). El porcentaje de entradas al brazo abierto con

respecto al total de entradas, el porcentaje de tiempo que permanecieron en el brazo abierto con respecto al tiempo total de exploración en los brazos y las entradas completas al brazo abierto fueron similares en ambos grupos. Así mismo no encontramos diferencias significativas en el número total de entradas a los brazos (índice de locomoción) entre los grupos (Tabla 2).

Tabla 2: Comportamiento de los machos adultos CONT y SM en el laberinto elevado en cruz. (CONT: Control, SM: separación maternal. Prom. \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)

| | Porcentaje de entradas al brazo abierto | Porcentaje de tiempo en el brazo abierto | Entradas completas al brazo abierto | Entradas al brazo cerrado |
|---------------|--|---|--|----------------------------------|
| CONT (n = 13) | 27.4 \pm 2.2 | 26.6 \pm 2.7 | 1.3 \pm 0.4 | 9.1 \pm 0.6 |
| SM (n = 14) | 30.3 \pm 2.3 | 18.8 \pm 3.0 | 1.7 \pm 0.3 | 8.0 \pm 0.7 |

En contraste la SM causó una estrategia más pasiva en respuesta a la prueba de nado forzado con respecto al control (Figura 15), reflejada por un menor tiempo de escalamiento (Figura 14a, $p \leq 0.05$) y un aumento en el tiempo de nado (Figura 14b, $p \leq 0.01$) e inmovilidad (Figura 14c, $p \leq 0.5$). Adicionalmente encontramos una disminución significativa en la latencia a la inmovilidad (Figura 14d, $p \leq 0.01$).

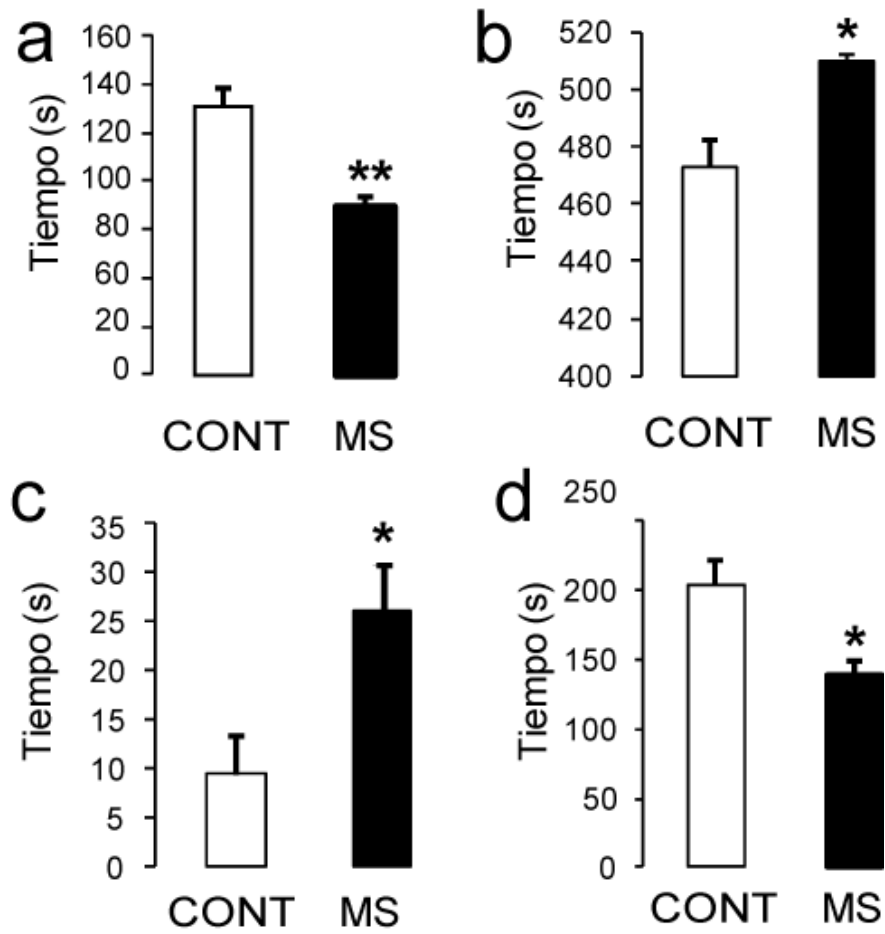


Figura 15: Estrategia de respuesta en la prueba de nado forzado. Tiempo (sg) de a) escalamiento, b) nado o c) inmovilidad de machos adultos CONT (barras blancas, n = 7) y SM (barras negras, n = 10). d) Latencia a flotar. (CONT: control, SM: separación maternal, Prom. ± SEM, * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01)

X. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis mostramos que la SM es un potente estresor que causa disminuye la neurogénesis de células granulares del GD durante la ontogenia del hipocampo, sin causar una elevación crónica en los niveles de GC y reproduce las alteraciones observadas en humanos. Además, mostramos que la SM observamos un aumento en la respuesta al estrés antes (PND3), pero no durante el SHRP (PND12). En el adulto, los animales sometidos a SM mostraron una estrategia más pasiva en respuesta a la prueba de nado forzado sin afectar la conducta de ansiedad. Por esto, proponemos que las alteraciones en la neurogénesis hipocampal debidas a la exposición temprana al estrés no son debidas a la elevación crónica de los niveles de GC o por una mayor reactividad al estrés en la cría, pero contribuyen a la desregulación del eje HPA en el adulto.

