



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
SOBRE LOS RECURSOS NATURALES**

**Efecto de la exposición al estrés durante las
etapas tempranas de la vida en un modelo animal
de lesión en el sistema nervioso central**

TESIS

**que como requisito para obtener
el título profesional de**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN ECOLOGÍA INTEGRATIVA**

presenta

Luis Arturo Díaz Chávez

Directoras de tesis:
Dra. Esperanza Meléndez Herrera
Dra. Naima Lajud Ávila

Morelia, Michoacán

Mayo de 2020



El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el marco del protocolo de investigación titulado: "Caracterización del efecto del enriquecimiento ambiental sobre la neurogénesis hipocampal y el desempeño cognoscitivo en un modelo combinado de traumatismo cortical y maltrato infantil" (registro: R-2016-785-054), el cual contó con apoyo financiero completo del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social-CONACyT No: 289897.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Rosa María y Manuel Francisco, por el apoyo que me han brindado todos estos años en mi formación académica y por impulsarme a siempre cumplir mis propósitos.

A mi asesora, Dra. Naima Lajud Ávila, por aceptarme en su laboratorio, por ayudarme a desarrollar un sentido crítico en la planeación y evaluación de los experimentos, por su invaluable conocimiento y por sus comentarios enriquecedores hacia el trabajo.

A mis revisores, Dra. Esperanza Meléndez Herrera, Dra. Yurixhi Maldonado, Dr. Eduardo Mendoza y al Dr. José Miguel Cervantes Alfaro, por sus aportes y comentarios para mejorar la tesis.

A mis amigos del laboratorio, Roberto, Angélica y Edel, por apoyarme y ayudarme en los experimentos y también por resolver mis dudas cuando se presentaban.

Gracias de corazón a todos ustedes.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	6
Homeostasis y estrés	6
Estrés	7
La respuesta al estrés	9
Efectos del estrés sobre el aprendizaje espacial	14
Consecuencias de la exposición al estrés sobre la estructura y función hipocampal	16
Efectos del estrés sobre la neurogénesis hipocampal	17
Estrés y programación temprana	19
Estrés durante las etapas tempranas de la vida	21
Modelo animal	22
Lesiones en el sistema nervioso central	24
ANTECEDENTES	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28
METODOLOGÍA	29

Modelo de estrés temprano: Separación maternal	31
Modelo de lesión: Cirugía por impacto cortical controlado	31
Inyección de BrdU	32
Evaluación conductual: Laberinto acuático de Morris	32
Procesamiento del tejido	33
Evaluación de la neurogénesis hipocampal: Inmunohistoquímica	33
Cuantificación de los núcleos positivos contra BrdU y Ki67	34
Inmunofluorescencia	34
Evaluación de la co-localización	35
Análisis estadísticos	35
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

El estrés puede presentarse de forma temprana en la vida y programar a los sistemas de respuesta fisiológica que se activarán en etapas posteriores del desarrollo, afectando el desempeño cognoscitivo y la neurogénesis hipocampal. Los animales son vulnerables a una gran cantidad de amenazas, como lesiones físicas que pueden ser causadas por accidentes, defensa territorial o depredación. Sin embargo, el efecto de las lesiones en animales sometidos a estrés temprano no ha sido descrito. Para determinar si la exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida agrava los efectos de las lesiones en el SNC se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley que se sometieron a separación maternal (SM) y sus controles. Las crías se separaron de su madre por periodos de tres horas diarias durante los primeros 21 días de vida. El día postnatal (P) 21 se les realizó una cirugía por impacto cortical controlado (CCI por sus siglas en inglés, 2.2 mm de profundidad, 4 m/s) o SHAM. El P32 las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con bromodeoxiuridina (BrdU, 500 mg/kg, 2 dosis) y tres días después se evaluó su desempeño cognoscitivo en el laberinto acuático de Morris. Al término de las pruebas los animales se sacrificaron y se realizaron inmunotinciones contra BrdU y Ki67 para evaluar la neurogénesis hipocampal e inmunofluorescencias triples para determinar el fenotipo celular de los núcleos BrdU+ utilizando los marcadores GFAP, DCX y NeuN. Observamos que el CCI provocó deficiencias en el desempeño cognoscitivo en animales que habían sido sometidos a separación maternal. La lesión ocasionó una disminución de la sobrevivencia celular sin afectar la proliferación celular. La combinación del estrés y la lesión disminuyó la proporción de células de reciente formación que se diferencian hacia astrocitos en el hipocampo ipsilateral, sin alterar la sobrevivencia de núcleos BrdU+. Nuestros resultados no explican las deficiencias observadas en la prueba de aprendizaje espacial, por lo que es probable que otros mecanismos diferentes a la neurogénesis estén operando para causar tal efecto.

Palabras clave: neurogénesis, separación maternal, desempeño cognoscitivo, lesión cerebral, impacto cortical controlado

ABSTRACT

Stress can occur early in life and program the physiological response systems that will be activated in later stages of development, affecting cognitive performance and hippocampal neurogenesis. Animals are vulnerable to a large number of threats, such as physical injuries that can be caused by accidents, territorial disputes or predation. However, the effect of injuries on animals who experienced early life stress has not been described. To determine whether exposure to stress during the early stages of life aggravates the effects of CNS injuries, male Sprague-Dawley rats were subjected to maternal separation (MS). Pups were separated from their mother for 3 hours a day during the first 21 days of life. On postnatal day (P) 21, they received a controlled cortical impact (CCI; 2.2 mm deep, 4 m/s) or a SHAM surgery. On P32 rats were injected intraperitoneally with bromodeoxyuridine (BrdU, 500 mg / kg, 2 doses) and cognitive performance was evaluated in the Morris water maze three days later. At the end of the tests, the animals were sacrificed. To evaluate hippocampal neurogenesis we quantified BrdU and Ki67 by immunostaining, and to determine the cellular phenotype of the BrdU + nuclei we performed triple immunofluorescences using the GFAP, DCX and NeuN markers. We observed that TBI caused deficiencies in cognitive performance in animals that had undergone maternal separation. Injury caused a decrease in cell survival without affecting cell proliferation. The combination of stress and injury decreased the proportion of newly generated cells that differentiate into astrocytes in the ipsilateral hippocampus, but did not alter BrdU+ nuclei survival. Our results do not explain the deficiencies observed in the space learning test, so it is likely that mechanisms other than neurogenesis are operating to cause such an effect.

INTRODUCCIÓN

La exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida tiene efectos a largo plazo que afectan el funcionamiento de diversos órganos y sistemas. El estrés temprano causa una desregulación del eje hipotálamo – hipófisis - glándulas suprarrenales (HPA, por sus siglas en inglés), alteraciones en la circuitería y morfología neuronal y disminución en la neurogénesis hipocampal (Aisa *et al.*, 2007; Mirescu *et al.*, 2004; Monroy *et al.*, 2010). El estrés puede presentarse de forma temprana en la vida y programar los sistemas de respuesta fisiológica modificando su actividad en etapas posteriores del desarrollo (Korosi *et al.*, 2012). Se sabe además, que la exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida afecta el aprendizaje y la orientación de tipo espacial (Gould *et al.*, 1999; Oomen *et al.*, 2010). En la naturaleza, la orientación espacial es esencial en las actividades básicas de los organismos como: el forrajeo, la búsqueda de pareja, la delimitación de territorio, el almacenamiento de comida, la migración, la evasión de depredadores, y la elección de sitios de anidación, entre otras (Dukas, 1998).

A nivel molecular, el estrés temprano altera las concentraciones de hormonas, neurotransmisores, péptidos, y citocinas, o los de sus receptores (Lajud y Torner, 2015), afectando a su vez la función de las células diana donde ejercen su efecto. A nivel neuroendocrino, el estrés temprano se asocia con la desregulación del eje HPA (McEwen, 2012; Sapolsky *et al.*, 1985; Sapolsky y Meaney, 1986; Walker *et al.*, 1986). Esta desregulación se caracteriza por un aumento en la concentración de glucocorticoides (GC) en la circulación sistémica que afecta negativamente a las estructuras encargadas de modular la respuesta al estrés, como el hipocampo y la corteza prefrontal (Lajud *et al.*, 2012; Tsigos *et al.*, 2016). El hipocampo, está relacionado con el aprendizaje y la memoria de tipo espacial (Moser *et al.*, 1995; Olton y Paras, 1979), y es particularmente sensible al estrés crónico y a los GC, debido a su alta concentración de receptores. Cuando hay una sobreactivación del eje HPA, los niveles elevados de GC tienen un efecto neurotóxico en el hipocampo (Sapolsky, 2000). Adicionalmente, se ha documentado que el estrés temprano disminuye la

neurogénesis de la zona sub-granular del giro dentado del hipocampo, uno de los dos nichos neurogénicos del cerebro adulto (Korosi *et al.*, 2012, Mirescu *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2018).

Los efectos negativos del estrés temprano pueden explicarse con base a dos hipótesis. De acuerdo a éstas, los efectos del estrés pueden ser aditivos (hipótesis del estrés acumulativo) o adaptativos (hipótesis del desajuste evolutivo) (Daskalakis *et al.*, 2012; Nederhof y Schmidt, 2012). En la naturaleza, los animales son vulnerables a una gran cantidad de amenazas, como lesiones físicas que pueden afectar gravemente el funcionamiento de sistemas, como el sistema nervioso central (SNC) y, de acuerdo a la hipótesis del estrés acumulativo, producir un efecto aditivo en aquellos animales que tienen vulnerabilidades previas.

Debido a la gran variabilidad y heterogeneidad de las lesiones que suceden en los animales de vida silvestre, así como en las características y duración de los estresores a los que se ven expuestos, es necesario realizar estudios en ambientes regulados que nos permitan controlar las variables de estudio. El modelo más utilizado para evaluar los efectos del estrés en las etapas tempranas de la vida es la separación maternal. Se sabe que los individuos sometidos a separación maternal presentan alteraciones neuroendocrinas y conductuales en la edad adulta (Daniels *et al.* 2004; Lajud *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2018; Tata 2012; Vargas *et al.*, 2016), como una actividad potenciada del eje HPA durante la exposición al estrés (Kalinichev *et al.* 2002), y deficiencias en tareas de aprendizaje y memoria espacial dependiente de hipocampo (Huot *et al.* 2002). El modelo de lesiones cerebrales más usado es el de impacto cortical controlado (CCI por sus siglas en inglés). El CCI causa alteraciones en el aprendizaje y la memoria de tipo espacial (Dixon *et al.*, 1999) y se ha observado que las lesiones cerebrales promueven la neurogénesis hipocampal en el periodo inmediato a la lesión (Dash *et al.*, 2001). Tal efecto se ha estudiado tanto en modelos animales como en humanos (Zheng *et al.*, 2013); Sin embargo, el efecto de las lesiones en animales sometidos a estrés temprano no ha sido descrito. Por todo lo anterior consideramos pertinente estudiar la posible interacción entre el estrés durante las etapas de la vida y una lesión cerebral en ratas sometidas a separación maternal que

recibieron una lesión por impacto cortical controlado. Por ello, nuestro objetivo en este trabajo fue probar la hipótesis que la separación maternal agrava los efectos de una lesión cerebral sobre el aprendizaje espacial y la neurogénesis utilizando para ello una prueba de comportamiento, y marcadores de proliferación, sobrevivencia y diferenciación celular.

MARCO TEÓRICO

Homeostasis y estrés

Los organismos se enfrentan cada momento a fluctuaciones en su medio externo e interno, y en consecuencia diversos mecanismos fisiológicos operan para mantener en ciertos límites estas variaciones internas. Esta capacidad de autorregulación se ha denominado homeostasis, palabra que proviene del griego ὁμοιος (*homos*= semejante), y στάσις (*stasis*= estabilidad), y fue acuñada en 1929 por el fisiólogo estadounidense Walter Cannon (Cannon, 1929). La idea de un ambiente interno estable (*milieu interieur*) fue propuesta desde 1865 por Claude Bernard refiriéndose a la capacidad que tienen los procesos biológicos de llevarse a cabo a pesar de las variaciones en el ambiente externo (Bernard, 1865). Cannon amplió esta idea y agregó que las variables fisiológicas clave deben mantenerse dentro de un *rango* (más que de un punto) gracias a mecanismos de retroalimentación (Fink, 2010). En su trabajo de 1932 titulado “La sabiduría del cuerpo”, Cannon expone los cuatro puntos clave de su concepción de la homeostasis:

- a. Deben existir mecanismos para mantener la constancia de un sistema abierto (como el de un organismo).
- b. Cualquier tendencia al cambio o que se aleje del equilibrio encuentra factores que resisten el cambio.
- c. El sistema regulador homeostático se compone de diversos mecanismos que operan y cooperan en simultáneo o sucesivamente.
- d. La homeostasis no ocurre por casualidad, sino que es el resultado de un proceso auto-organizado (Cannon, 1932).

El concepto de homeostasis continuó consolidándose a lo largo del tiempo. En 1943 Curt Richter incluyó a las respuestas conductuales como un mecanismo de regulación homeostática en adición a los mecanismos fisiológicos internos (Richter, 1943). Tiempo después, James Hardy (1953) propuso que los mecanismos homeostáticos operan comparando el valor real de una variable con un punto deseado o establecido

(Kotas y Medzhitov, 2015). Recientemente ha surgido el concepto de homeostasis adaptativa que se define como "la expansión o contracción transitoria del rango homeostático en respuesta a la exposición a moléculas o eventos de señalización subtóxicas y no dañinas, o la eliminación o el cese de tales moléculas o eventos" (Davies, 2016). Es decir, además del rango homeostático normal, existen rangos adaptativos que pueden ser inducidos transitoriamente a través de vías de transducción de señales en respuesta a estímulos sub-tóxicos no dañinos (para revisión ver Chovatiya y Medzhitov, 2014).

La homeostasis controla diversos factores y a diferentes niveles. Algunos de estos factores incluyen cambios de temperatura corporal, pH, concentraciones de glucosa, niveles hormonales, ritmo cardiaco, presión sanguínea, concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono, regulación osmótica y actividad enzimática, entre otros (Modell *et al.*, 2015). La regulación puede presentarse desde el nivel celular (como el control del pH citosólico) hasta el nivel de organismo (como el control de la temperatura corporal) (Kotas y Medzhitov, 2015). Por lo general la homeostasis involucra asas de retroalimentación negativa como mecanismo de operación. Cualquier desviación del rango de referencia de un valor activará mecanismos de retroalimentación que permitirán contrarrestar el cambio y devolver el valor al intervalo normal. Sin embargo, los mecanismos homeostáticos pueden fallar. Si el valor de un estímulo excede el rango de referencia y no regresa a sus niveles normales, pueden presentarse trastornos que afectarán al organismo (Li *et al.*, 2015).

Estrés

La palabra estrés proviene del inglés *distresse*, que proviene a su vez del latín *stringere*, que significa apretar u oprimir. En un principio el término fue utilizado en física como una medición del desgaste o deformación de ciertos materiales por la fuerza ejercida sobre un cuerpo. En 1932 Cannon lo utilizó para referirse a los factores externos que desequilibran la homeostasis (Cannon, 1932). No obstante, se considera que quien introdujo el término de estrés fue Hans Selye en 1936, que lo definió como una respuesta no específica del organismo ante cualquier estímulo nocivo (Selye,

1936). En 1950 Selye desarrolló el concepto del Síndrome General de Adaptación (SGA), donde describe la respuesta de un organismo ante el estrés y lo divide en tres etapas:

1. Fase de alarma: Ante la presencia de un estresor el organismo activa una respuesta que lo prepara para enfrentarlo.
2. Fase de resistencia: El organismo contiene contra el estresor y pone en marcha un sistema de respuesta que puede ser adaptativo. Si el organismo tiene la capacidad de resistir el estresor, su sistema se adaptará, de lo contrario continuará con la siguiente fase.
3. Fase de agotamiento: Si la respuesta no resulta adaptativa y se prolonga en el tiempo, se produce un deterioro por el agotamiento de recursos fisiológicos. Las capacidades de adaptación se reducen y se generan patologías (Selye, 1950).

Es importante distinguir el término estrés, de estresor y de la respuesta al estrés. Un estresor se refiere a todas las fuerzas adversas, internas o externas que amenazan la homeostasis. La respuesta al estrés es la reacción del organismo dirigida a recuperar la homeostasis (Chrousos, 2009).

El concepto de alostasis ha ampliado la noción de estrés. Desarrollado en 1988 por Sterling y Eyer (1988) y después en 2003 por McEwen y Wingfield (2003), la alostasis se define como el proceso activo de adaptación fisiológica o bioquímica necesaria para restablecer la homeostasis después de la exposición a un factor estresante. Por lo tanto, la homeostasis se refiere al mantenimiento de parámetros fisiológicos y la alostasis a la restauración de la homeostasis previamente alterada (McEwen y Wingfield, 2003). La serie de cambios que el organismo implementa para adaptarse a las diferentes situaciones o estresores se conoce como carga alostática. De forma aguda, la activación de la respuesta alostática promueve una gran cantidad de cambios que aumentan la probabilidad de sobrevivencia de los organismos. No obstante, si estas respuestas se desregulan o se mantienen activas por periodos prolongados de tiempo pueden causar un estado de exhaustión que se relaciona con una gran cantidad de fisiopatologías causadas por efecto acumulativo de la carga

alostática en el organismo. Este estado se llama sobrecarga alostática (Murgatroyd y Spengler, 2011).

La clasificación de SGA de Selye ha caído en desuso, ya que no logra diferenciar eficientemente los efectos adaptativos del estrés de los efectos maladaptativos de la sobrecarga alostática, por lo que el concepto original de estrés ha ido evolucionando con el tiempo. Actualmente, el estrés se clasifica en estrés agudo y estrés crónico. El estrés agudo se presenta ante un estresor de corta duración y es considerado principalmente adaptativo (Chrousos, 1998). Durante un evento de estrés agudo se estimula la liberación de GC y catecolaminas, entre cuyos efectos está la movilización de fuentes de energía que permiten al organismo contender con la amenaza. Es un tipo de estrés adaptativo que incrementa las probabilidades de supervivencia y no tiene consecuencias a largo plazo para el organismo (Tsigos *et al.* 2016). La exposición prolongada al estresor, o estrés crónico, se ha visto relacionada con cambios sostenidos y/o progresivos en la expresión de genes particulares, alteraciones en ciertas estructuras cerebrales como el hipocampo y la aparición de fisiopatologías. Es un estrés maladaptativo que tiene efectos negativos para el organismo y es similar a lo que Selye ya había descrito en la fase de agotamiento en su concepto de SGA. El aumento en la carga alostática en el tiempo causado por la exposición crónica al estrés puede conducir a la sobrecarga alostática del organismo. El estrés crónico puede llegar a afectar varias funciones como el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y la respuesta inmune (Charmandari *et al.* 2005). Es importante señalar que la capacidad de responder ante el estresor varía de individuo a individuo. La respuesta final dependerá de una combinación de factores genéticos, de desarrollo y ambientales que dictarán, hasta cierto punto, la susceptibilidad al estrés (Rodríguez-Fernández *et al.* 2012).

La respuesta al estrés

La exposición a un estresor activa una respuesta neuroendócrina, molecular y celular denominada “sistema de estrés” que involucra al sistema nervioso central (SNC), al sistema nervioso autónomo (SNA), y a los órganos periféricos. Los componentes

centrales de este sistema se encuentran ubicados en el hipotálamo y el tronco cerebral, e incluyen a las células parvocelulares que liberan a la hormona liberadora de corticotropina (CRH por sus siglas en inglés) y a arginina-vasopresina (AVP) del núcleo paraventricular del hipotálamo; al *locus coeruleus* (LC) y otros grupos celulares de la médula y el puente troncoencefálico que sintetizan norepinefrina (NE) y otras catecolaminas (Tsigos *et al.* 2016). Los principales componentes periféricos del sistema de estrés los constituyen el eje HPA y el sistema simpático-adrenal. Tanto en el caso del estrés agudo como del estrés crónico la primera fase de la respuesta al estrés está mediada por la rama simpática del SNC (para revisión ver Chrousos, 2009). Luego de un corto periodo de tiempo, se produce la activación el eje HPA cuya duración dependerá de si es el estrés es de tipo agudo o crónico (para una revisión ver Tsigos y Chrousos, 2002).

La respuesta rápida transcurre durante los primeros segundos a partir de la aparición del estresor, involucra a las catecolaminas (norepinefrina y epinefrina) y a la hormona CRH. Estas hormonas promueven el estado de alerta y la vigilancia (Oken *et al.* 2006), participan en la evaluación de la situación (Aston-Jones y Cohen, 2005) y promueven la elección de una estrategia óptima para enfrentar el desafío (Friston *et al.* 2014). No obstante, dado que los aumentos de dichas hormonas y sus efectos son de corta duración no permiten que se generen procesos de adaptación adecuados, como la consolidación de información asociada con el estresor (Roozendaal, 2000). Para ello es necesario que se alcance la segunda ola de acción, o respuesta lenta, que lleva a cabo este proceso a través de modificaciones en la expresión génica y la función celular. La respuesta lenta está mediada por corticosteroides (GC y mineralocorticoides) y sus efectos génicos comienzan al menos una hora después del inicio del estresor (Joëls y Baram, 2009).

El sistema nervioso simpático (SNS) es una rama del sistema nervioso autónomo que prepara al cuerpo para actividades tensas o energéticas y es controlado primordialmente por el hipotálamo. Ante la presencia de un estresor, el SNS estimula a la médula adrenal a liberar epinefrina y norepinefrina de las células cromafines hacia el torrente sanguíneo, que después ejercen sus efectos sobre sus tejidos diana

(Goldstein, 2010). La norepinefrina y la epinefrina provocan un aumento de la presión sanguínea y del gasto cardíaco (Herman y Sandoval, 1983), relajación de los músculos bronquiales (Westfall y Westfall, 2011), intestinales y otros músculos lisos (Bülbring y Tomita, 1987), dilatación de la pupila (Tank y Lee, 2015) y cambios metabólicos como glucólisis y lipólisis que proveen energía a las células (Barth *et al.* 2007), y permiten al organismo responder eficientemente contra el estresor (Elenkov y Chrousos, 2006; Kyrou y Tsigos, 2009).

El segundo componente del sistema de estrés lo conforma el eje HPA. La exposición a factores estresantes fisiológicos y psicológicos activa la amígdala y el tallo cerebral, los cuales estimulan a las células parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo a liberar CRH y AVP (Dent *et al.*, 2000). Estas hormonas se transportan hasta la hipófisis anterior por el sistema de capilares portal hipofisiario que conecta el hipotálamo con la hipófisis. La unión de CRH a su receptor en la hipófisis provoca la liberación de ACTH hacia el torrente sanguíneo (Seasholtz, 2000). La ACTH se une a receptores ubicados en la corteza de la médula suprarrenal que en respuesta liberan GC (Schimmer y Funder, 2011). Los GC ejercen sus efectos mediante la transactivación o transrepresión de genes (Newton y Holden, 2007). Los niveles hormonales se mantienen en sus rangos basales gracias a mecanismos de retroalimentación negativa. Cuando estos mecanismos fallan o se usan en exceso se produce una sobreactivación del eje HPA que puede llevar al desarrollo de patologías (Herman *et al.*, 2016).

La CRH es la principal reguladora hipotalámica del eje HPA (Majzoub, 2006). Es un péptido de 41 aminoácidos que se expresa en poblaciones neuronales de la amígdala, el hipocampo y el *locus coeruleus* (Owens y Nemeroff, 1991). Por su parte AVP tiene efectos sinérgicos al potenciar los efectos de la CRH a través de su receptor en la hipófisis anterior (Scott y Dinan, 1998). La ACTH es el producto del procesamiento de otra molécula de mayor peso molecular llamada pro-opiomelanocortina (Bertagna, 1994). La ACTH se libera al torrente sanguíneo desde la hipófisis anterior y se une a su receptor en las células parenquimatosas en la corteza adrenal (Margioris y

Tsatsanis, 2000). La activación del receptor estimula la esteroidogénesis y la secreción de GC y mineralocorticoides (Smith y Vale, 2006).

Los GC son hormonas esteroideas y efectores finales del eje HPA. El principal GC en anfibios, aves, reptiles y roedores es la corticosterona, en tanto que en peces y mamíferos no roedores es el cortisol (Romero, 2004). Los GC son moléculas no polares por lo que en sangre se transportan unidos a una proteína llamada transcortina (Klieber *et al.*, 2007). Los GC tienen afinidad tanto a los receptores a GC (GCR) como a los de mineralocorticoides (MR). Debido a su alta afinidad, el receptor a mineralocorticoides está parcialmente ocupado por GC incluso cuando las concentraciones son bajas, mientras que el receptor a GC se activa solo cuando las concentraciones son altas, como en respuesta al estrés (Gómez-Sánchez, y Gómez-Sánchez, 2011). En ausencia de su ligando, los GCR se encuentran formando parte de un complejo multiproteico en el citoplasma que incluye a las proteínas de shock térmico HSP90 y HSP70. La unión a GC produce la disociación del receptor y el complejo multiproteico, seguida de la dimerización del receptor y su translocación al núcleo (Robertson *et al.*, 2013). Dentro del núcleo, el GCR se une a secuencias consenso de ADN llamadas elementos de respuesta a GC que funcionan como *potenciadores* y pueden regular la transactivación de genes (Dostert y Heinzl, 2004). Los GCR se expresan de forma ubicua en tejidos periféricos y en el cerebro, con una mayor concentración en el núcleo paraventricular y el hipocampo (Fuxe *et al.*, 1985). Los efectos de los GC son pleiotrópicos. Entre sus varias acciones se encuentra el aumento de la disponibilidad de energía gracias a procesos como la gluconeogénesis en el hígado, el catabolismo de proteínas en el tejido muscular y la lipólisis en el tejido adiposo (McKay y Cidlowski, 2003). Estas reacciones metabólicas proveen de energía al organismo que le permiten contender contra el estresor de manera eficiente. Se han documentado sus efectos sobre el sistema inmune al reducir la inflamación, la liberación de histamina y al suprimir la función inmune en general (Gray *et al.* 2017). Adicionalmente, los GC intervienen en la regulación del eje HPA. Cuando los niveles de GC se elevan, como en un evento de estrés, los receptores a GC ubicados en el hipotálamo y la hipófisis participan en la retroalimentación negativa al reducir la liberación de CRH y ACTH respectivamente (Herman *et al.*, 2012). Las

concentraciones de GC en plasma tienen variaciones circadianas y ultradianas. (Murgatroyd y Spengler, 2011).

Existen otras estructuras cerebrales que participan en la modulación negativa del eje HPA además del hipotálamo y la hipófisis. Tanto el hipocampo como la corteza prefrontal medial (CPFm) están implicados en la inhibición trans-sináptica de las neuronas productoras de CRH del paraventricular, por lo que son reguladores negativos del eje HPA (Jacobson y Sapolsky, 1991, Diorio *et al.*, 1993). A su vez, el hipotálamo y la corteza prefrontal medial tienen proyecciones recíprocas con el núcleo dorsal del rafé (NDR) cuya liberación de serotonina se acompaña de la liberación de NE por parte del *locus coeruleus* y participan por tanto como reguladores en la liberación de catecolaminas (Fig. 1) (Chrousos, 2009).

El estrés causa alteraciones en el desempeño cognoscitivo, la estructura neuronal y la neurogénesis. Se ha documentado que el estrés afecta el aprendizaje y la memoria dependiente del hipocampo, incluyendo el aprendizaje espacial (Francis *et al.*, 1995). A nivel celular, el estrés causa atrofia dendrítica apical (Watanabe *et al.*, 1992), reducción en la arborización dendrítica (Magariños *et al.*, 1996), alteraciones en las terminales axónicas (Magariños *et al.*, 1997) así como alteraciones en la circuitería neuronal hipocampal (Herman *et al.*, 1996). Por último, el estrés también afecta diversas etapas de la neurogénesis hipocampal como la proliferación, la sobrevivencia y la diferenciación celular social (Lagace *et al.*, 2010; Pham *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2010).

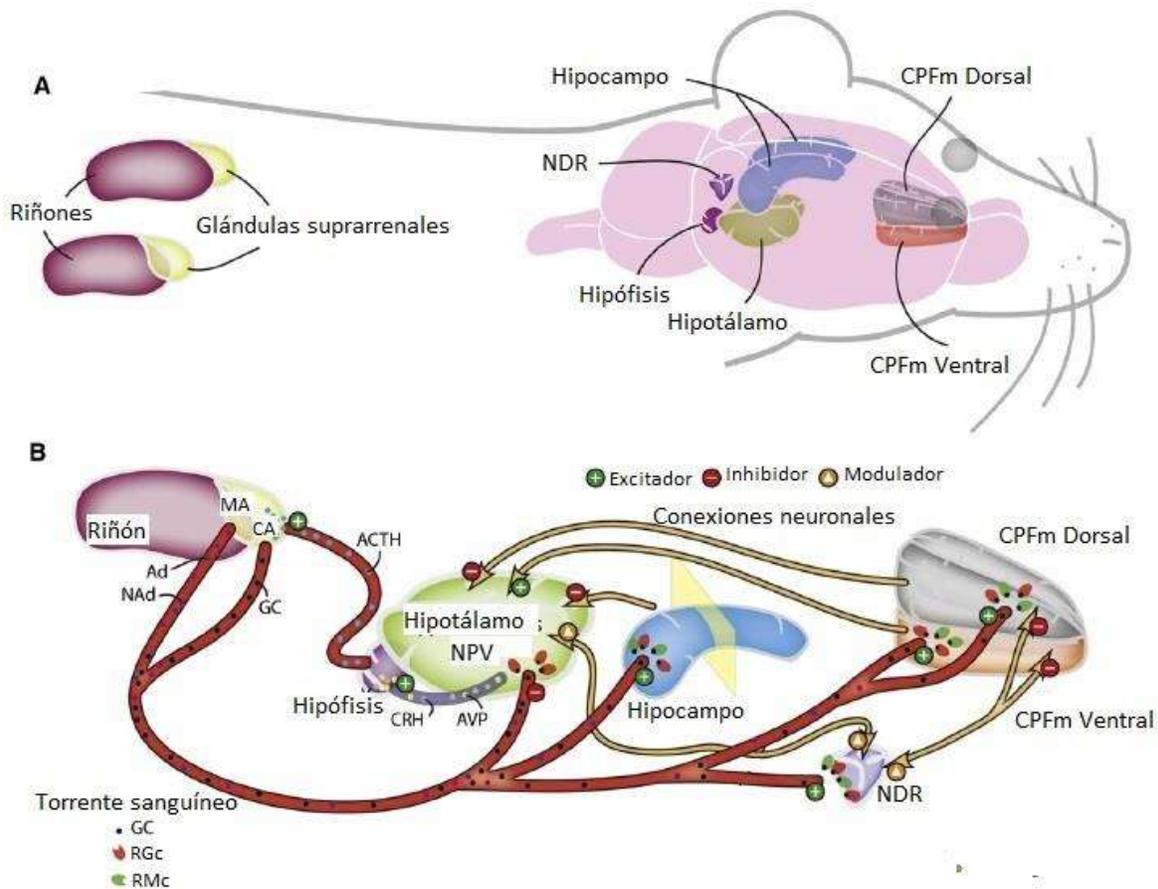


Figura 1. Estructuras que participan en el sistema de estrés y sus conexiones, así como las principales moléculas que median la respuesta al estrés. A. Componentes principales del sistema de estrés y su ubicación en el cerebro y cuerpo. **B.** Conexiones entre las estructuras del eje HPA, el eje simpático adrenal y las estructuras involucradas en la respuesta al estrés. Ad: adrenalina, CA: corteza adrenal, CPFm: Corteza prefrontal medial, GC: glucocorticoides, MA: médula adrenal, NAd: noradrenalina, NDR: Núcleo dorsal del rafé, NPV: núcleo paraventricular (Modificado de Franklin *et al.* 2012).

Efectos del estrés sobre el aprendizaje espacial

En su ambiente natural los animales usan constantemente señales visuales para una variedad de actividades como: forrajeo, búsqueda de pareja, delimitación de territorio, almacenamiento de comida, migración, evasión de depredadores, y elección de sitios de anidación, entre otras. Estas tareas dependen del aprendizaje previo de la ubicación espacial de los sitios donde se realizan estas actividades, y son vitales para

la sobrevivencia y la reproducción de los individuos (Jacobs, 1995). Un individuo que sepa ubicar sus sitios de alimentación y reproducción de forma eficiente aumentará sus probabilidades de supervivencia y encontrar pareja (Dukas, 1998). Por lo tanto, la memoria espacial juega un rol muy importante en las actividades básicas de los animales (Sherry, 1985).

Existe una gran cantidad de evidencia que demuestra que el aprendizaje espacial depende principalmente de una estructura cerebral llamada hipocampo. Por ejemplo, en animales silvestres se han observado diferencias al comparar el volumen del hipocampo (o su homólogo en aves, la formación hipocampal) en especies que almacenan semillas en comparación con las que no almacenan alimento (Krebs *et al.*, 1989). Incluso dentro de la misma especie, poblaciones que dependen más de los alimentos almacenados muestran un volumen mayor de la formación hipocampal que las poblaciones que dependen menos de los alimentos almacenados, por lo que parece existir una relación entre el tamaño relativo del hipocampo y la memoria espacial (Pravosudov y Roth II, 2013; Smulders *et al.* 2010). En animales de laboratorio, el papel de la formación hipocampal ha sido ampliamente estudiado (para revisión ver Spiers, 2012). Se sabe que las lesiones hipocampales causan deficiencias en tareas de aprendizaje espacial como el laberinto acuático de Morris (Krebs, 1989). También se ha visto que después de una lesión cerebral se reduce el número de ramificaciones y la densidad de espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo, así como su actividad electrofisiológica (Gao *et al.*, 2011) y se produce una reducción del volumen hipocampal (Clausen *et al.*, 2015).

Diversos estudios han documentado el efecto del estrés sobre la adquisición, consolidación y recuperación de la memoria espacial y no espacial dependiente del hipocampo, y este efecto ha sido atribuido a las concentraciones elevadas de GC (Tsigos *et al.* 2016). Se ha visto que el estrés crónico afecta la memoria de tipo espacial a través de diferentes pruebas como el laberinto acuático de Morris (Francis *et al.*, 1995), el laberinto radial (Luine *et al.*, 1994) y el laberinto en Y (Kleen *et al.*, 2006). Por ejemplo, ratas de 2.5 meses de edad que se sometieron a estrés por restricción durante 21 días tuvieron un peor desempeño en la prueba del laberinto radial, además

de presentar atrofia dendrítica en las neuronas piramidales de CA3 en comparación con el grupo control (Luine *et al.*, 1994). Posteriormente siguiendo el mismo protocolo de estrés, se observó que en el laberinto en Y las ratas sometidas a estrés presentaban deficiencias en la prueba en comparación con el grupo control (Conrad *et al.*, 1996). También, utilizando los electrochoques como estresor agudo se observaron deficiencias en la orientación espacial de ratones utilizando el laberinto acuático de Morris (Francis *et al.*, 1995).