Originalmente estábamos interesados en evaluar el efecto de la SM sobre la neurogénesis de células granulares del hipocampo durante el SHRP. Las células granulares son el relevo intermedio dentro del circuito tri-sináptico hipocampal y su neurogénesis se extiende desde la gestación hasta la etapa adulta [64, 141]. En roedores, aproximadamente el 85% de estas células se producen durante el SHRP [62, 63, 142], es decir el mismo periodo de tiempo durante el cual las crías están siendo sometidas a SM. En adultos se ha propuesto que la disminución en la neurogénesis hipocampal podría ser uno de los mecanismos mediadores de los efectos psicopatológicos de la exposición a experiencias adversas durante las

etapas tempranas de la vida [126, 143, 144]. Aquí, hipotetizamos que la SM influenciaría la sobrevivencia de las células granulares recién generadas durante el desarrollo temprano y esto contribuiría a la programación de la actividad del eje HPA. La determinación de los efectos de la SM en un punto de tiempo temprano nos proporciona evidencia inmediata del efecto de la SM sobre el desarrollo cerebral. Aquí, demostramos que la SM causa una disminución en el número de células marcadas contra BrdU localizadas en la capa sub granular del GD. Nuestros resultados muestran que, diez días después de la inyección, las células marcadas con BrdU al PND5 se encuentran localizadas principalmente en la zona que co - distribuye para DCX, y que estas muestran muy poca co - localización con el marcador de neuronas maduras NeuN. En concordancia con estos resultados, Oreland y colaboradores (2010) mostraron una disminución en el número de núcleos no marcados con NeuN ni GFAP de la zona más interna del GD de ratas de 3 semanas de edad sometidas a SM por 360 min. diarios del PND1 al PND21, es decir la zona positiva para Dcx. Por otra parte se ha observado que la gran mayoría los neuroblastos recién generados en el GD eventualmente expresaran marcadores de neuronas maduras y logran extender sus axones hacia la vía de las fibras musgosas [94, 145-148].

Nuestros resultados mostraron una disminución en el número total de células marcadas contra BrdU sin afectar la densidad general de estas. Sin embargo al realizar un análisis detallado de la distribución de las células marcadas contra BrdU a lo largo del eje septo – temporal del hipocampo observamos un efecto altamente significativo que de otra forma pasaba desapercibido. Debido a que el análisis estadístico no mostró un efecto significativo del número de corte o la interacción entre este factor y la SM, concluimos que la neurogénesis del GD es

homogénea a lo largo del hipocampo y que la SM no causa alteraciones sobre esta distribución. Un análisis detallado similar al aquí presentado fue previamente reportado como herramienta para detectar los efectos de la exposición al Plomo sobre el desarrollo hipocampal postnatal [149]. Existen evidencias que sugieren que la función del hipocampo se encuentra regionalizada siguiendo un gradiente septo-temporal, ya que se ha observado que las aferentes hipocampales del fórnix provenientes de CA1 inervan diferentes zonas cerebrales, siendo las regiones más temporales las que presentan comunicación directa con el hipotálamo y la amígdala.

La SM también disminuye el número de neuronas inmaduras, pero no maduras que se agregan al GD en la etapa adulta. [126], pero hasta ahora el punto de inicio de este fenómeno no había sido determinado. La SM disminuye el número de células en el hipocampo adulto [106, 128] así como su volumen tanto en adultos como en adolescentes de 3 semanas de edad [90]. Adicionalmente se ha observado que un episodio de separación maternal de 24 horas disminuye la proliferación celular y aumenta la muerte celular durante el periodo posnatal [150]. Sin embargo el efecto de la SM periódica durante el SHRP aún no había sido descrito. Nuestros hallazgos sobre la disminución del número de células marcadas contra BrdU durante el SHRP en la zona positiva para neuroblastos muestran que este fenómeno tiene un inicio temprano e indican que los cambios observados en los adultos sometidos a SM se originan al mismo tiempo que los neonatos son expuestos al estresor y podrían solo simplemente continuar hasta la etapa adulta.

En la rata, la respuesta de las crías a la separación de la madre durante la primera semana de vida ha sido ampliamente estudiada [151, 152]. Aparentemente el aumento en la retroalimentación negativa del eje HPA mediado por GCR juega un

papel esencial en mantener la baja responsividad al estrés observada durante el SHRP [90]. Se ha propuesto que la SM sobrepasa este bloqueo del eje HPA mediado por GCR, provocando una elevación crónica de los niveles basales de GC circulantes y una hiper - actividad / hiper- reactividad del eje HPA durante el periodo crítico para la programación del eje HPA [93, 99, 151, 153]. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en las crías SM la hiper – reactividad al estrés se presenta solamente al PND3, cuando las crías aún no se encuentran dentro del SHRP, y desaparece al PND12, cuando el mecanismo de control del SHRP ya se encuentra establecido. Adicionalmente, nuestros datos muestran que la SM no causa una elevación crónica en la concentración basal de CORT durante el SHRP ya que no encontramos diferencias significativas entre los controles y las crías SM en ninguna de las edades evaluadas. En consecuencia, es posible que otros factores adicionales a CORT jueguen un papel en las alteraciones evocadas por la SM en los neonatos. En coincidencia, se ha reportado que mientras que la respuesta de CORT al estrés se encuentra atenuada durante el SHRP, la respuesta central a nivel de hipotálamo se mantiene activa [99, 100, 154, 155]. Adicionalmente, existe evidencia que sugiere que CRH y AVP, y no solamente la magnitud de la respuesta de CORT, podrían estar involucradas en la modulación de los efectos psico - fisiológicos causados por la exposición a experiencias adversas durante las etapas tempranas de la vida. [100, 156, 157]. Incluso, se ha observado que durante el SHRP la atenuación crónica de la CORT circulante en la periferia no previene los efectos causados por un episodio de separación maternal de 24 horas [90]; y que en ratas neonatas, el bloqueo de los GCR no evita el aumento en la expresión del RNAm de CRH en respuesta al estrés [154].

Se ha mostrado que la exposición a SM durante la vida temprana causa alteraciones neuroendocrinas a largo plazo [87, 99, 112]. Por ejemplo los machos adultos SM muestran un aumento en los niveles basales de CORT [158, 159]. En concordancia con estos hallazgos, nuestros datos confirman que la SM periódica aumenta la concentración de CORT en condiciones basales y después de la exposición a 15 min. de estrés por inmovilización en los animales adultos.

A l analizar con detalle, encontramos que no existe un consenso en la literatura respecto al efecto de la SM sobre los niveles de CORT y ACTH en el adulto, ya que este efecto parece ser dependiente tanto del sexo y la predisposición genética del individuo, como del tipo de estímulo que se utiliza como estresor.

Por un lado, algunos reportes afirman que en ratas macho no existen diferencias en los niveles basales de CORT y ACTH entre los animales sometidos a SM15, SM180 y los controles sin manipular [123, 160, 161] al igual que en ratones de la cepa C57BL/6 sometidos a SM breve (SM15) o larga (SM180) [90], mientras que por el contrario, otros afirman que la SM180 los aumenta. [110-112] o que los aumenta de forma transitoria solo en animales juveniles [162]

También se ha propuesto que la SM causa una hiperactividad del eje HPA de los machos al ser expuestos al estrés. Se ha observado que los niveles de CORT en plasma durante y posterior a la exposición a diferentes estresores, son mayores en los animales sometidos a SM que en los control [113-116]. Este aumento en la respuesta neuroendocrina al estrés va acompañado de un aumento en los niveles de mRNA a CRH en el núcleo PVN del hipotálamo [116]. En el presente trabajo observamos que los niveles de CORT de los machos adultos en respuesta a la inmovilización son significativamente mayores que los de los controles, Sin

embargo no observamos un aumento en la magnitud de la respuesta neta, es decir la elevación con respecto a su propia basal. Esto nos indica que, más que aumentar la reactividad, la SM únicamente aumenta la actividad basal del eje HPA. En contraste con nuestros resultados, otros grupos afirman que los niveles plasmáticos de CORT y ACTH en respuesta al estrés son similares en el grupo SM y los controles [81, 163] Y que la SM180 no solo no aumenta la respuesta al estrés, sino que atenúa la expresión de RNA mensajero (mRNA) de CRH en respuesta a la exposición al frío [160] y el aumento en las concentraciones de CORT en plasma en respuesta a la privación de alimento [160].

Numerosos estudios evaluando la conducta de las ratas adultas SM han mostrado un aumento en la conducta de ansiedad y tipo depresiva [84, 130, 164, 165]. Sin embargo, varios grupos han fallado al tratar de replicar estos efectos generalmente aceptados [131, 133, 166]. En nuestro estudio, observamos que los machos adultos sometidos a SM no muestran un aumento en la conducta tipo ansiedad evaluada en el EPM pero muestran una disminución en el tiempo de escalamiento y aumento en la inmovilidad en la prueba de nado forzado, lo cual se interpreta como una estrategia más pasiva en respuesta a la prueba. Existen varios factores que podrían explicar estas discrepancias, como las diferencias en la predisposición genética de la cepa de animales usada [129, 167]; el tiempo y la duración de la SM durante el periodo neonatal (ej.: periodo crítico) [168]; la prueba conductual (EPM vs prueba de campo abierto); o los grupos que se utilizan como controles para la comparación. Por ejemplo, en la mayoría de los casos se ha observado que la SM aumenta la conducta tipo ansiedad únicamente cuando se les compara con el grupo separado de su madre por periodos de 15 min. al día, pero no cuando se les compara con los controles sin manipular [120]. La

separación maternal por periodos de 15 minutos (SM15) difiere considerablemente del grupo control aquí usado y es considerada un tipo de estimulación que puede causar efectos opuestos a la SM prolongada, ya que disminuye la conducta de ansiedad y la conducta tipo depresiva, de esta forma al comparar los extremos de la población sin tomar en cuenta el punto medio (controles sin molestar) es posible obtener un efecto significativo que de otra forma no se observa. Es importante destacar que a pesar de que nuestros resultados no mostraron un efecto significativo sobre los parámetros del EPM, en el presente trabajo demostramos que la SM disminuye la generación de células granulares durante el SHRP junto con alteraciones neuroendocrinas y un aumento en la conducta tipo depresiva en el adulto al ser comparados con el grupo control sin manipular.