Consecuencias de la exposición al estrés sobre la estructura y función hipocampal

El hipocampo deriva de la región medial del telencéfalo y junto con el hipotálamo y la amígdala, forma parte del sistema límbico (Para revisión ver Schultz y Engelhardt, 2014). Está conformado por el cuerno de Amón (CA1, CA2 y CA3), el giro dentado, el complejo subicular, (formado por el presubiculo, el subículo y el parasubiculo) y la corteza entorrinal. El circuito de procesamiento de la información comienza en la vía perforante de la corteza entorrinal (Witter, 2007). Estas aferencias entran al hipocampo y forman sinapsis con las neuronas granulares del giro dentado. Las neuronas granulares envían proyecciones axonales a las neuronas piramidales de CA3 que proyectan, a su vez hacia las neuronas piramidales de CA1. Este circuito, conocido como “circuito trisináptico” es el mejor caracterizado en el hipocampo (Hernández *et al.* 2015).

Diversos trabajos han documentado los efectos del estrés sobre el hipocampo (Para revisión ver Kim *et al.*, 2015). En roedores y primates no humanos se ha observado que la exposición a diferentes estresores como la inmovilización, estresores crónicos impredecibles y psicosociales, resulta en atrofia dendrítica apical (Watanabe *et al.*, 1992), arborización dendrítica reducida de las neuronas piramidales de CA3 (Magariños *et al.*, 1996) y alteración en las terminales axónicas de las neuronas del giro dentado que hacen sinapsis en estas células (Magariños *et al.*, 1997). La atrofia dendrítica podría deberse a un exceso de neurotransmisor excitatorio como el glutamato (Magarin y McEwen, 1995). Cuando se produce una sobreactivación de los

receptores a glutamato como el NMDA o el AMPA ocurren procesos patológicos que resultan en un daño neuronal denominado excitotoxicidad (Meldrum, 2000). Se ha observado que tanto el estrés agudo como el crónico aumentan las concentraciones de glutamato en el hipocampo resultando en excitotoxicidad que promueve la atrofia dendrítica (Christian *et al.*, 2011; Sapolsky, 2000; Suri y Vaidya, 2015). Los estresores prolongados y/o traumáticos pueden provocar cambios morfológicos en el hipocampo (Kim *et al.* 2015). Por ejemplo, un estudio en ratas que se sometieron a estrés crónico por inmovilización reveló una disminución del volumen hipocampal en comparación con su tamaño antes de la exposición al estresor (Lee *et al.*, 2009).

El estrés también puede alterar la circuitería neuronal del hipocampo (Herman *et al.*, 1996). La potenciación a largo plazo y la depresión a largo plazo (LTP y LTD respectivamente, por sus siglas en inglés) son formas de plasticidad sináptica y han sido considerados como posibles mecanismos que contribuyen al aprendizaje y la memoria (Nabavi *et al.*, 2014). Se ha observado que la exposición a estresores agudos o crónicos afecta la LTP en las sinapsis de CA3-CA1, CA3-neuronas granulares y de las neuronas granulares-vía perforante (Chen *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 1996; Pavlides *et al.*, 2002). Estas alteraciones son más pronunciadas en el hipocampo dorsal (involucrado en los procesos de memoria y aprendizaje espacial) que en el ventral (involucrado en el control de las emociones) (Maggio y Segal, 2009). Por su parte, la exposición a diversos estresores produce una respuesta mejorada de LTD en las sinapsis de CA3-CA1 (Howland y Wang, 2008; Suri y Vaidya, 2015).

Efectos del estrés sobre la neurogénesis hipocampal

La generación de neuronas a partir de células madre neurales es un fenómeno llamado neurogénesis y desde hace algunas décadas se sabe que ocurre en el cerebro adulto de los mamíferos (Para revisión ver Ming y Song, 2011). Se compone de varias etapas como la proliferación, la migración, la diferenciación, la sobrevivencia e integración celular en los circuitos neuronales. En el cerebro adulto existen dos zonas que constantemente están generando nuevas neuronas. La primera es la zona subventricular de los ventrículos laterales, donde las neuronas migran a través de la vía rostral migratoria y se convierten en neuronas granulares y periglomerulares en el

bulbo olfatorio (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002). La zona subgranular del giro dentado del hipocampo es el segundo sitio de neurogénesis en el cerebro adulto (Altman y Das, 1965). Estas células migran a la capa de neuronas granulares del giro dentado y se convierten principalmente en neuronas granulares (Cameron *et al.*, 1993). Estudios en roedores han mostrado que del 80 al 95% de las células se convierten en neuronas, y el resto en células gliales (Cameron & McKay, 2001; Snyder *et al.*, 2009).

La composición bioquímica de los progenitores neurales se modifica durante la diferenciación. Al principio, los progenitores neurales exhiben características de células gliales pues expresan proteínas como nestina o proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001). Durante la diferenciación, los progenitores neurales que se convertirán en neuronas comienzan a expresar proteínas específicas de las neuronas como doblecortina (DCX), proteína neuronal nuclear (NeuN) y la molécula de adhesión nerviosa celular (NCAM). Se estima que todo el proceso del neurodesarrollo hasta la integración en el circuito neuronal demora aproximadamente 4-6 semanas en cerebros de roedores (Rice y Barone, 2000).

La participación en tareas de aprendizaje, en especial de memoria espacial dependiente del hipocampo, se asocia con incrementos en la neurogénesis hipocampal (Gould *et al.*, 1999). En condiciones silvestres, se ha observado que la tasa de neurogénesis hipocampal en una especie de ave que almacena semillas aumenta hacia el otoño, cuando su fuente de alimento comienza a escasear y comienza a almacenar semillas, además el pico de neurogénesis coincidió con el periodo que el ave utiliza para realizar esta actividad (LaDage, 2015). También los roedores silvestres que utilizan arreglos espacialmente más complejos de sitios de almacenamiento de alimentos tienen tasas más altas de neurogénesis que se acompañan de una mayor eficiencia para asimilar tareas de aprendizaje espacial (Cameron y Christie, 2007). Por otra parte, estudios en animales de laboratorio utilizando el laberinto acuático de Morris han reportado que el número de neuronas generadas aumenta en el giro dentado en respuesta al entrenamiento y que los animales con mayor tasa de neurogénesis se desempeñan mejor en esta prueba

(Ambrogini *et al.* 2000, Gould *et al.* 1999, Hanson *et al.* 2011). Existe evidencia que muestra que eliminar la neurogénesis causa alteraciones en el desempeño cognoscitivo en esta tarea (Clelland *et al.*, 2009).

La exposición al estrés tiene efectos negativos sobre la neurogénesis que podrían estar relacionados con las deficiencias cognoscitivas observadas después de la exposición a estresores crónicos. En procedimientos que utilizaron estresores crónicos como la sumisión social (Lagace *et al.*, 2010), el estrés crónico impredecible (Yun *et al.*, 2010) y la inmovilización (Pham *et al.*, 2003), se observó una reducción en la proliferación, supervivencia y diferenciación de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo. Estos efectos del estrés sobre la neurogénesis fueron más evidentes en la parte dorsal del hipocampo, relacionada con el aprendizaje y la memoria espacial (Anacker y Hen, 2017). Tales sucesos han sido atribuidos a los GC y pueden operar de dos formas distintas. En primer lugar, se sabe que la activación del receptor NMDA por glutamato inhibe la neurogénesis del giro dentado y los GC aumentan la concentración de glutamato en el hipocampo (Moghaddam *et al.*, 1994). Alternativamente, los GC pueden regular la neurogénesis hipocampal directamente a través de los receptores a GC presentes en los progenitores neurales (Anacker *et al.*, 2013). La observación de que animales que carecen de neurogénesis presentan alteraciones en la secreción de GC provocados por estrés hace suponer que las neuronas recién formadas tienen un papel en la regulación de la retroalimentación del eje HPA (Sapolsky, 2000; Tsai *et al.*, 2015).

Estrés y programación temprana

Actualmente se sabe que las primeras etapas de la vida son determinantes del fenotipo que desarrollará un individuo y son clave en la programación de las respuestas fisiológicas que se activarán en etapas posteriores del desarrollo (Tarry-Adkins y Ozanne, 2011). Durante las primeras etapas de la vida un organismo percibe el ambiente en el que se desarrollará y prepara un fenotipo acorde al mismo; este fenómeno se conoce como programación temprana (Bale *et al.*, 2010). Las primeras evidencias de que el ambiente en que se desarrolla un individuo influye sobre su fenotipo provienen de las observaciones realizadas por Barker y Hales en 1992. En un

estudio sobre la prevalencia de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 en hombres de 64 años y una comparación con su peso neonatal, descubrieron que los hombres que registraron un menor peso al momento de nacer y un año después (hijos de madres con alimentación deficiente), tenían un mayor riesgo de desarrollar estas enfermedades (Barker *et al*, 1993). Las alteraciones como el aumento de la sensibilidad a la insulina, la reducción en la masa de células β pancreáticas y el número de islotes, y la estructura arterial alterada se consideran adaptaciones que confieren una ventaja en la vida posterior (Barker *et al*, 1993). Considerando que, si un organismo nació en un ambiente con pocos alimentos, muy probablemente se desarrollará en el mismo (y su alimentación será escasa), estas adaptaciones harían más eficiente el metabolismo al optimizar recursos energéticos. Esto es cierto en tanto las condiciones del ambiente permanezcan constantes (Nederhof y Schmidt, 2012). No obstante, si durante el desarrollo ocurre un cambio y el organismo tiene acceso a una gran variedad de alimentos, el fenotipo no será acorde con las circunstancias del ambiente y se creará un desajuste o *mismatch*. Es en tales circunstancias cuando las adaptaciones se vuelven desfavorables y se asocian con la aparición de patologías (Nederhof *et al.*, 2014). Estas observaciones, aunque se realizaron en etapas prenatales y se basaron en aspectos metabólicos también se pueden aplicar en etapas postnatales y al estrés.

La hipótesis de desajuste o *mismatch* establece que las experiencias adversas en las etapas tempranas de la vida desencadenan procesos de adaptación, que hacen que un individuo se adapte mejor a los desafíos aversivos más adelante en la vida (Nederhof y Schmidt, 2012). De acuerdo con esta hipótesis, un individuo que ha experimentado altos niveles de estrés temprano en la vida está programado para contender con niveles altos de estrés y, por lo tanto, estará mejor adaptado a elevados niveles de estrés en su vida posterior. Sin embargo, si los niveles de estrés no concuerdan con los experimentados en las etapas tempranas de la vida se puede producir la aparición de patologías (McEwen, 1998; Taylor, 2010). Por otro lado, la hipótesis del estrés acumulativo intenta explicar las consecuencias del estrés temprano desde otra perspectiva. De acuerdo a esta hipótesis, las experiencias adversas al principio de la vida predisponen a los individuos a ser más vulnerables a

los desafíos aversivos más adelante en la vida (Stewart, 2006). Se propone que los efectos de la exposición al estrés en el transcurso de la vida son acumulativos y conducen a la acumulación de carga alostática, lo que aumentaría la probabilidad de desarrollar patologías (Nederhof y Schmidt, 2012).

Dado que durante el periodo post-natal el hipocampo de la rata aún se encuentra en desarrollo es sensible a las elevaciones de los niveles de GC. El hipocampo tiene una gran cantidad de receptores a GC y la activación de estos durante esta etapa causada por estrés, puede afectar el desarrollo y la función del eje HPA, y causar modificaciones en el desempeño cognoscitivo, en la memoria, el aprendizaje y el comportamiento. Estas alteraciones son permanentes y pueden predisponer al individuo a enfermedades neurológicas (ver Matthews, 2002). La programación del eje HPA puede ser influenciado también por el cuidado materno. Se ha observado que, durante la primera semana de vida, la cantidad del cuidado materno hacia las crías puede modificar los patrones de metilación en el promotor del gen de GCR, alterando de esta forma el eje HPA hasta la edad adulta (Meaney y Szyf, 2005).

Estrés durante las etapas tempranas de la vida

El estrés puede presentarse de forma temprana en la vida en diversas situaciones y alterar el desarrollo del cerebro. Durante el desarrollo, el eje HPA está influenciado por factores externos, en particular por el entorno materno. El eje HPA madura progresivamente y se encuentra en un estado transitorio de hiporeactividad, durante los días postnatales 4 a 14 en roedores, que se caracteriza por un nivel circulante bajo y estable de corticosterona y una sensibilidad reducida a los factores estresantes (Sapolsky y Meaney, 1986). En humanos, durante la infancia, el estrés puede presentarse de diversas formas tales como el maltrato, la negligencia y el abandono (Brietzke et al., 2012). Esta exposición crónica al estrés provoca alteraciones fisiológicas y celulares en etapas posteriores del desarrollo. Se sabe que el estrés durante las etapas tempranas de la vida aumenta la probabilidad de padecer psicopatologías como depresión y ansiedad (Gilmer y McKinney, 2003), altera el desempeño cognoscitivo (Heim et al., 2008), causa una desregulación del eje HPA (Tarullo y Gunar, 2006), alteraciones metabólicas (Ruiz *et al.*, 2018), reducción del

volumen hipocampal y retraso en la maduración del hipocampo (Youssef *et al.*, 2019), acortamiento de los telómeros (Ridout *et al.*, 2019) y afecta la plasticidad neuronal como la sinaptogénesis (Derks *et al.*, 2016), la oligodendrogénesis (Teisser *et al.*, 2019) y la neurogénesis hipocampal (Loi *et al.*, 2014).

Modelo animal

Dado que hay una gran variación en la duración, frecuencia e intensidad de los estresores, estas mediciones deben realizarse en ambientes controlados. La separación maternal (SM) es el modelo más utilizado para evaluar los efectos del estrés en las etapas tempranas de la vida (Plotsky y Meaney, 1993; Wigger y Neumann, 1999). La SM consiste en la separación de las crías de rata de su madre por periodos de 3 horas diarias durante las primeras semanas de vida (Levine, 1967; Vetulani, 2013).

Se sabe que la SM, interrumpe el periodo de hiporeactividad al estrés, y causa una desregulación del eje HPA (Lajud *et al.*, 2012; Pihoker *et al.*, 1993, Wigger y Neumann, 1999). En ratas la SM causa aumento de la concentración de corticosterona en plasma y de CRH en el núcleo paraventricular y disminución en la densidad de receptores a GC en el hipocampo en la edad adulta (Aisa *et al.* 2008). Estos factores en combinación afectan la regulación por retroalimentación del eje HPA (Korosiet *al.* 2012). Los efectos de la SM también se pueden observar en la conducta. En experimentos que miden la conducta tipo depresiva utilizando la prueba de nado forzado se ha encontrado que los animales sometidos a SM pasan un menor tiempo en conducta de escalamiento y un mayor tiempo en conducta de inmovilidad (Aisa *et al.* 2007; Lajud *et al.*, 2012; Leussis *et al.*, 2012; Réus *et al.*, 2011, Ruiz *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2016). Por su parte, la SM también afecta los procesos de aprendizaje y memoria en la edad adulta por la SM, así como las tareas de aprendizaje espacial dependientes del hipocampo (Oomen *et al.* 2010).

Se ha propuesto que muchas de las alteraciones a largo plazo observadas en los animales sometidos a SM podrían estar relacionadas a modificaciones epigenéticas en los genes involucrados en la modulación del eje HPA (Murgatroyd y Spengler, 2011). Por ejemplo, se ha mostrado que la SM reduce significativamente el porcentaje

de metilación de la región promotora del gen CRH al día post-natal 61 (Chen *et al.*, 2012) y también aumenta la acetilación de la histona 3 en esta misma región (Wang *et al.*, 2014) a las 10 semanas de edad. Estas modificaciones correlacionaron con una actividad transcripcional aumentada del gen CRH en los animales sometidos a SM. También se ha visto que la SM disminuye el porcentaje de metilación de la secuencia potenciadora del gen AVP en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Murgatroyd *et al.*, 2009) a las 6 semanas de edad, lo que se traduce en una mayor expresión de AVP en las neuronas parvocelulares de esta región.

Adicionalmente, se ha observado que la SM afecta la estructura de las neuronas hipocámpales en la edad adulta. Los animales sometidos a SM muestran una disminución de la arborización de las dendritas y en la densidad de las espinas dendríticas en el giro dentado, CA3 y CA1, además de una reducción del número de neuronas granulares del giro dentado y una disminución en el volumen hipocámpal (Suri y Vaidya, 2015). El estrés temprano también afecta la neurogénesis hipocámpal. Durante las dos primeras semanales no se ha reportado una diferencia en la proliferación celular en individuos sometidos a SM (Nair *et al.*, 2006) sin embargo, a partir del día post-natal 21 se observa un aumento en la proliferación celular en los animales estresados (Nair *et al.*, 2006; Suri *et al.*, 2013). Nuestro grupo de investigación ha encontrado que la SM causa una disminución de la sobrevivencia celular, así como una disminución en la diferenciación celular hacia un fenotipo neuronal al día post-natal 15 en machos (Lajud *et al.*, 2012). Esta proliferación es temporal y en ratas adolescentes de 2 meses de edad no se han encontrado diferencias en las tasas de proliferación celular (Nair *et al.*, 2006; Suri *et al.*, 2013). No obstante, al evaluar al día pos-natal 70 se observa una disminución de la proliferación celular en los animales sometidos a SM (Mirescu *et al.*, 2004), que se mantiene durante toda la edad adulta y en etapas posteriores (Aisa *et al.*, 2009, Hulshof *et al.*, 2011, Suri *et al.*, 2013). Asimismo, se ha visto que la SM disminuye la sobrevivencia celular y la diferenciación celular hacia un fenotipo neuronal en animales adultos (Leslie *et al.*, 2011, Mirescu *et al.*, 2004).