XI. CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestros resultados muestran que la separación maternal disminuye la neurogénesis de las células granulares del hipocampo desde el periodo postnatal temprano. Estas alteraciones suceden sin aumentar crónicamente la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales durante el periodo hiporesponsivo al estrés. Proponemos que la separación maternal causa alteraciones en la ontogenia del sistema nervioso central que se relacionan con la desregulación al largo plazo del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales y contribuye a mantener un estado tipo depresivo en el adulto

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Heim, C. and C.B. Nemeroff, *Neurobiology of early life stress: clinical studies*. Semin Clin Neuropsychiatry, 2002. **7**(2): p. 147-59.
2. Heim, C., et al., *The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans*. Psychoneuroendocrinology, 2008. **33**(6): p. 693-710.
3. Heim, C., et al., *The role of early adverse life events in the etiology of depression and posttraumatic stress disorder. Focus on corticotropin-releasing factor*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **821**: p. 194-207.
4. Heim, C., et al., *Persistent changes in corticotropin-releasing factor systems due to early life stress: relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder*. Psychopharmacol Bull, 1997. **33**(2): p. 185-92.
5. Desai, M. and C.N. Hales, *Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1997. **72**(2): p. 329-48.
6. Holmes, M.C., *Early life stress can programme our health*. J Neuroendocrinol, 2001. **13**(2): p. 111-2.
7. Barker, D.J., *Fetal programming of coronary heart disease*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(9): p. 364-8.
8. Lau, C. and J.M. Rogers, *Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2004. **72**(4): p. 300-12.
9. Barker, D.J., *The origins of the developmental origins theory*. J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 412-7.
10. Munck, A., P.M. Guyre, and N.J. Holbrook, *Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions*. Endocr Rev, 1984. **5**(1): p. 25-44.
11. McEwen, B.S., *Neurobiology of interpreting and responding to stressful events: paradigmatic role of the hippocampus*, in *Handbook of Physiology, Section 7: The Endocrine System*, B.S. McEwen, Editor. 2001, Oxford University Press: Oxford New York.
12. Yehuda, R., *Biology of posttraumatic stress disorder*. J Clin Psychiatry, 2001. **62 Suppl 17**: p. 41-6.
13. Bjorntorp, P., *Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases*. Nutrition, 1997. **13**(9): p. 795-803.
14. Sapolsky, R.M., *Physiological and pathophysiological implications of social stress in mammals*, in *handbook of Physiology, Section 7: The Endocrine System*, B.S. McEwen, Editor. 2001, Oxford University Press: Oxford New York. p. 517-532.
15. Sapolsky, R.M., L.C. Krey, and B.S. McEwen, *The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis*. Endocr Rev, 1986. **7**(3): p. 284-301.
16. Selye, H., *[Development of the stress concept. Stress and heart diseases]*. Med Welt, 1969. **16**: p. 915-8 passim.
17. Herman, J.P., C.M. Prewitt, and W.E. Cullinan, *Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis*. Crit Rev Neurobiol, 1996. **10**(3-4): p. 371-94.
18. Herman, J.P. and W.E. Cullinan, *Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. Trends Neurosci, 1997. **20**(2): p. 78-84.

19. Meaney, M.J., et al., *Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress*. Dev Neurosci, 1996. **18**(1-2): p. 49-72.
20. Dallman, M.F. and S. Bhatnagar, *Chronic stress and energy balance: role of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal axis*, in *Handbook of Physiology, Section 7: The Endocrine System*, B.S. McEwen, Editor. 2001, Oxford University Press: Oxford New York. p. 179-210.
21. de Kloet, E.R., J.M. Reul, and W. Sutanto, *Corticosteroids and the brain*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1990. **37**(3): p. 387-94.
22. de Kloet, E.R., N.Y. Rots, and A.R. Cools, *Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent*. Cell Mol Neurobiol, 1996. **16**(3): p. 345-56.
23. McEwen, B.S., *[Stress and hippocampus. An update on current knowledge]*. Presse Med, 1991. **20**(37): p. 1801-6.
24. Caldji, C., et al., *Development of individual differences in behavioral and endocrine responses to stress: role of the postnatal environment*, in *Handbook of Physiology. Section 7: The Endocrine System.*, B.S. McEwen, Editor. 2001, Oxford University Press: Oxford, New York. p. 271-292.
25. Sapolsky, R.M., *Individual differences in cortisol secretory patterns in the wild baboon: role of negative feedback sensitivity*. Endocrinology, 1983. **113**(6): p. 2263-7.
26. Feldman, S., N. Conforti, and J. Weidenfeld, *Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli*. Neurosci Biobehav Rev, 1995. **19**(2): p. 235-40.
27. Labar, K.S. and J.E. Ledoux, *Coping with danger: the neural basis of defensive behavior and fearful feelings*, in *Handbook of Physiology, Section 7: The Endocrine System*, B.S. McEwen, Editor. 2001, Oxford University Press: Oxford New York. p. 139154.
28. Vazquez, D.M., et al., *Brain corticotropin-releasing hormone (CRH) circuits in the developing rat: effect of maternal deprivation*. Brain Res, 2006. **1121**(1): p. 83-94.
29. Lopez-Antunez, L., *Anatomia Funcional del Sistema Nervioso*. First ed. 2003, Mexico DF: Limusa.
30. Herman, J.P., et al., *Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression*. Brain Res, 1992. **592**(1-2): p. 228-38.
31. Bratt, A.M., et al., *Long term modulation of the HPA axis by the hippocampus. Behavioral, biochemical and immunological endpoints in rats exposed to chronic mild stress*. Psychoneuroendocrinology, 2001. **26**(2): p. 121-45.
32. Sapolsky, R.M., M.J. Meaney, and B.S. McEwen, *The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. III. Negative-feedback regulation*. Brain Res, 1985. **350**(1-2): p. 169-73.
33. Feldman, S. and J. Weidenfeld, *Glucocorticoid receptor antagonists in the hippocampus modify the negative feedback following neural stimuli*. Brain Res, 1999. **821**(1): p. 33-7.
34. Doller, H.J. and F.F. Weight, *Perforant pathway activation of hippocampal CA1 stratum pyramidale neurons: electrophysiological evidence for a direct pathway*. Brain Res, 1982. **237**(1): p. 1-13.
35. Hsia, A.Y., R.C. Malenka, and R.A. Nicoll, *Development of excitatory circuitry in the hippocampus*. J Neurophysiol, 1998. **79**(4): p. 2013-24.
36. Swanson, L.W. and W.M. Cowan, *An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat*. J Comp Neurol, 1977. **172**(1): p. 49-84.
37. Meibach, R.C. and A. Siegel, *Efferent connections of the hippocampal formation in the rat*. Brain Res, 1977. **124**(2): p. 197-224.