Lesiones en el sistema nervioso central

Los animales salvajes son vulnerables a una gran variedad de amenazas en la naturaleza. La amenaza de lesiones físicas es una de las más comunes. La mayoría de las lesiones físicas se deben a interacciones inter e intraespecíficas (por ejemplo, depredación o disputas territoriales) pero otras causas naturales también pueden causar lesiones. Por ejemplo, muchos animales sufren lesiones por aplastamiento causadas por un trauma accidental. El aplastamiento ocurre cuando un individuo queda atrapado entre el suelo y un objeto sólido, a menudo un animal más grande. Las lesiones por impacto son otra causa en algunas especies de animales silvestres, especialmente aves durante su vuelo (Veltri y Klem, 2005). Las aves jóvenes también comúnmente caen de los nidos. En aves acuáticas, la causa más grave de las lesiones por impacto son las granizadas. Otra amenaza es la colisión con automóviles (Hujiser *et al.*, 2007). Ante el constante avance de vías carreteras en ambientes naturales y la invasión y fragmentación de hábitats que esto genera, aunado a la falta de puentes o corredores naturales, hace que los encuentros de animales con automóviles sean cada vez más frecuentes. Cuando no mueren, los animales pueden terminar con fracturas o daño a sistemas, como al SNC.

El estudio de los efectos de las lesiones del SNC, especialmente de traumatismos, puede ser abordado mediante el uso de diferentes técnicas. Existen varios modelos utilizados para inducir daños al SNC como el de lesión por percusión de fluido, la lesión cerebral penetrante tipo balístico, el modelo de caída de un peso, el de explosión inducida y el modelo de impacto cortical controlado (CCI por sus siglas en inglés). De todos ellos, el modelo CCI es el más utilizado debido a su alta precisión en el impacto causado (Romine y Chen, 2014). El CCI permite controlar diferentes variables como la velocidad, profundidad, ángulo, tamaño y forma de la lesión, lo que permite tener una mayor y mejor reproducibilidad del daño (Dixon *et al.*, 1991). En este modelo los animales se colocan en un marco estereotáxico, se les hace una craneotomía y se les aplica un impacto en el cerebro. El CCI utiliza aire a alta presión para empujar un pistón

o “impactador” sobre el cerebro y generar una lesión sin afectar la duramadre. La velocidad y profundidad del impacto determinan la intensidad del daño (Figura 2).

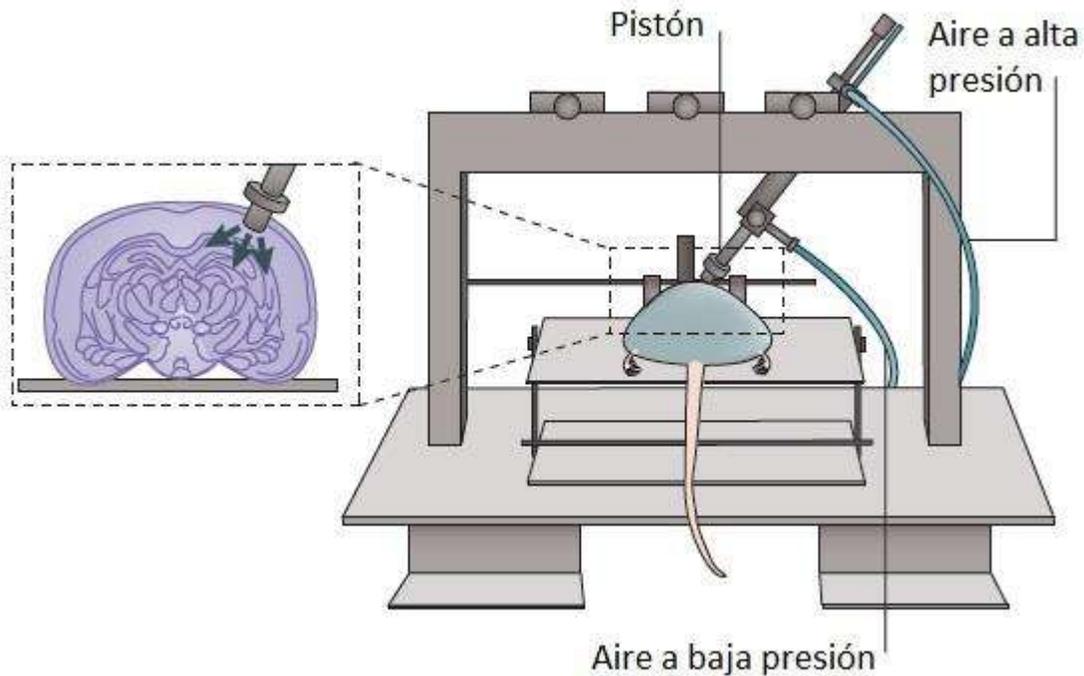


Figura 2. Representación del modelo CCI. La lesión es causada por aire a alta presión que empuja un pistón sobre el cerebro (Tomado de Xionget *al.*, 2003).

El CCI causa alteraciones en la memoria espacial y la neurogénesis (Wang *et al.*, 2016). Se sabe que el CCI provoca deficiencias a largo plazo en la memoria espacial, y sus efectos persisten desde 6 meses hasta un año después de la lesión (Bondi *et al.* 2015, Hamm *et al.*, 1992, Fox *et al.*, 1998, Scheff *et al.*, 1997). Las alteraciones en la memoria espacial se han atribuido a diferentes procesos moleculares que ocurren después de la lesión cerebral. Por ejemplo, se sabe que las membranas celulares son dañadas por efecto de la lesión cerebral y en respuesta, las células circundantes tienen una liberación excesiva de glutamato. El glutamato activa los receptores NMDA extrasinápticos que llevan a una elevación en los niveles de calcio intracelulares (Arundine y Tymianski, 2004). El desbalance en la homeostasis del calcio intracelular provoca una desregulación de las vías de señalización que promueven el estrés oxidativo mitocondrial y activan proteasas sensibles al calcio como caspasas y

calpains que inducen muerte celular (Gao *et al.*, 2011; Posmantur *et al.*, 1997). También el aumento en el tono inflamatorio provocado por la activación de microglia y astrocitos y la liberación de citocinas proinflamatorias puede aumentar la muerte celular al reducir el número de transportadores de glutamato glial, aumentando la concentración de glutamato en las sinapsis y en consecuencia, alterando la regulación de calcio intracelular (Wallach, 1997). Esta desregulación promueve la activación de calpaina y calcineurina que provoca la pérdida de espinas dendríticas afectando la transmisión sináptica (Block *et al.*, 2007).

Por su parte se ha observado que lesiones cerebrales promueven la neurogénesis hipocampal en el periodo inmediato a la lesión (Dash *et al.*, 2001, Richardson *et al.*, 2010). Los mecanismos moleculares exactos que operan cuando ocurre una lesión cerebral y que estimulan la neurogénesis no están aún del todo claros. Cuando se presenta un impacto externo sobre el cerebro se activan dos tipos de células gliales, los astrocitos y la microglía, cuya secreción de factores de crecimiento y moduladores inmunológicos puede intervenir en la proliferación y supervivencia de los progenitores neurales (Bessis *et al.*, 2007; Myer *et al.*, 2006). El cerebro dañado también libera iones y proteínas extracelulares que pueden regular la neurogénesis, tales como el KCl y el glutamato, que han sido asociados a una mejora en la proliferación de células inmaduras (Mattson, 2008; Shi *et al.*, 2007). Además, los niveles aumentados de factores de crecimiento y citocinas tras la lesión tienen un efecto sobre las células progenitoras (Kernie y Parent, 2010; Mignone *et al.*, 2004). Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en inglés) es un factor trófico que se expresa en el cerebro después de un trauma, cuya liberación se ha observado incrementa la neurogénesis después de una lesión cerebral (Lee y Agoston, 2010; Thau-Zuchman *et al.*, 2010).

Antecedentes

Resultados preliminares de nuestro grupo de investigación han mostrado que el estrés temprano afecta el desempeño cognoscitivo en pruebas de memoria espacial en individuos con lesión cerebral.

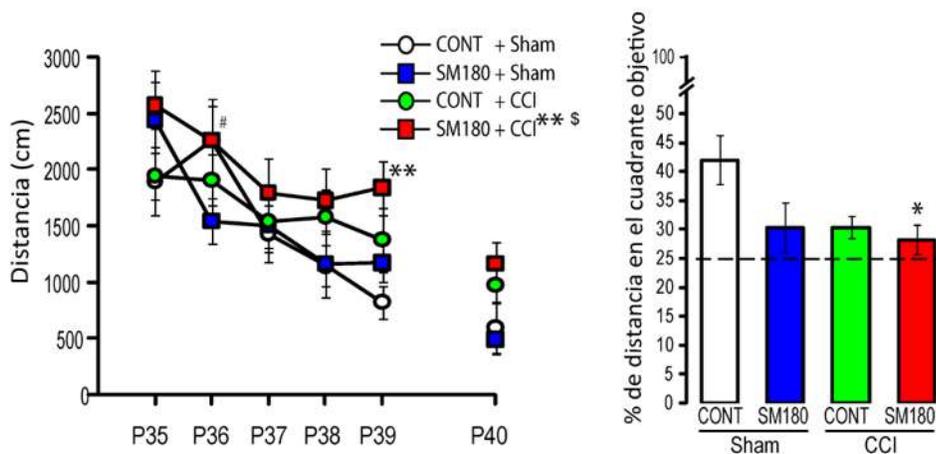


Figura 3. El CCI provoca deficiencias cognitivas en animales sometidos previamente a SM. Gráfica izquierda: Distancia recorrida para encontrar la plataforma durante la fase de adquisición (P35-P39) y la prueba de transferencia (P40). Gráfica derecha: Porcentaje de la longitud total de la trayectoria de nado en el cuadrante objetivo, con respecto a la trayectoria de nado total en los cuatro cuadrantes. (* $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$ vs CONT+Sham. Modificado de Díaz-Chávez *et al.*, 2020)

A pesar de que en la prueba de aprendizaje todos los grupos experimentales redujeron la distancia recorrida para encontrar la plataforma, sólo el grupo SM-CCI fue significativamente diferente y nadó una mayor distancia para alcanzar su objetivo al término de la prueba. Por su parte, en la prueba de memoria, el grupo SM-CCI también presentó deficiencias y fue el único grupo con diferencias significativas. Sin embargo, el mecanismo celular que subyace estos efectos no ha sido estudiado. Aunque los efectos de las lesiones al SNC y el estrés por medio de la SM sobre la neurogénesis han sido evaluados por separado, aún no existen trabajos que aborden ambos elementos en el mismo estudio. Por ello nuestra propuesta es estudiar el efecto del estrés en las etapas tempranas de la vida en un modelo de lesión al SNC mediante la evaluación de la neurogénesis asociada al desempeño cognoscitivo.

HIPÓTESIS

La SM aumenta los efectos de la lesión cortical sobre la neurogénesis hipocampal.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si la exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida agrava los efectos de las lesiones en el SNC sobre la neurogénesis hipocampal.

PARTICULARES

1. Evaluar los efectos de la SM sobre el aprendizaje espacial después del CCI.
2. Determinar si la SM aumenta el efecto del CCI sobre la proliferación celular hipocampal.
3. Determinar si la SM aumenta el efecto del CCI sobre la sobrevivencia celular hipocampal.
4. Caracterizar el fenotipo celular de los núcleos marcados con BrdU que sobreviven en la capa granular y subgranular del giro dentado.

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawley que se sometieron a SM del día postnatal (P) 1 al P21, por tres horas diarias. Las camadas se ajustarán a ocho individuos (seis machos y dos hembras) que durante la SM se colocaron en una caja independiente con aserrín nuevo y a una temperatura constante de 37°C. La mitad de las camadas se asignaron al grupo SM mientras que el resto permaneció con su madre sin ser perturbadas hasta el destete. Al P21, los animales se sometieron a una cirugía por impacto cortical controlado (CCI, 2.2 mm de profundidad, 4 m/s) por medio de un “cilindro neumático”, y un grupo control se sometió a un procedimiento quirúrgico idéntico sin recibir la lesión por impacto (SHAM). Para la evaluación de la neurogénesis se utilizó el marcador bromodeoxiuridina (BrdU, 50 mg/kg), un análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase S de la mitosis, por lo que se integra únicamente a células en proceso de división. La evaluación del desempeño cognoscitivo se realizó mediante la prueba del laberinto acuático de Morris. Esta técnica se ha utilizado como una medida de la navegación espacial dependiente del hipocampo y la memoria de referencia en ratas (Morris, 1984). Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico; posteriormente se perfundieron por vía intracardiaca y los cerebros se disecaron. Se obtuvieron cortes coronales de 40µm de grosor del hipocampo. La detección de BrdU se realizó mediante una inmunohistoquímica. Adicionalmente se realizaron inmunofluorescencias triples contra BrdU, el marcador de neuronas maduras NeuN y el marcador de neuronas inmaduras doblecortina (DCX), o el marcador de células gliales GFAP para determinar el fenotipo celular de los núcleos positivos a BrdU. El análisis estadístico del efecto de la SM y de la lesión se realizó por medio de una ANOVA. Todos los procedimientos respecto al manejo de los animales se realizaron de acuerdo a las normas de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), y con la aprobación del comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pittsburg, PA, EU, y de la Comisión Nacional de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (No. de registro FIS/IMSS/PROT/1769).

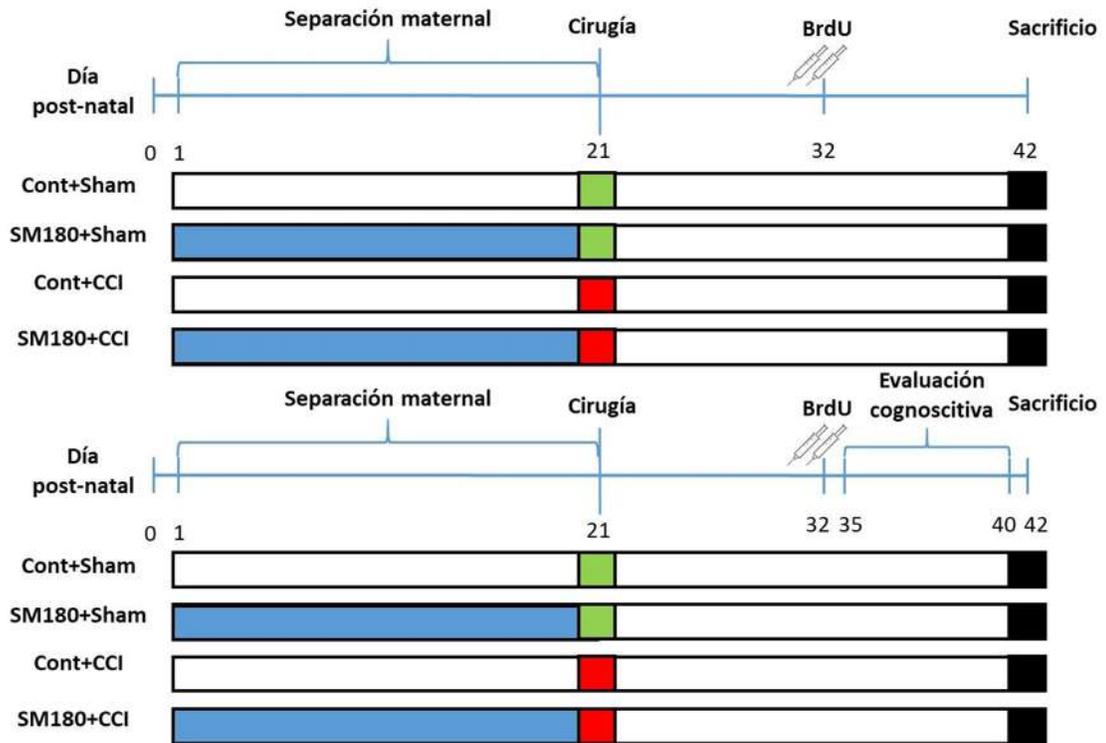


Figura 4. Diagrama esquematizado del diseño experimental.

MODELO DE ESTRÉS TEMPRANO

Separación maternal (SM)

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley que se sometieron a separación maternal (SM) o sirvieron como control (C). En el día del nacimiento, considerado el día postnatal (P) 0, las crías de todas las ratas fueron mezcladas aleatoriamente, agrupadas de acuerdo a su sexo y las camadas se ajustaron a 8 individuos (6 machos y 2 hembras) por camada. El P1 las crías del grupo SM fueron separadas de su madre y colocadas en una caja con aserrín en una habitación diferente con una temperatura controlada de 30-32°C por un periodo de 3 horas. Al término de este lapso, las ratas fueron devueltas con su madre. Esta técnica se repitió todos los días a la misma hora hasta el día del destete, el P21. Las crías del grupo control permanecieron con su madre sin alteración hasta el P21.

MODELO DE LESIÓN

Cirugía por impacto cortical controlado (CCI)

Al P21 las ratas macho se sometieron a una cirugía de impacto cortical controlado o Sham. Previamente, las ratas fueron anestesiadas con isofluorano al 10%. Una vez anestesiadas, las ratas fueron colocadas en un marco estereotáxico y se les realizó una craneotomía de 10 mm de diámetro que tuvo como límite anterior la sutura bregmática; límite posterior la sutura lambdaidea; límite medial la sutura sagital; y como límite lateral la base de la escama temporal con la ayuda de un taladro trepanador manual (Miltex Instrument Company Inc., Bethpage, NY). La lesión se produjo mediante el uso de un "impactador" acoplado a un cilindro neumático. La punta del impactador se colocó al centro de la craneotomía y descendió con una profundidad de 2.2 mm a 4 m/s para producir un impacto leve. Inmediatamente después, se retiró la anestesia, se suturó la incisión y se dejó recuperar a los animales dentro del laboratorio a una temperatura controlada de 30-32°C. Los individuos sham se sometieron a los mismos procedimientos descritos excepto a CCI.

Inyección de bromodesoxiuridina (BrdU)

Al P32 las ratas recibieron dos inyecciones intraperitoneales de bromodesoxiuridina (BrdU, 50mg/kg) con 12 horas de diferencia. El BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase S de la mitosis, por lo que se integra únicamente a células en proceso de división (Miller y Nowakowski, 1988).

EVALUACIÓN CONDUCTUAL

Laberinto acuático de Morris

La evaluación del desempeño cognoscitivo se realizó mediante la prueba del laberinto acuático de Morris. Esta técnica se ha utilizado como una medida de la navegación espacial dependiente del hipocampo y la memoria de referencia en ratas (Morris, 1984). La prueba se realizó del P37 al P41. El laberinto consta de una tina circular (180 cm de diámetro x 60 cm de altura) dividida en cuadrantes que se llena con agua hasta una altura de 28 cm a una temperatura aproximada de 26°C, y se ubica al centro de una habitación que contiene señales visuales. En el cuadrante suroeste se coloca una plataforma de 26 cm de altura. La prueba consistió en cuatro ensayos diarios, con 4 minutos de tiempo interensayo, durante cinco días consecutivos. En cada ensayo, la rata se colocó dentro del laberinto partiendo de un cuadrante diferente y se le dio un tiempo máximo de 120 segundos para encontrar la plataforma. En caso de no encontrar el objetivo en el tiempo establecido, la rata fue guiada manualmente hacia la plataforma. Todas las ratas permanecieron 30 segundos en la plataforma y posteriormente fueron llevadas a su caja. El P42 se realizó una prueba con la plataforma elevada 2 cm sobre el nivel del agua para determinar la contribución de factores como la agudeza visual y el desempeño sensorio-motor. Se registró el tiempo que tardó la rata en encontrar la plataforma en todas las pruebas. La participación en tareas de orientación espacial puede aumentar la neurogénesis hipocampal, por lo que para contar con un control de esta variable utilizamos un grupo en condiciones basales denominado *Naïve* que a diferencia del grupo Comportamiento se sometió a los mismos procedimientos excepto a la prueba en el laberinto acuático de Morris.

PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Al término de las pruebas conductuales, las ratas recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico y fueron perfundidas por vía intracardiaca en 200 ml de solución de lavado (NaCl 0.9%) y 200 ml de solución fijadora (paraformaldehído 4% en buffer de fosfatos 0.1 M). Los cerebros se disecaron, se colocaron en solución fijadora por 24 horas y después en sacarosa al 30% en buffer de fosfatos (PB, 0.1 M) hasta que decantaron. Los cerebros se congelaron en 2-metil butano y se realizó un muestreo sistemático aleatorio de cortes de 40µm de grosor a lo largo del eje rostro-caudal del hipocampo utilizando un criostato. Los cortes se colocaron en tubos con solución crioprotectora (glicerol 25%, etilenglicol 25%, PB 50%) hasta su utilización.

EVALUACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL

Inmunohistoquímica

Se seleccionaron dos tubos de cortes con una distancia de 240µm entre ellos. Los cortes de cerebro fueron lavados en PB por 5 minutos y después incubados en PBT (PB + tritón 0.3%; peróxido de hidrógeno al 10%) por 10 minutos para inactivar las peroxidases endógenas. Posteriormente se incubaron en metanol absoluto por 30 minutos, se lavaron en PB (3 x 10 minutos) y se incubaron en formamida (SSC 50%) a 70°C durante 2 horas. Después de un lavado de SSC (5 minutos), los cortes se incubaron en HCl 1N a 37°C por 30 minutos y en una solución de buffer de boratos (pH 8) durante 10 minutos. Luego de lavar en PB (3 x 10 minutos) el tejido se incubó en el anticuerpo primario anti BrdU (ratón anti-BrdU, Roche Molecular, 1:1000) o anti-Ki67 en PBT (suero de caballo 5%) por una noche. Los cortes se lavaron en PB (3 x 10 minutos), se incubaron en el anticuerpo secundario acoplado a biotina (cabra anti-ratón, Vector Laboratories, 1:750) en PBT (suero de caballo 5%) durante 2 horas y nuevamente se lavaron en PB (3 x 10 min). La amplificación de la señal se realizó con el complejo avidina-biotina (Elite ABC kit, Vector Laboratories, 1:200 en PB) durante 90 minutos, los cortes se lavaron con PB (3 x 10 minutos) y se incubaron en solución de revelado Ni-DAB (DAB staining kit, Vector Laboratories) durante 10 minutos

siguiendo las indicaciones del proveedor. Los tejidos se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con cubreobjetos y Cytoseal 60.

Cuantificación de los núcleos positivos contra BrdU y Ki67

La visualización de las laminillas se realizó con un microscopio (Axioscope, Karl Zeiss) y un objetivo de 40x. Se cuantificará el número de núcleos inmunopositivos a BrdU localizados en la zona granular y sub-granular del giro dentado del hipocampo utilizando un contador de células manual. Para el cálculo del área se tomarán microfotografías utilizando el programa Axiovision Real 4.0 (Karl Zeiss) y un objetivo de 5x. Adicionalmente se calculará la densidad de núcleos marcados y el volumen del hipocampo.

DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO CELULAR

Inmunofluorescencia

Para caracterizar el fenotipo celular de los núcleos marcados con BrdU se realizaron inmunofluorescencias triples contra BrdU, el marcador de neuronas maduras NeuN y el marcador de células gliales GFAP, y el marcador de células inmauras DCX. Se comenzó con un lavado en PB por 5 minutos seguida de incubación en formamida (SSC 50%) a 70°C durante 2 horas. Después de un lavado de SSC (5 minutos), los cortes se incubaron en HCl 1N a 37°C por 30 minutos y en una solución de buffer de boratos (pH 8) por 10 minutos. Luego de lavar en PB (3 x 10 minutos) el tejido se incubó en el anticuerpo primario anti NeuN (ratón anti-NeuN, Merk-Millipore, 1:300) en PBT (suero de caballo 5%) por una noche. Los cortes se lavaron en PB (3 x 10 minutos), y se incubaron en el anticuerpo secundario (Cabra anti ratón Alexa Fluor 647 Invitrogene) en PBT (suero de caballo 5%) por 3 horas y se lavaron en PB (3 x 10 min). Posteriormente se incubaron en anticuerpo primario (rata anti BrdU, ABD Serotec 1:200, conejo anti GFAP, Merk-Millipore 1:300) por una noche. Luego de lavar en PB (3 x 10 min) los tejidos se incubaron en anticuerpo secundario (Burro anti rata DyLight 405 Jackson Immuno Research, cabra anti conejo Alexa Fluor 488) durante 3 horas,

se lavaron en PB (3 x 10 minutos) y se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con cubreobjetos y medio de montaje para fluorescencia marca DAKO.

Evaluación de la co-localización

Para evaluar la co-localización con respecto al total de núcleos BrdU+ se utilizó un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000 y un objetivo 20X. Las imágenes fueron procesadas con el programa “FluoView FV10-ASW 2.0”.

Análisis estadísticos

Para evaluar la latencia de escape en el laberinto acuático de Morris realizamos un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con la SM como primer factor, la lesión cerebral como segundo factor y el día del entrenamiento como factor repetido. Para el análisis de inmunorreactividad para BrdU y Ki-67, y para el análisis de co-localización de BrdU con GFAP, DCX y NeuN realizamos una ANOVA de dos factores con la SM como primer factor y la lesión cerebral como segundo factor. Cuando alguno de los factores resultó estadísticamente significativo ($p < 0.05$) realizamos una prueba post-hoc de Tukey.

RESULTADOS

Efecto de la SM y la lesión cerebral sobre el aprendizaje espacial

Encontramos un efecto significativo de la lesión y del día de entrenamiento sobre la latencia de escape ($F_{1,114}=4.841$, $p=0.04$ y $F_{4,114}=10.3$, $p<0.0001$, respectivamente). No hubo efecto significativo de la SM180 ni de la interacción entre ninguno de los factores ($p<0.05$). Los resultados muestran que el grupo Cont+SM180 tuvo un desempeño similar en el tiempo para encontrar la plataforma que el grupo Cont+Sham, sugiriendo que el estrés temprano por sí solo no afectó negativamente la orientación espacial en esta tarea. Por su parte, el grupo Cont+CCI tampoco difirió significativamente del grupo Cont+Sham en ningún día de la prueba ($p>0.05$). De manera interesante, aunque el estrés y la lesión no causaron deficiencias cognitivas de forma independiente, observamos que el grupo SM180+CCI presentó una mayor latencia de escape en los días 1, 4 y 5 de la prueba (Fig. 5).

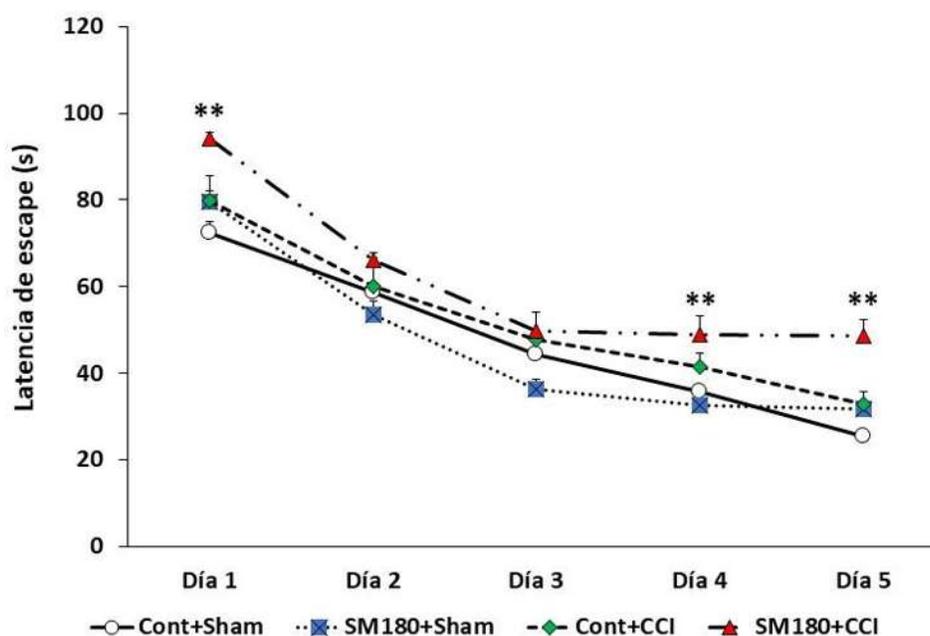


Figura 5. El CCI provoca deficiencias cognitivas en animales sometidos previamente a SM180. Latencia de escape en segundos en el laberinto acuático de Morris durante la fase de adquisición. (PROM \pm EST, $n=5$: Cont+Sham, $n=6$: SM180+Sham, Cont+CCI, SM180+CCI, ANOVA, ** $p \leq 0.01$ vs CONT-Sham).

Efecto del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris sobre la proliferación y la sobrevivencia celular del giro dentado

Dado que la participación en tareas de orientación espacial puede aumentar la neurogénesis hipocampal, utilizamos un grupo que no fue evaluado en el laberinto acuático de Morris denominado Naïve para contar con un control de esta variable. Los resultados del ANOVA de tres factores mostraron efecto significativo de la lesión cerebral sobre el número de núcleos Ki67+ ($F_{1,36}=6.006$, $p=0.02$), sin embargo, no encontramos un efecto significativo del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, de la SM ni de la interacción entre ningún factor, por lo que se mezclaron los grupos y se analizaron juntos (Fig. 6). En cuanto a la sobrevivencia celular, los resultados del ANOVA de tres factores mostraron un efecto significativo de la lesión cerebral sobre el número de núcleos BrdU+ ($F_{1,35}=25.869$, $p<0.001$), pero no del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, de la SM ni de la interacción entre ningún factor (Fig. 6), por lo que los grupos se mezclaron y se analizaron juntos

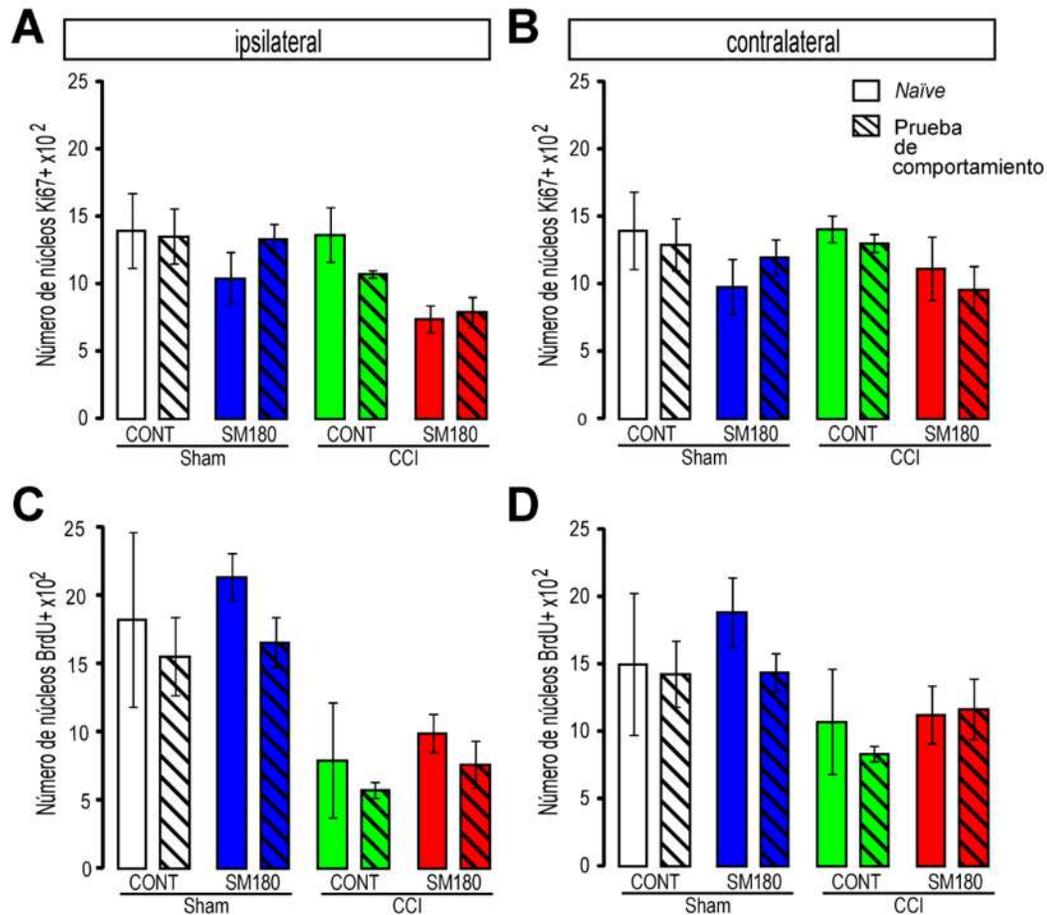


Figura 6. El entrenamiento en el laberinto acuático de Morris no tiene efectos significativos sobre la proliferación y sobrevivencia celular del giro dentado del hipocampo. Estimaciones estereológicas del número total de núcleos (A y B) Ki-67+ y (C y D) BrdU+ en la capa granular y subgranular del giro dentado del hipocampo ipsilateral (A y C) y contralateral (B y D) en condiciones basales (Naïve, barras sin trama) y después del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris (barras con trama) (PROM \pm EST, Grupo naïve: n= 5: Cont+Sham, SM180+Sham, Cont+CCI, SM180+CCI; Grupo sometido a la prueba de comportamiento: n= 5: Cont+Sham, SM180+CCI, ANOVA).

Efecto de la SM y la lesión cerebral sobre la proliferación celular del giro dentado

El análisis estadístico para el número de células KI67 reveló que en el hipocampo ipsilateral la SM180 y la lesión cerebral tuvieron un efecto significativo sobre el número de células Ki-67+ ($F_{1,36}=5.890$, $p=0.02$ y $F_{1,36}=4.619$, $p=0.03$, respectivamente), pero la interacción no resultó significativa. El análisis de comparaciones múltiples mostró que únicamente el grupo SM180+CCI presentó una disminución significativa de la proliferación celular respecto al grupo Cont+Sham. El análisis del hipocampo contralateral no reveló diferencias significativas entre los factores ni entre los grupos ($p>0.05$) (Fig. 7).