38. Herman, J.P., et al., *Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(8): p. 1201-13.
39. Deacon, R.M., D.M. Bannerman, and J.N. Rawlins, *Anxiolytic effects of cytotoxic hippocampal lesions in rats*. Behav Neurosci, 2002. **116**(3): p. 494-7.
40. Smythe, J.W., et al., *Hippocampal mineralocorticoid, but not glucocorticoid, receptors modulate anxiety-like behavior in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 1997. **56**(3): p. 507-13.
41. Alderson, A.L. and T.A. Novack, *Neurophysiological and clinical aspects of glucocorticoids and memory: a review*. J Clin Exp Neuropsychol, 2002. **24**(3): p. 335-55.
42. Magarinos, A.M., J.M. Verdugo, and B.S. McEwen, *Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 14002-8.
43. Uno, H., et al., *Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates*. J Neurosci, 1989. **9**(5): p. 1705-11.
44. Herman, J.P., et al., *Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. J Neuroendocrinol, 1995. **7**(6): p. 475-82.
45. Sapolsky, R.M., et al., *Elevation of hypophysial portal concentrations of adrenocorticotropin secretagogues after fornix transection*. Endocrinology, 1989. **125**(6): p. 2881-7.
46. Eggers, A.E., *Redrawing Papez' circuit: a theory about how acute stress becomes chronic and causes disease*. Med Hypotheses, 2007. **69**(4): p. 852-7.
47. Li, S., et al., *Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior*. Life Sci, 2008. **82**(17-18): p. 934-42.
48. McEwen, B.S., *Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **933**: p. 265-77.
49. Watanabe, Y., N.G. Weiland, and B.S. McEwen, *Effects of adrenal steroid manipulations and repeated restraint stress on dynorphin mRNA levels and excitatory amino acid receptor binding in hippocampus*. Brain Res, 1995. **680**(1-2): p. 217-25.
50. McKittrick, C.R., et al., *Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites*. Synapse, 2000. **36**(2): p. 85-94.
51. McEwen, B.S. and A.M. Magarinos, *Stress effects on morphology and function of the hippocampus*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **821**: p. 271-84.
52. Luine, V., *Sex differences in chronic stress effects on memory in rats*. Stress, 2002. **5**(3): p. 205-16.
53. Conrad, C.D., *What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus?* Behav Cogn Neurosci Rev, 2006. **5**(1): p. 41-60.
54. Sandi, C. and K. Touyarot, *Mid-life stress and cognitive deficits during early aging in rats: individual differences and hippocampal correlates*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(1): p. 128-40.
55. Donohue, H.S., et al., *Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and three-dimensional ultrastructural study*. Neuroscience, 2006. **140**(2): p. 597-606.
56. Pavlides, C., L.G. Nivon, and B.S. McEwen, *Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation*. Hippocampus, 2002. **12**(2): p. 245-57.
57. Howland, J.G. and Y.T. Wang, *Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in the hippocampus*. Prog Brain Res, 2008. **169**: p. 145-58.
58. Oitzl, M.S., et al., *Brain development under stress: Hypotheses of glucocorticoid actions revisited*. Neurosci Biobehav Rev, 2009.
59. Blank, T., et al., *Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning*. J Neurosci, 2002. **22**(9): p. 3788-94.
60. Roozendaal, B., et al., *Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression*. Nat Neurosci, 2001. **4**(12): p. 1169-71.