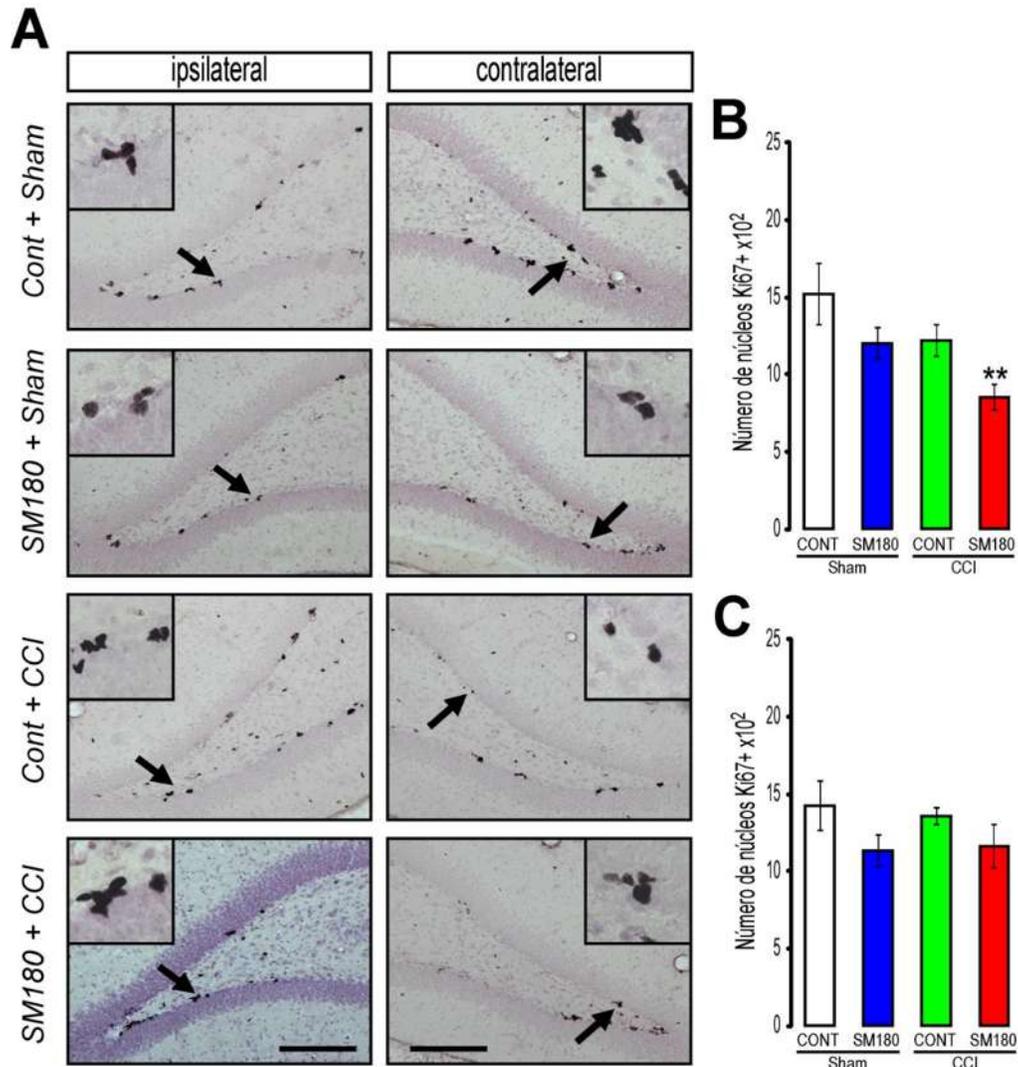


Figura 7. La SM180 reduce la proliferación celular en el hipocampo ipsilateral después del CCI. (A) Imágenes representativas de una inmunotinción contra Ki67 en el hipocampo ipsilateral y contralateral de crías control (Cont) o sometidas a separación maternal (SM180) que fueron sometidas a cirugía CCI o Sham. Estimaciones estereológicas del número total de núcleos Ki-67+ en el hipocampo (B) ipsilateral y (C) contralateral en la capa granular y subgranular del giro dentado. (PROM \pm EST, n=10: Cont+Sham, Cont+CCI; SM180+Sham, SM180+CCI, ANOVA, ** $p < 0.01$ vs. CONT + Sham. Barra de escala= 200 μ m).

Efecto de la SM y la lesión cerebral sobre la sobrevivencia celular del giro dentado

En cuanto al número total de células, en el hipocampo ipsilateral observamos un efecto significativo debido a la lesión ($F_{1,35}=12.589$; $p=0.001$), sin efecto de la SM o de la interacción ($p>0.05$). La prueba post-hoc reveló que los grupos Cont+CCI y SM180+CCI tuvieron una reducción significativa en el número de núcleos BrdU+ respecto al grupo Cont+Sham. El análisis del hipocampo contralateral mostró un efecto significativo de la lesión ($F_{1,35}=10.8$, $p=0.002$), sin efecto de la SM180 o de la interacción sobre el número total de células BrdU+; sin embargo, las comparaciones múltiples no revelaron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 8).

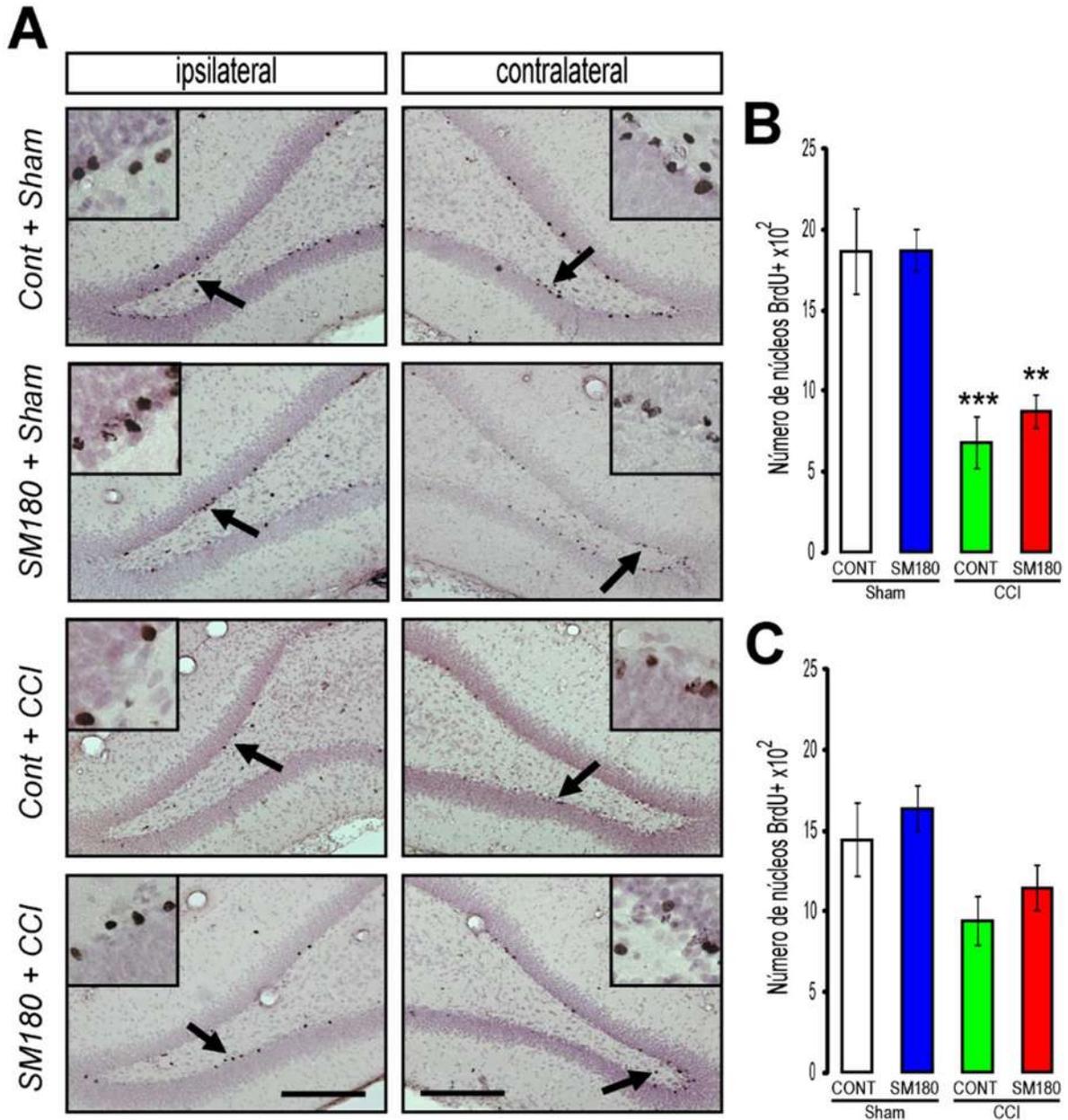


Figura 8. El CCI disminuye la sobrevivencia celular en la capa subgranular del giro dentado ipsilateral. (A) Imágenes representativas de una inmunotinción contra BrdU en el hipocampo ipsilateral y contralateral de crías control (Cont) o sometidas a separación maternal (SM180) que fueron sometidas a cirugía CCI o Sham. Estimaciones estereológicas del número total de núcleos BrdU+ en el hipocampo (B) ipsilateral y (C) contralateral en la capa granular y subgranular del giro dentado. (PROM \pm EST, n=9: MS180+Sham; n=10: Cont+Sham, Cont+CCI, SM180+CCI, ANOVA, ** p < 0.01 vs. CONT + Sham. Barra de escala= 200 μ m).

Efecto de la SM180 y la lesión cerebral sobre el volumen de la capa granular y subgranular

En el hipocampo ipsilateral, el volumen de la capa granular y sub-granular se alteró por efecto de la lesión ($F_{1,36}=41.9$, $p<0.0001$), lo que resultó en un volumen significativamente menor en los grupos Cont+CCI y SM180+CCI. No encontramos un efecto significativo de la SM180 o de la interacción. Al calcular el volumen del hipocampo contralateral no encontramos valores significativos de ningún factor ni tampoco diferencias significativas entre los grupos ($p>0.05$) (Fig. 9).

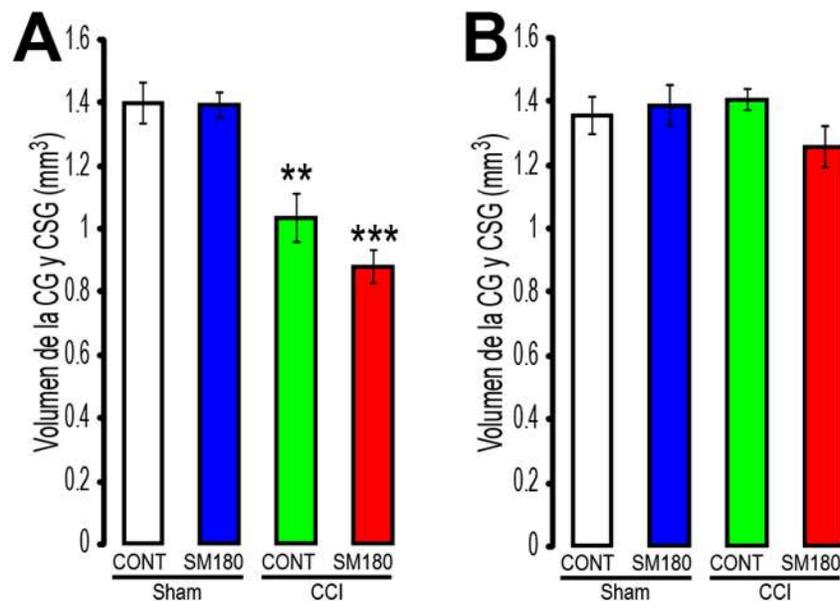


Figura 9. La lesión cerebral disminuye el volumen de la capa granular y sub-granular del GD. Volumen de la capa granular y sub-granular del giro dentado hipocampo ipsilateral (A) y contralateral (B) de crías control (Cont) o sometidas a separación maternal (SM180) que fueron sometidas a cirugía CCI o Sham (PROM \pm EST, n=10: Cont+Sham, Cont+CCI; SM180+Sham, SM180+CCI, ANOVA, ** $p<0.01$ vs. CONT + Sham, *** $p<0.001$ vs. CONT + Sham).

Efecto de la SM180 y la lesión cerebral sobre la diferenciación celular de los núcleos BrdU+.

En cuanto al porcentaje de co-localización de células BrdU+ con los marcadores de neuronas inmaduras (DCX), neuronas maduras (NeuN) y astrocitos (GFAP), no encontramos valores significativos atribuibles a la SM180, a la lesión ni a su interacción ($p > 0.05$). Sin embargo, al hacer una estimación de la proporción de células BrdU+ que co-localizan con el marcador de neuronas inmaduras DCX en el hipocampo ipsilateral observamos un efecto significativo de la lesión ($F_{1,35} = 84.8, p < 0.0001$). La proporción de células BrdU+/NeuN+ también se vio afectada por la lesión ($F_{1,35} = 42.2, p < 0.0001$). Un análisis de comparaciones múltiples reveló que la proporción de células BrdU+/DCX+ y BrdU+/NeuN+ se redujo en los grupos Cont+CCI y SM180+CCI respecto al grupo Cont+Sham (Fig. 10). Por último, la proporción de células BrdU+/GFAP+ también tuvo un efecto significativo de la lesión ($F_{1,35} = 12, p = 0.001$), que se reflejó en una disminución únicamente en el grupo SM180+CCI respecto al grupo Cont+Sham (Fig. 11).

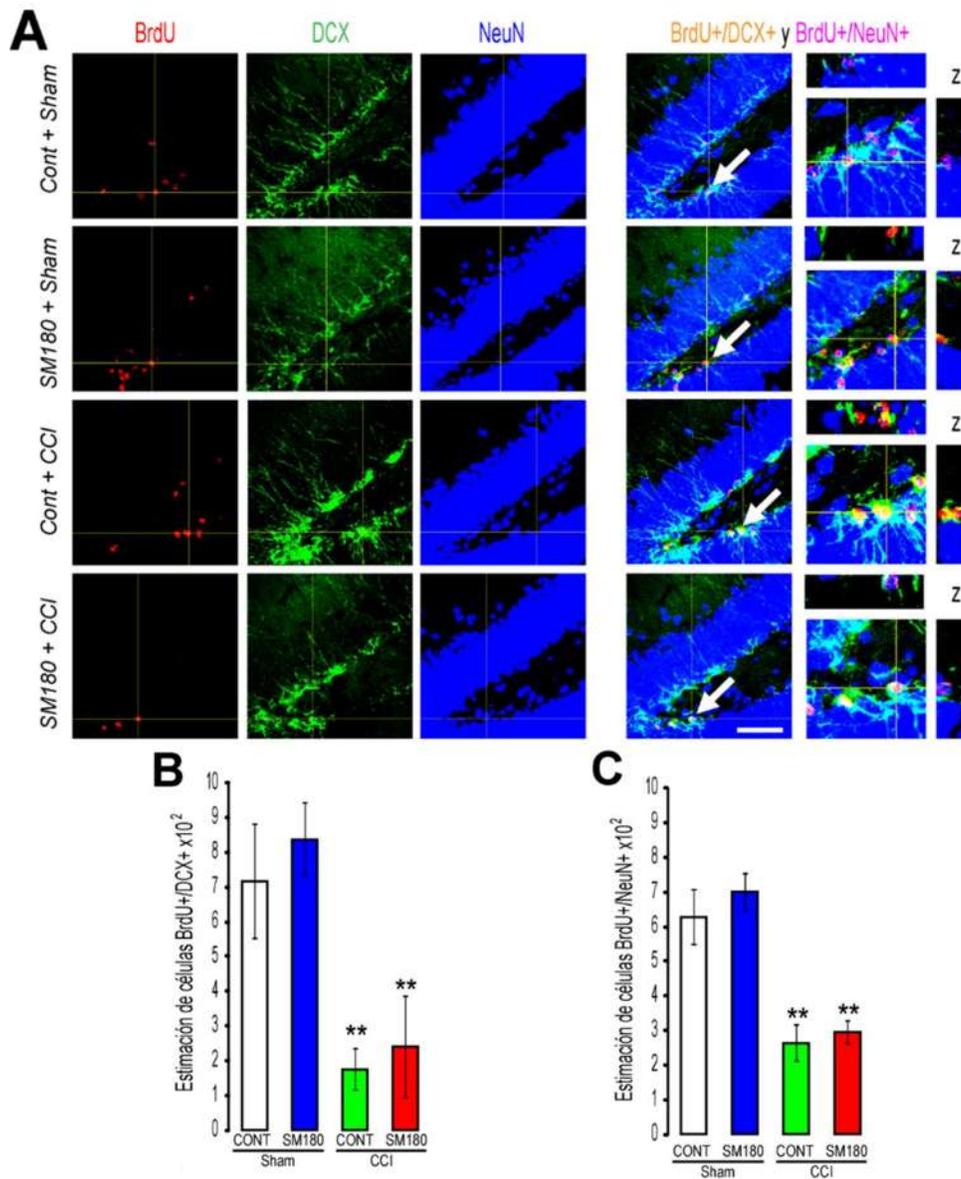


Figura 10. La lesión disminuye la proporción de neuronas maduras e inmaduras en la capa granular y subgranular del giro dentado. A) Imágenes de reconstrucciones obtenidas mediante microscopía confocal y sus respectivas representaciones ortogonales (z) de una inmunofluorescencia contra Bromodesoxiuridina (BrdU, rojo), el marcador de neuronas inmaduras doblecortina (DCX, verde) y el marcador de neuronas maduras (NeuN, azul). Estimación de células BrdU+ que co-localizan con B) DCX y C) NeuN y (PROM±EST, n= 10: CONT + Sham, SM180 + Sham, CONT+CCI, SM180+CCI. ANOVA. ** $p \leq 0.01$ vs Cont+Sham. Barra de escala = 100µm).