61. Jones, S.P., et al., *Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3*. Hippocampus, 2003. **13**(3): p. 413-27.
62. Schlessinger, A.R., W.M. Cowan, and D.I. Gottlieb, *An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat*. J Comp Neurol, 1975. **159**(2): p. 149-75.
63. Bayer, S.A., *Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography*. J Comp Neurol, 1980. **190**(1): p. 87-114.
64. Reznikov, K.Y., *Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 1991. **122**: p. 1-74.
65. Amrein, I. and H.P. Lipp, *Adult hippocampal neurogenesis of mammals: evolution and life history*. Biol Lett, 2009. **5**(1): p. 141-4.
66. Abrous, D.N., M. Koehl, and M. Le Moal, *Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 523-69.
67. Joels, M., et al., *Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus*. Stress, 2004. **7**(4): p. 221-31.
68. Falconer, E.M. and L.A. Galea, *Sex differences in cell proliferation, cell death and defensive behavior following acute predator odor stress in adult rats*. Brain Res, 2003. **975**(1-2): p. 22-36.
69. Pham, K., et al., *Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(4): p. 879-86.
70. Joels, M., et al., *Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis*. Front Neuroendocrinol, 2007. **28**(2-3): p. 72-96.
71. Czeh, B., et al., *Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist*. Neuropsychopharmacology, 2005. **30**(1): p. 67-79.
72. Gould, E. and P. Tanapat, *Stress and hippocampal neurogenesis*. Biol Psychiatry, 1999. **46**(11): p. 1472-9.
73. Gould, E., C.S. Woolley, and B.S. McEwen, *Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death*. J Comp Neurol, 1991. **313**(3): p. 479-85.
74. Goshen, I., et al., *Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression*. Mol Psychiatry, 2008. **13**(7): p. 717-28.
75. Oomen, C.A., et al., *Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress*. Eur J Neurosci, 2007. **26**(12): p. 3395-401.
76. Alonso, R., et al., *Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(3): p. 278-86, 224.
77. Mirescu, C. and E. Gould, *Stress and adult neurogenesis*. Hippocampus, 2006. **16**(3): p. 233-8.
78. Schoenfeld, T.J. and E. Gould, *Stress, stress hormones, and adult neurogenesis*. Exp Neurol, 2011.
79. Lucassen, P.J., et al., *Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action*. Eur Neuropsychopharmacol, 2010. **20**(1): p. 1-17.
80. Wigger, A. and I.D. Neumann, *Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats*. Physiol Behav, 1999. **66**(2): p. 293-302.

81. Plotsky, P.M., et al., *Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring*. *Neuropsychopharmacology*, 2005. **30**(12): p. 2192-204.
82. Ellenbroek, B.A. and A.R. Cools, *The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background*. *Neuropsychopharmacology*, 2000. **23**(1): p. 99-106.
83. Lambas-Senas, L., et al., *Functional correlates for 5-HT(1A) receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009. **33**(2): p. 262-8.
84. Lee, J.H., et al., *Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation*. *Neurosci Res*, 2007. **58**(1): p. 32-9.
85. Moffett, M.C., et al., *Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats*. *Biochem Pharmacol*, 2007. **73**(3): p. 321-30.
86. Levine, S., et al., *Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat*. *Dev Psychobiol*, 1991. **24**(8): p. 547-58.
87. Kawakami, S.E., et al., *Long maternal separation accelerates behavioural sensitization to ethanol in female, but not in male mice*. *Behav Brain Res*, 2007. **184**(2): p. 109-16.
88. Huot, R.L., et al., *Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2001. **158**(4): p. 366-73.
89. Kikusui, T., S. Faccidomo, and K.A. Miczek, *Repeated maternal separation: differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005. **178**(2-3): p. 202-10.
90. !!! INVALID CITATION !!!
91. Francis, D.D., et al., *The role of corticotropin-releasing factor--norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress*. *Biol Psychiatry*, 1999. **46**(9): p. 1153-66.
92. Macri, S., F. Chiarotti, and H. Wurbel, *Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats*. *Behav Brain Res*, 2008. **191**(2): p. 227-34.
93. Sapolsky, R.M. and M.J. Meaney, *Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hypo-responsive period*. *Brain Res*, 1986. **396**(1): p. 64-76.
94. Gould, E., et al., *Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth*. *J Comp Neurol*, 1991. **313**(3): p. 486-93.
95. Gareau, M.G., et al., *Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation*. *Gut*, 2007. **56**(11): p. 1522-8.
96. Viau, V., S. Sharma, and M.J. Meaney, *Changes in plasma adrenocorticotropin, corticosterone, corticosteroid-binding globulin, and hippocampal glucocorticoid receptor occupancy/translocation in rat pups in response to stress*. *J Neuroendocrinol*, 1996. **8**(1): p. 1-8.
97. Zelena, D., et al., *Control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the neonatal period: adrenocorticotropin and corticosterone stress responses dissociate in vasopressin-deficient brattleboro rats*. *Endocrinology*, 2008. **149**(5): p. 2576-83.
98. Avishai-Eliner, S., et al., *Effects of maternal and sibling deprivation on basal and stress induced hypothalamic-pituitary-adrenal components in the infant rat*. *Neurosci Lett*, 1995. **192**(1): p. 49-52.
99. Anisman, H., et al., *Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors?* *Int J Dev Neurosci*, 1998. **16**(3-4): p. 149-64.

100. van Oers, H.J., et al., *Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone*. J Neurosci, 1998. **18**(23): p. 10171-9.
101. Dent, G.W., et al., *Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny*. Neuroendocrinology, 2000. **71**(6): p. 333-42.
102. Sapolsky, R.M., *Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging*. Exp Gerontol, 1999. **34**(6): p. 721-32.
103. Sapolsky, R.M., *The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death*. Biol Psychiatry, 2000. **48**(8): p. 755-65.
104. Sousa, N. and O.F. Almeida, *Corticosteroids: sculptors of the hippocampal formation*. Rev Neurosci, 2002. **13**(1): p. 59-84.
105. Meaney, M.J., R.M. Sapolsky, and B.S. McEwen, *The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. I. Ontogeny and autoregulation*. Brain Res, 1985. **350**(1-2): p. 159-64.
106. Huot, R.L., et al., *Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats*. Brain Res, 2002. **950**(1-2): p. 52-63.
107. Hofer, M.A., *Physiological and behavioural processes in early maternal deprivation*. Ciba Found Symp, 1972. **8**: p. 175-86.
108. Hofer, M.A., *Toward a developmental basis for disease predisposition: the effects of early maternal separation on brain, behavior, and cardiovascular system*. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis, 1981. **59**: p. 209-28.
109. Schmidt, M.V., et al., *Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse*. J Neuroendocrinol, 2006. **18**(11): p. 865-74.
110. Kinkead, R., R. Gulemetova, and A. Bairam, *Neonatal maternal separation enhances phrenic responses to hypoxia and carotid sinus nerve stimulation in the adult anesthetized rat*. J Appl Physiol, 2005. **99**(1): p. 189-96.
111. Genest, S.E., et al., *Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat*. J Physiol, 2004. **554**(Pt 2): p. 543-57.
112. Francis, D.D., et al., *Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity*. J Neurosci, 2002. **22**(18): p. 7840-3.
113. Ogawa, T., et al., *Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors*. Pharmacol Biochem Behav, 1994. **49**(4): p. 961-7.
114. Pryce, C.R., D. Bettschen, and J. Feldon, *Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat*. Dev Psychobiol, 2001. **38**(4): p. 239-51.
115. Aisa, B., et al., *Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats*. Neuroscience, 2008. **154**(4): p. 1218-26.
116. Huot, R.L., et al., *Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation*. Psychoneuroendocrinology, 2004. **29**(2): p. 279-89.
117. Rees, S.L., et al., *Effects of early deprivation and maternal separation on pup-directed behavior and HPA axis measures in the juvenile female rat*. Dev Psychobiol, 2008. **50**(4): p. 315-21.
118. Feng, P., et al., *Brain orexins and wake regulation in rats exposed to maternal deprivation*. Brain Res, 2007. **1154**: p. 163-72.
119. Wilber, A.A., et al., *Neonatal maternal separation alters adult eyeblink conditioning and glucocorticoid receptor expression in the interpositus nucleus of the cerebellum*. Dev Neurobiol, 2007. **67**(13): p. 1751-64.

120. Biagini, G., et al., *Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field*. *Int J Dev Neurosci*, 1998. **16**(3-4): p. 187-97.
121. Liu, D., et al., *Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress*. *Science*, 1997. **277**(5332): p. 1659-62.
122. Aisa, B., et al., *Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats*. *Psychoneuroendocrinology*, 2007. **32**(3): p. 256-66.
123. Ladd, C.O., et al., *Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation*. *Biol Psychiatry*, 2004. **55**(4): p. 367-75.
124. Aisa, B., et al., *Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory*. *Hippocampus*, 2009. **19**(12): p. 1222-31.
125. Hulshof, H.J., et al., *Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats*. *Behav Brain Res*.
126. Mirescu, C., J.D. Peters, and E. Gould, *Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(8): p. 841-6.
127. Oreland, S., I. Nylander, and C. Pickering, *Prolonged maternal separation decreases granule cell number in the dentate gyrus of 3-week-old male rats*. *Int J Dev Neurosci*, 2010. **28**(2): p. 139-44.
128. Fabricius, K., G. Wortwein, and B. Pakkenberg, *The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus*. *Brain Struct Funct*, 2008. **212**(5): p. 403-16.
129. Neumann, I.D., et al., *Differential effects of periodic maternal separation on adult stress coping in a rat model of extremes in trait anxiety*. *Neuroscience*, 2005. **132**(3): p. 867-77.
130. Diaz Lujan, V.E., et al., *Amitriptyline: sex-dependent effect on sympathetic response and anxiety in rats submitted to early maternal separation and variable chronic stress in adulthood*. *Int J Dev Neurosci*, 2008. **26**(5): p. 415-22.
131. Slotten, H.A., et al., *Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects*. *Brain Res*, 2006. **1097**(1): p. 123-32.
132. Hulshoff Pol, H.E., et al., *Twin-singleton differences in brain structure using structural equation modelling*. *Brain*, 2002. **125**(Pt 2): p. 384-90.
133. Rees, S.L., M. Steiner, and A.S. Fleming, *Early deprivation, but not maternal separation, attenuates rise in corticosterone levels after exposure to a novel environment in both juvenile and adult female rats*. *Behav Brain Res*, 2006. **175**(2): p. 383-91.
134. El Khoury, A., et al., *Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2006. **30**(3): p. 535-40.
135. Marais, L., et al., *Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus*. *Neurosci Res*, 2008. **61**(1): p. 106-12.
136. Diehl, L.A., et al., *Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats*. *Brain Res*, 2007. **1144**: p. 107-16.
137. Faure, J., et al., *Early maternal separation alters the response to traumatization: resulting in increased levels of hippocampal neurotrophic factors*. *Metab Brain Dis*, 2007. **22**(2): p. 183-95.
138. Tanapat, P., et al., *Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism*. *J Comp Neurol*, 2001. **437**(4): p. 496-504.

139. *Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio*. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina ed. 2002, Mexico, D.F.: Nacional Research Council-USA.
140. Miki, T., et al., *Application of the physical disector to the central nervous system: estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus*. *Anat Sci Int*, 2005. **80**(3): p. 153-62.
141. Paizanis, E., et al., *Life-long hippocampal neurogenesis: environmental, pharmacological and neurochemical modulations*. *Neurochem Res*, 2007. **32**(10): p. 1762-71.
142. Amaral, D.G. and J.A. Dent, *Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions*. *J Comp Neurol*, 1981. **195**(1): p. 51-86.
143. Lemaire, V., et al., *Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(20): p. 11032-7.
144. Karten, Y.J., A. Olariu, and H.A. Cameron, *Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood*. *Trends Neurosci*, 2005. **28**(4): p. 171-2.
145. Das, G.D. and G.W. Kreutzberg, *Postnatal differentiation of the granule cells in the hippocampus and cerebellum: a histochemical study*. *Histochemie*, 1967. **10**(3): p. 246-60.
146. Kosaka, T. and K. Hama, *Three-dimensional structure of astrocytes in the rat dentate gyrus*. *J Comp Neurol*, 1986. **249**(2): p. 242-60.
147. Stanfield, B.B. and W.M. Cowan, *The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice*. *J Comp Neurol*, 1979. **185**(3): p. 423-59.
148. Cameron, H.A., et al., *Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat*. *Neuroscience*, 1993. **56**(2): p. 337-44.
149. Verina, T., C.A. Rohde, and T.R. Guilarte, *Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats*. *Neuroscience*, 2007. **145**(3): p. 1037-47.
150. Zhang, L.X., et al., *Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain*. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002. **133**(1): p. 1-11.
151. Lau, C., et al., *Repeated maternal separation in the neonatal rat: cellular mechanisms contributing to brain growth sparing*. *J Dev Physiol*, 1992. **17**(6): p. 265-76.
152. Kuhn, C.M. and S.M. Schanberg, *Responses to maternal separation: mechanisms and mediators*. *Int J Dev Neurosci*, 1998. **16**(3-4): p. 261-70.
153. Walker, C.D., et al., *Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat*. *Endocrinology*, 1986. **119**(4): p. 1816-21.
154. Yi, S.J., J.N. Masters, and T.Z. Baram, *Effects of a specific glucocorticoid receptor antagonist on corticotropin releasing hormone gene expression in the paraventricular nucleus of the neonatal rat*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1993. **73**(2): p. 253-9.
155. Smith, M.A., et al., *Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain*. *Endocrinology*, 1997. **138**(11): p. 4622-8.
156. Litvin, Y., et al., *Maternal separation modulates short-term behavioral and physiological indices of the stress response*. *Horm Behav*, 2010. **58**(2): p. 241-9.
157. van Oers, H.J., E.R. de Kloet, and S. Levine, *Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1998. **111**(2): p. 245-52.
158. Ladd, C.O., et al., *Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience*. *Prog Brain Res*, 2000. **122**: p. 81-103.
159. Aisa, B., et al., *Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: involvement of the HPA axis*. *Psychoneuroendocrinology*, 2009. **34**(10): p. 1495-505.
160. Kim, H.J., et al., *Fasting-induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation*. *Neuropeptides*, 2005. **39**(6): p. 587-94.

161. Tiba, P.A., S. Tufik, and D. Suchecki, *Long lasting alteration in REM sleep of female rats submitted to long maternal separation*. *Physiol Behav*, 2008. **93**(3): p. 444-52.
162. Gareau, M.G., J. Jury, and M.H. Perdue, *Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(1): p. G198-203.
163. Liu, D., et al., *Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus*. *J Neuroendocrinol*, 2000. **12**(1): p. 5-12.
164. George, E.D., et al., *Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect*. *BMC Neurosci*, 2010. **11**: p. 123.
165. Wei, L., et al., *Early life stress increases anxiety-like behavior in Balbc mice despite a compensatory increase in levels of postnatal maternal care*. *Horm Behav*, 2010.
166. Faure, J., D.J. Stein, and W. Daniels, *Maternal separation fails to render animals more susceptible to methamphetamine-induced conditioned place preference*. *Metab Brain Dis*, 2009. **24**(4): p. 541-59.
167. Millstein, R.A., et al., *Effects of repeated maternal separation on prepulse inhibition of startle across inbred mouse strains*. *Genes Brain Behav*, 2006. **5**(4): p. 346-54.
168. Gruss, M., et al., *Maternal separation during a specific postnatal time window prevents reinforcement of hippocampal long-term potentiation in adolescent rats*. *Neuroscience*, 2008. **152**(1): p. 1-7.