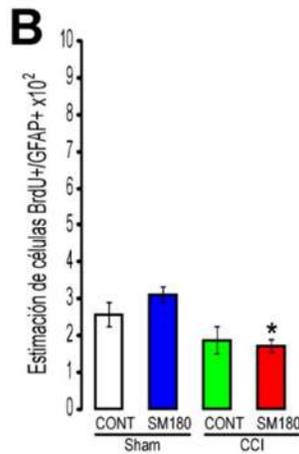
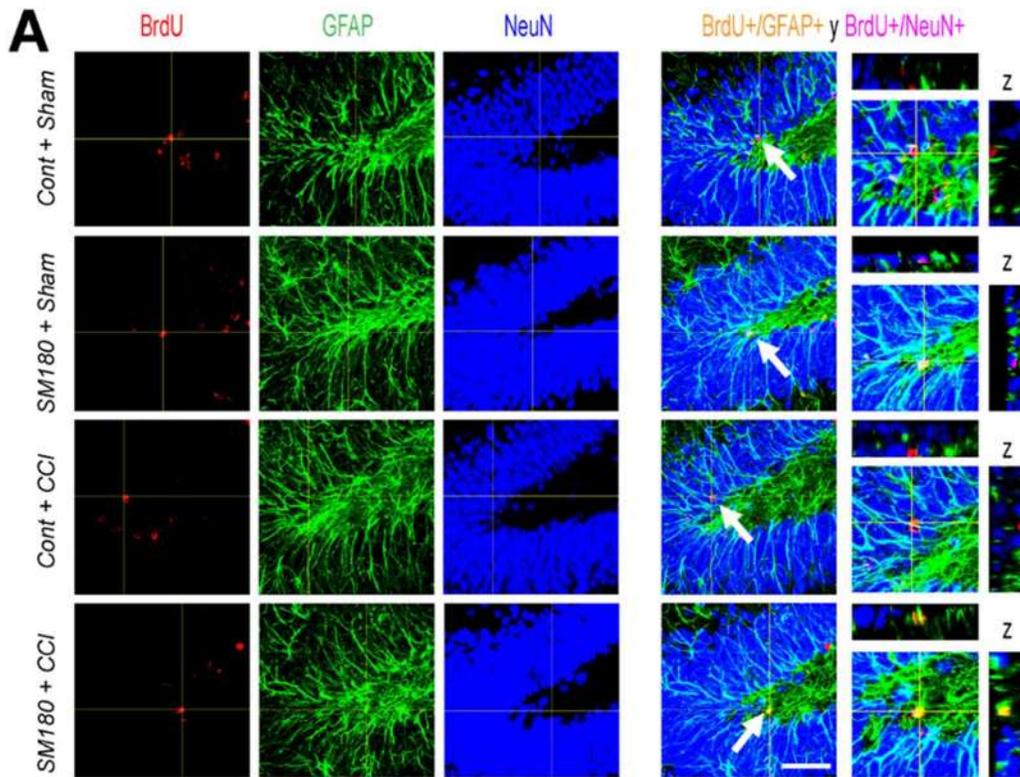


Figura 11. La SM180 disminuye la proporción de astrocitos después del CCI en la capa granular y subgranular del giro dentado. A) Imágenes de reconstrucciones obtenidas mediante microscopía confocal y sus respectivas representaciones ortogonales (z) de una inmunofluorescencia contra Bromodesoxiuridina (BrdU, rojo), el marcador de células gliales (GFAP, verde) y el marcador de neuronas maduras (NeuN, azul). Estimación de células BrdU+ que co-localizan con B) GFAP (PROM±EST, n= 10: CONT + Sham, SM180 + Sham, CONT+CCI, SM180+CCI. ANOVA. * $p \leq 0.05$ vs Cont+Sham. Barra de escala = 100 μ m).

DISCUSION

A pesar de que los efectos del estrés durante las etapas tempranas de la vida y las lesiones cerebrales sobre la neurogénesis han sido evaluados por separado, la interacción entre ambas no ha sido abordada hasta el momento, por lo que este es el primer trabajo en evaluar el efecto de la SM y una lesión cerebral sobre la neurogénesis hipocampal inducida por el aprendizaje. Por otra parte, mientras que los pocos trabajos que existen sobre estrés y lesiones cerebrales emplean individuos adultos (Acosta *et al.*, 2013; Davies *et al.*, 2016; Ogier *et al.*, 2017; Ojo *et al.*, 2016; Xing *et al.*, 2013), nosotros utilizamos un modelo de estrés crónico durante las primeras 3 semanas de vida para evaluar el desempeño cognoscitivo en una prueba de aprendizaje y memoria después de una lesión cerebral. En el presente trabajo mostramos que el CCI provocó deficiencias en el desempeño cognoscitivo en animales que habían sido sometidos a estrés posnatal mediante separación maternal. Observamos que la lesión provocó una reducción en el volumen hipocampal y una disminución de la sobrevivencia celular, sin afectar la proliferación celular. La proporción de células que se diferencian hacia fenotipo neural o glial no se vio afectada por ninguno de los tratamientos. Sin embargo, observamos que la SM en combinación con la lesión cerebral causó una disminución de la proliferación celular y en el número de células gliales de reciente formación.

Una de las deficiencias que más se reporta después de una lesión cerebral es la alteración en el aprendizaje y la memoria espacial. Estas deficiencias se han descrito en modelos animales que han sido evaluados utilizando el laberinto acuático de Morris. En tales estudios, la lesión cerebral se ha asociado no sólo con una mayor latencia de escape, sino también con una mayor distancia para encontrar la plataforma (Dawish *et al.*, 2012; Scheff *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1991). Nuestros resultados no revelaron deficiencias en el laberinto acuático de Morris causadas por la lesión en la latencia de escape durante la fase de adquisición, no obstante, esto puede interpretarse en el contexto de la intensidad de la lesión recibida. Diversos trabajos han mostrado que el grado de deficiencia en el laberinto acuático de Morris es proporcional a la intensidad de la lesión (Hamm *et al.*, 1993; Scheff *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1991). Por lo general,

únicamente las lesiones cerebrales severas causan déficits cognoscitivos (Clausen *et al.*, 2005). La lesión que empleamos fue de una intensidad leve, por lo que no fue lo suficientemente intensa para causar alteraciones en el aprendizaje espacial en esta tarea. Por su parte, la SM tampoco causó déficits en el aprendizaje en nuestro estudio. Otros trabajos que emplean un protocolo de SM similar al nuestro (3 horas diarias durante las primeras semanas de vida) han encontrado que el estrés afecta negativamente el desempeño en el laberinto acuático de Morris (Aisa *et al.*, 2007, 2009; Hui *et al.* 2011; Huot *et al.*, 2002). Sin embargo, las evaluaciones se han llevado a cabo en organismos adultos. En este trabajo se utilizaron ratas adolescentes por lo que, al menos en la edad en que se evaluaron, tales deficiencias no se observaron y no podemos descartar que en etapas posteriores del desarrollo puedan aparecer. El hallazgo más importante fue que únicamente el grupo que recibió la lesión y que previamente había sido sometido a SM presentó una latencia de escape significativamente mayor los días 1, 4 y 5 de la prueba. Esto sugiere que el CCI, cuya magnitud no es capaz de causar por sí misma deterioro cognoscitivo, provoca alteraciones del aprendizaje espacial cuando está precedido por separación maternal.

Durante el periodo hiporesponsivo al estrés, el eje HPA se encuentra en un estado transitorio de maduración por lo que la exposición a estresores durante esta etapa puede causar alteraciones permanentes en ciertas formas de plasticidad neuronal como la neurogénesis (Franklin *et al.* 2012, Lippmann *et al.* 2007). La SM ocurre durante este periodo y su efecto sobre la neurogénesis ha sido reportado con resultados variados. Por ejemplo, se ha reportado un aumento de la proliferación al día post-natal 21 (Nair *et al.*, 2007; Suri *et al.*, 2013). Sin embargo, pasado el periodo neonatal hay una tendencia hacia una disminución de la proliferación que se mantiene en la edad adulta en individuos sometidos a SM (Aisa *et al.*, 2009; Hulshof *et al.*, 2011; Mirescu *et al.*, 2004; Suri *et al.*, 2013). En el presente trabajo, la SM no causó alteraciones en la proliferación medida por el número y densidad de células Ki67+ en el giro dentado. Este resultado es congruente si se considera que la proliferación produce cambios bifásicos con la edad y la evaluación se llevó a cabo en un punto intermedio entre el periodo neo-natal y la edad adulta. Los efectos de las lesiones cerebrales sobre la neurogénesis varían dependiendo del periodo post-lesión en que

se midan. Se ha reportado que, tras una lesión, hay un aumento en la tasa de proliferación celular en la zona subgranular del giro dentado (Dash *et al.*, 2001; Gao y Chen, 2013). Se ha sugerido que este aumento en la neurogénesis es un mecanismo de reparación celular en respuesta a la lesión (Sun *et al.*, 2007). La tasa de proliferación en el giro dentado alcanza un pico máximo a los 2 días post-lesión y va disminuyendo con el tiempo, regresando a sus valores basales 14 días después de la lesión (Sun *et al.*, 2007). En este trabajo evaluamos la proliferación 21 días después de la lesión, por lo que en concordancia con lo descrito en otros estudios no encontramos diferencias en la proliferación celular ocasionadas por la lesión cerebral en el giro dentado del hipocampo.

También se ha evaluado el efecto de la SM sobre la sobrevivencia celular. La mayoría de los estudios muestran que la SM no tiene efectos sobre la sobrevivencia celular (Greisen *et al.*, 2005, Hulshof *et al.*, 2011, Mirescu *et al.*, 2004), sin embargo, también existe evidencia contradictoria donde se ha observado que puede causar disminución de la sobrevivencia y diferenciación (Lajud *et al.*, 2012; Leslie *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2018). En el presente trabajo, no observamos efecto de la SM sobre la sobrevivencia neuronal al P42 en concordancia con la mayoría de los estudios. Las lesiones cerebrales ocasionan un aumento temporal de la neurogénesis; no obstante, al día 30 y 90 post-lesión se observa una marcada reducción de la sobrevivencia en comparación con individuos control (Neuberger *et al.*, 2017). Un estudio encontró que en los animales que sufrieron una lesión, solamente el 46% de las células sobreviven hasta 10 semanas después de una lesión moderada, en comparación con el 65% en los animales sham (Sun *et al.*, 2007).

La medición del volumen de la capa granular y sub-granular no mostró diferencias significativas ocasionadas por la SM. A pesar de que se ha relacionado el estrés crónico con una reducción del volumen hipocampal (Conrad *et al.*, 2006), otros trabajos que utilizan la SM como estresor crónico tampoco han encontrado diferencias en este parámetro (Hui *et al.*, 2011; Oomen *et al.*, 2009; Zalosnik *et al.*, 2014). Se pudo observar una marcada reducción del volumen hipocampal debido a la lesión lo cual también ha sido reportado en otros trabajos (Tate & Bigler, 2000).

La diferenciación celular ha sido evaluada también en eventos de estrés temprano y en presencia de lesiones cerebrales. Nosotros utilizamos tres marcadores celulares para determinar el fenotipo de los núcleos BrdU+ pero no encontramos diferencias significativas en ninguno de los grupos. A pesar de que se sabe que tanto la SM como la lesión pueden afectar la proporción de los fenotipos celulares generados en el giro dentado, otros trabajos tampoco han encontrado alteraciones en la diferenciación celular. Utilizando diferentes protocolos de estrés temprano se ha visto que no hay diferencias en la proporción de células GFAP+ (Oomen *et al.*, 2009), DCX+ (Hulshof *et al.*, 2010; Naninck *et al.*, 2014; Oomen *et al.*, 2011; Suri *et al.*, 2013) y NeuN+ (Youssef *et al.*, 2019). Ciertos trabajos que utilizan diversos modelos de lesión cerebral tampoco han encontrado diferencias en la proporción de células GFAP+ (Yu *et al.*, 2008; Ojo *et al.*, 2016), DCX+ (Acosta *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2018) y NeuN+ (Bye *et al.*, 2011). En el presente trabajo, a pesar de no encontrar diferencias en el porcentaje de co-localización de células BrdU+ con los marcadores DCX, NeuN y GFAP, la estimación de la proporción de células BrdU+ que se diferencian hacia un fenotipo neuronal (BrdU+/DCX+ y BrdU+/NeuN+) y glial (BrdU+/GFAP+) revelaron diferencias entre los grupos. Observamos que la lesión redujo la proporción de células que se diferencian hacia neuronas inmaduras (BrdU+/DCX+) y neuronas maduras (BrdU+/NeuN+) en la capa granular y sub-granular del giro dentado. No obstante, únicamente la combinación de la SM180 y la lesión cerebral causaron una disminución de células que se diferencian hacia un fenotipo glial (BrdU+/GFAP+) en la capa granular y sub-granular. Este resultado está en concordancia con lo observado en la proliferación celular. Dado que GFAP se expresa tanto en astrocitos como en células madre neurales (Ganat *et al.*, 2006), la disminución en la proporción de células BrdU+/GFAP+ podría deberse no solo a una disminución de astrocitos, sino de células madre neurales, lo que podría explicar la disminución observada en la proliferación celular en el grupo SM180+CCI.

La variación en los efectos de la SM sobre aspectos como la neurogénesis y el desempeño cognoscitivo podría estar relacionada con varios factores. En primer lugar el modelo de estrés empleado puede ser agudo o crónico. La SM es un modelo de estrés crónico, pero también es común utilizar un estresor agudo como la privación

maternal, que consiste en la separación de la cría de su madre por un periodo único de 24 hrs el día post-natal 3 (Rosenfeld *et al.*, 1992; Suchecki *et al.*, 2000). En ocasiones el grupo control solo es manipulado durante la limpieza rutinaria de las cajas (Ploj *et al.*, 2003), pero también es común separar a las crías por periodos de 15 minutos, ya que simula mejor las condiciones naturales cuando la madre sale a buscar alimento y tiene que separarse de sus crías (Lehmann y Feldon, 2000). En ciertos protocolos las crías permanecen juntas durante la SM (Huot *et al.*, 2002; Lippman *et al.*, 2007; Wilber *et al.*, 2007; Wilber y Wellman, 2009) pero en otros las ratas son separadas de la madre y de las otras crías (Kosten *et al.*, 2007; McCormick *et al.*, 1998; Zimmerberg *et al.*, 2009) lo que supone un estrés aún más pronunciado (Pryce y Feldon, 2003). La cepa utilizada, así como la especie también puede modificar el efecto de la SM sobre la neurogénesis. Por último, la fase postnatal en que se realiza la SM puede contribuir a las variaciones observadas en los estudios.

En el presente trabajo observamos que únicamente el grupo SM180+CCI presentó alteraciones en la prueba de aprendizaje espacial, apoyando la hipótesis que la pre-exposición al estrés exacerbaría los efectos de la lesión cerebral. Nuestros resultados no explican las deficiencias observadas en la prueba de aprendizaje espacial, por lo que es probable que otros mecanismos diferentes a la neurogénesis estén operando para causar tal efecto.

CONCLUSIONES

- EL CCI provoca deterioro cognoscitivo solamente en individuos sometidos a SM.
- La SM reduce la proliferación celular en el hipocampo ipsilateral después del CCI.
- La SM disminuye la proporción de células de reciente formación que se diferencian hacia astrocitos en el hipocampo ipsilateral después del CCI.

Bibliografía

- Acosta, S.A., Diamond, D.M., Wolfe, S., Tajiri, N., Shinozuka, K., Ishikawa, H., Hernandez, D.G., Sanberg, P.R., Kaneko, Y., y Borlongan, C.V. (2013). Influence of post-traumatic stress disorder on neuroinflammation and cell proliferation in a rat model of traumatic brain injury. *PLoS One* 8, e81585. 18.
- Aisa, B., Elizalde, N., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., and Ramírez, M.J. (2009). Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: Implications for spatial memory. *Hippocampus* 19, 1222–1231.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256-266.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., & Ramirez, M. J. (2008). Effects of maternal separation on hypothalamic–pituitary–adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience*, 154(4), 1218-1226.
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207(5000), 953-956.
- Alvarez-Buylla, A., & Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.*, 22(3), 629-634.
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2(4), 287.
- Ambrogini, P., Cuppini, R., Cuppini, C., Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Sartini, S. & Del Grande, P. (2000). Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* 286(1), 21-24.
- Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility—linking memory and mood. *Nat. Rev. Neurosci.*, 18(6), 335.
- Anacker, C., Cattaneo, A., Musaelyan, K., Zunszain, P. A., Horowitz, M., Molteni, R. & Thuret, S. (2013). Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(21), 8708-8713.
- Arundine, M., & Tymianski, M. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *CELL MOL LIFE SCI*, 61(6), 657-668.
- Aston-Jones, G. & Cohen, J. D. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 403–450 (2005).
- Bale, T. L., Baram, T. Z., Brown, A. S., Goldstein, J. M., Insel, T. R., McCarthy, M. M., Nemeroff, C.B., Reyes, T.M., Simerly, R.B., Susser, E.Z. & Nestler, E. J. (2010). Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol. Psychiatry*, 68(4), 314-319.
- Barker, D. J., Hales, C. N., Fall, C. H. D., Osmond, C., Phipps, K., & Clark, P. M. S. (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, 36(1), 62-67.
- Barth, E., Albuszies, G., Baumgart, K., Matejovic, M., Wachter, U., Vogt, J., Radermacher, P. & Calzia, E. (2007). Glucose metabolism and catecholamines. *Critic. Care Med.*, 35(9), S508-S518.
- Bertagna, X. (1994). Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrin. Metab. Clin North Am.*, 23(3), 467-485.
- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., & Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, 55(3), 233-238.

- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8(1), 57-69.
- Bondi, C. O., Semple, B. D., Noble-Haeusslein, L. J., Osier, N. D., Carlson, S. W., Dixon, C. E., Giza, C.C. & Kline, A. E. (2015). Found in translation: understanding the biology and behavior of experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav. Rev.*, 58, 123-146.
- Brietzke, E., Kauer-Sant'anna, M., Jackowski, A., Grassi-Oliveira, R., Bucker, J., Zugman, A. & Bressan, R. A. (2012). Impact of childhood stress on psychopathology. *Braz J Psychiatry*, 34(4), 480-488.
- Bülbring, E., & Tomita, T. A. D. A. O. (1987). Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacol. Rev.*, 39(1), 49-96.
- Bye, N., Carron, S., Han, X., Agyapomaa, D., Ng, S. Y., Yan, E. Rosenfeld, J.V. & Morganti-Kossmann, M. C. (2011). Neurogenesis and glial proliferation are stimulated following diffuse traumatic brain injury in adult rats. *J. Neurosci Res.*, 89(7), 986-1000.
- Cameron, H. A., & Christie, B. R. (2007). Do new neurons have a functional role in the adult hippocampus? *Dev. Neurosci.*, 1(1), 26-32.
- Cameron, H. A., & McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 435(4), 406-417.
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., & Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2), 337-344.
- Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.*, 9(3), 399-431.
- Cannon, W. B. (1932). Homeostasis. The wisdom of the body. Norton, Newyork.
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 259-284.
- Chen, C.C., Yang, C.H., Huang, C.C., and Hsu, K.S. (2010). Acute stress impairs hippocampal mossy fiber-CA3 long-term potentiation by enhancing cAMP-specific phosphodiesterase 4 activity. *Neuropsychopharmacology* 35, 1605–1617.
- Chovatiya, R., & Medzhitov, R. (2014). Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol. Cell*, 54(2), 281-288.
- Christian, K. M., Miracle, A. D., Wellman, C. L., & Nakazawa, K. (2011). Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors. *Neuroscience*, 174, 26-36.
- Chrousos, G. P. (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: the 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann. NY Acad. Sci.*, 851(1), 311-335.
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 5(7), 374.
- Clausen, F., Lewén, A., Marklund, N., Olsson, Y., McArthur, D. L., & Hillered, L. (2005). Correlation of hippocampal morphological changes and morris water maze performance after cortical contusion injury in rats. *Neurosurgery*, 57(1), 154-163.
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fragniere, A., Tyers, P. & Bussey, T. J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325(5937), 210-213.
- Conrad, C. D., Galea, L. A., Kuroda, Y., & McEwen, B. S. (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine treatment. *Behav. Neurosci.* 110(6), 1321.
- Daniels, W. M. U., Pietersen, C. Y., Carstens, M. E., & Stein, D. J. (2004). Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab. Brain Dis.*, 19(1-2), 3-14.

- Dash, P. K., Mach, S. A., & Moore, A. N. (2001). Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.*, 63(4), 313-319.
- Daskalakis, N. P., Oitzl, M. S., Schächinger, H., Champagne, D. L., & de Kloet, E. R. (2012). Testing the cumulative stress and mismatch hypotheses of psychopathology in a rat model of early-life adversity. *Physiol. Behav.*, 106(5), 707-721.
- Davies, D.R., Olson, D., Meyer, D.L., Scholl, J.L., Watt, M.J., Manzerra, P., Renner, K.J., and Forster, G.L. (2016). Mild traumatic brain injury with social defeat stress alters anxiety, contextual fear extinction, and limbic monoamines in adult rats. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 71. 19.
- Davies, K. J. (2016). Adaptive homeostasis. *Mol. Aspects Med.*, 49, 1-7.
- Dawish, H., Mahmood, A., Schallert, T., Chopp, M., & Therrien, B. (2012). Mild traumatic brain injury (MTBI) leads to spatial learning deficits. *Brain Inj.*, 26(2), 151-165.
- Dent, G. W., Okimoto, D. K., Smith, M. A., & Levine, S. (2000). Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology*, 71(6), 333-342.
- Derks, N. A., Krugers, H. J., Hoogenraad, C. C., Joels, M., & Sarabdjitsingh, R. A. (2016). Effects of early life stress on synaptic plasticity in the developing hippocampus of male and female rats. *PLoS one*, 11(10).
- Diaz-Chávez, A., Lajud, N., Roque, A., Cheng, J. P., Meléndez-Herrera, E., Valdéz-Alarcón, J. J., & Kline, A. E. (2020). Early life stress increases vulnerability to the sequelae of pediatric mild traumatic brain injury. *Exp. Neurol.*, 113318.
- Diorio, D., Viau, V., & Meaney, M. J. (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J. Neurosci.*, 13(9), 3839-3847.
- Dixon C, Kochanek P, Yan H, Schiding J, Griffith R, Baum E, Marion D, DeKosky S. One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. *J. Neurotrauma*. 1999; 16:109–122.
- Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghmai, A. A., & Hayes, R. L. (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 39(3), 253-262.
- Dostert, A., & Heinzl, T. (2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.*, 10(23), 2807.
- Dukas, R. (Ed.). (1998). *Cognitive ecology: the evolutionary ecology of information processing and decision making*. University of Chicago Press.
- Elenkov, I. J., & Chrousos, G. P. (2006). Stress system—organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation*, 13(5-6), 257-267.
- Fink, G. (2010). Stress: definition and history. *Stress Sci. Neuroendocrin.*, 3-9.
- Fox, G. B., Fan, L. E. I., Levasseur, R. A., & Faden, A. I. (1998). Sustained sensory/motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse. *J. Neurotrauma*, 15(8), 599-614.
- Francis, D. D., Zaharia, M. D., Shanks, N., & Anisman, H. (1995). Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: interstrain variability. *Phys. Behav.*, 58(1), 57-65.
- Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, 75(5), 747-761.
- Friston, K., Schwartenbeck, P., FitzGerald, T., Moutoussis, M., Behrens, T., & Dolan, R. J. (2014). The anatomy of choice: dopamine and decision-making. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369(1655), 20130481.
- Fuxe, K., Wikström, A. C., Okret, S., Agnati, L. F., Härfstrand, A., Yu, Z. Y. & Gustafsson, J. Å. (1985). Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology*, 117(5), 1803-1812.

- Ganat, Y. M., Silbereis, J., Cave, C., Ngu, H., Anderson, G. M., Ohkubo, Y. & Vaccarino, F. M. (2006). Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. *J. Neurosci.*, 26(33), 8609-8621.
- Gao, X., and Chen, J. (2013). Moderate traumatic brain injury promotes neural precursor proliferation without increasing neurogenesis in the adult hippocampus. *Exp. Neurol.* 239, 38–48.
- Gao, X., Deng, P., Xu, Z. C., & Chen, J. (2011). Moderate traumatic brain injury causes acute dendritic and synaptic degeneration in the hippocampal dentate gyrus. *PLoS one*, 6(9), e24566.
- Gilmer, W. S., & McKinney, W. T. (2003). Early experience and depressive disorders: human and non-human primate studies. *J. Affect. Disord.*, 75(2), 97-113.
- Goldstein, D. S. (2010). Adrenal responses to stress. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 30(8), 1433-1440.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.*, 2(3), 260.
- Gray, J. D., Kogan, J. F., Marrocco, J., & McEwen, B. S. (2017). Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 13(11), 661.
- Greisen MH, Altar CA, Bolwig TG, Whitehead R, Woitwein G. 2005. Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *J Neurosci Res.* 79: 772–778.
- Hamm, R. J., Dixon, C. E., Gbadebo, D. M., Singha, A. K., Jenkins, L. W., Lyeth, B. G., & Hayes, R. L. (1992). Cognitive deficits following traumatic brain injury produced by controlled cortical impact. *J. Neurotrauma*, 9(1), 11-20.
- Hamm, R. J., Lyeth, B. G., Jenkins, L. W., O'Dell, D. M., & Pike, B. R. (1993). Selective cognitive impairment following traumatic brain injury in rats. *Behav. Brain Res.*, 59(1-2), 169-173.
- Hanson, N. D., Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (2011). Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal. *Neuropsychopharmacology*, 36(13), 2589.
- Hardy, J.D. (1953). Control of heat loss and heat production in physiologic temperature regulation. *Harvey Lect.* 49, 242–270.
- Heim, C., Newport, D. J., Mletzko, T., Miller, A. H., & Nemeroff, C. B. (2008). The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 693-710.
- Herman, C. A., & Sandoval, E. J. (1983). Catecholamine effects on blood pressure and heart rate in the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocr.*, 52(1), 142-148.
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R. & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr. Physiol*, 6(2), 603.
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Solomon, M. B., Carvalho-Netto, E., & Myers, B. (2012). Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 45(4), 292-298.
- Herman, J. P., Prewitt, C. M. F., & Cullinan, W. E. (1996). Neuronal circuit regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 10(3-4).
- Hernández, J. D. O., Aguilar, E. J., & García, F. G. (2015). Hippocampus: neurogenesis and learning. *Rev. Méd. Univ. Ver.*, 15(1), 20-28.
- Howland, J. G., & Wang, Y. T. (2008). Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in the hippocampus. *Prog. Brain Res.*, 169, 145-158.
- Hui, J. J., Zhang, Z. J., Liu, S. S., Xi, G. J., Zhang, X. R., Teng, G. J., ... & Li, L. J. (2011). Hippocampal neurochemistry is involved in the behavioural effects of neonatal maternal separation and their reversal by post-weaning environmental enrichment: a magnetic resonance study. *Behav. Brain Res.*, 217(1), 122-127.

- Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PGM, Den Boer JA, Meerlo P. (2011) 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.* 216:552–60.
- Huot, R. L., Plotsky, P. M., Lenox, R. H., & McNamara, R. K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.*, 950(1-2), 52-63.
- Jacobs, L. F. (1995). The ecology of spatial cognition. *Behav. Brain Res. Nat. Semi-nat. Sett.* 301-322.
- Jacobson, L., & Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.*, 12(2), 118-134.
- Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat. Rev. Neurosci.*, 10(6), 459.
- Kalinichev, M., Easterling, K. W., Plotsky, P. M., & Holtzman, S. G. (2002). Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long–Evans rats. *Pharmacol. Bioch. Behav.*, 73(1), 131-140.
- Kernie, S. G., & Parent, J. M. (2010). Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.*, 37(2), 267-274.
- Kim, E. J., Pellman, B., & Kim, J. J. (2015). Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learn. Mem.*, 22(9), 411-416.
- Kim, J.J., Foy, M.R., and Thompson, R.F. (1996). Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4750–4753.
- Kleen, J. K., Sitomer, M. T., Killeen, P. R., & Conrad, C. D. (2006). Chronic stress impairs spatial memory and motivation for reward without disrupting motor ability and motivation to explore. *Behav. Neurosci.*, 120(4), 842.
- Klieber, M. A., Underhill, C., Hammond, G. L., & Muller, Y. A. (2007). Corticosteroid-binding globulin: structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release. *J. Biol. Chem.* 282(40), 29594-29603.
- Korosi, A., Naninck, E. F. G., Oomen, C. A., Schouten, M., Krugers, H., Fitzsimons, C., y Lucassen, P. J. (2012). Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. *Behav. Brain Res.*, 227(2), 400-409.
- Kosten, T. A., Karanian, D. A., Yeh, J., Haile, C. N, Kim J. J, Kehoe, P., & Bahr, B. A. (2007). Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 88(2), 167-176.
- Kotas, M. E., & Medzhitov, R. (2015). Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*, 160(5), 816-827.
- Krebs, J. R., Sherry, D. F., Healy, S. D., Perry, V. H., & Vaccarino, A. L. (1989). Hippocampal specialization of food-storing birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(4), 1388-1392.
- Kyrou, I., & Tsigos, C. (2009). Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9(6), 787-793.
- LaDage, L. D. (2015). Environmental change, the stress response, and neurogenesis. *Integr. Comp. Biol.*, 55(3), 372-383.
- Lagace, D. C., Donovan, M. H., DeCarolis, N. A., Farnbauch, L. A., Malhotra, S., Berton, O. & Eisch, A. J. (2010). Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 200910072.
- Lajud, N., & Torner, L. (2015). Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Front. Mol. Neurosci.*, 8, 3.

- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., & Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37(3), 410-420.
- Lee, C., & Agoston, D. V. (2010). Vascular endothelial growth factor is involved in mediating increased de novo hippocampal neurogenesis in response to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 27(3), 541-553.
- Lee, T., Jarome, T., Li, S. J., Kim, J. J., & Helmstetter, F. J. (2009). Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal MRI study. *Neuroreport*, 20(17), 1554.
- Lehmann J, Feldon J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev. Neurosci.* 2000;11:383–408.
- Leslie, A. T., Akers, K. G., Krakowski, A. D., Stone, S. S., Sakaguchi, M., Arruda- Carvalho, M., et al. (2011). Impact of early adverse experience on complexity of adult-generated neurons. *Transl. Psych.* 1:e35.
- Leussis, M. P., Freund, N., Brenhouse, H. C., Thompson, B. S., & Andersen, S. L. (2012). Depressive-like behavior in adolescents after maternal separation: sex differences, controllability, and GABA. *Dev. Neurosci.*, 34(2-3), 210-217.
- Levine, S. (1967). Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science*, 156, 258-260.
- Li, Q., Wang, S., Milot, E., Bergeron, P., Ferrucci, L., Fried, L. P., & Cohen, A. A. (2015). Homeostatic dysregulation proceeds in parallel in multiple physiological systems. *Aging Cell*, 14(6), 1103-1112.
- Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C. B., Plotsky, P. M., & Monteggia, L. M. (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Europ. J. Neurosci.*, 25(10), 3091-3098.
- Loi, M., Koricka, S., Lucassen, P., & Joëls, M. (2014). Age- and sex-dependent effects of early life stress on hippocampal neurogenesis. *Front. Endocr.*, 5, 13.
- Luine, V., Villegas, M., Martinez, C., & McEwen, B. S. (1994). Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res.*, 639(1), 167-170.
- Magarin, A. M., & McEwen, B. S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, 69(1), 89-98.
- Magariños, A. M., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1996). Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J. Neurosci.*, 16(10), 3534-3540.
- Maggio, N. and Segal, M. (2009). Differential modulation of longterm depression by acute stress in the rat dorsal and ventral hippocampus. *J. Neurosci.* 29, 8633–8638.
- Majzoub, J. A. (2006). Corticotropin-releasing hormone physiology. *Europ. J. Endocr.*, 155(suppl 1), S71-S76.
- Margioris AN, Tsatsanis C. ACTH Action on the Adrenals. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA): 2000.
- Matthews, S. G. (2002). Early programming of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Trends Endocr. Metab.* 13(9), 373-380.
- Mattson, M. P. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1144(1), 97-112.

- McCormick, C. M., Kehoe, P., & Kovacs, S. (1998). Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: Evidence of sensitization. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 16(3-4), 175-185.
- McEwen, B. S. (1998). Protective and damaging effects of stress mediators. *N Eng. J Med.*, 338(3), 171-179.
- McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.*, 43(1), 2-15.
- McEwen, B. S., Eiland, L., Hunter, R. G., & Miller, M. M. (2012). Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*, 62(1), 3-12.
- McKay LI, Cidlowski JA. Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
- Meaney, M. J., & Szyf, M. (2005). Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dial. Clin. Neurosci.*, 7(2), 103.
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutrition*, 130(4), 1007S-1015S.
- Mignone, J. L., Kukekov, V., Chiang, A. S., Steindler, D., & Enikolopov, G. (2004). Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J. Comp. Neurol.*, 469(3), 311-324.
- Miller, M. W., & Nowakowski, R. S. (1988). Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res.*, 457(1), 44-52.
- Ming, G. L., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4), 687-702.
- Mirescu, C., Peters, J. D., & Gould, E. (2004). Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat. Neurosci.*, 7(8), 841.
- Modell, H., Cliff, W., Michael, J., McFarland, J., Wenderoth, M. P., & Wright, A. (2015). A physiologist's view of homeostasis. *Adv. Phys. Ed.*, 39(4), 259-266.
- Moghaddam, B., Bolinao, M. L., Stein-Behrens, B., & Sapolsky, R. (1994). Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res.*, 655(1-2), 251-254.
- Monroy, E., Hernández-Torres, E., & Flores, G. (2010). Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *J. Chem. Neuroanat.*, 40(2), 93-101.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci Meth.*, 11(1), 47-60.
- Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21), 9697-9701.
- Murgatroyd, C., & Spengler, D. (2011). Epigenetic programming of the HPA axis: early life decides. *Stress*, 14(6), 581-589.
- Myer, D. J., Gurkoff, G. G., Lee, S. M., Hovda, D. A., & Sofroniew, M. V. (2006). Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain*, 129(10), 2761-2772.
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, 511(7509), 348.
- Naninck, E. F., Hoeijmakers, L., Kakava-Georgiadou, N., Meesters, A., Lazic, S. E., Lucassen, P. J., & Korosi, A. (2015). Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice. *Hippocampus*, 25(3), 309-328.

- Nederhof, E., & Schmidt, M. V. (2012). Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol. Behav.*, 106(5), 691-700.
- Nederhof, E., Ormel, J., & Oldehinkel, A. J. (2014). Mismatch or cumulative stress: The pathway to depression is conditional on attention style. *Psycholog. Sci.*, 25(3), 684-692.
- Neuberger, E.J., Swietek, B., Corrubia, L., Prasanna, A., and Santhakumar, V. (2017). Enhanced dentate neurogenesis after brain injury undermines long-term neurogenic potential and promotes seizure susceptibility. *Stem Cell Rep.* 9, 972–984.
- Newton, R., & Holden, N. S. (2007). Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor?. *Mol. pharmacol.*, 72(4), 799-809.
- Ogier, M., Belmeguenai, A., Lieutaud, T., Georges, B., Bouvard, S., Carre, E., Canini, F., Bezin, L., 2017. Cognitive deficits and inflammatory response resulting from mild-to-moderate traumatic brain injury in rats are exacerbated by repeated pre-exposure to an innate stress stimulus. *J. Neurotrauma* 34, 1645–1657.
- Ojo, J.O., Greenberg, M.B., Leary, P., Mouzon, B., Bachmeier, C., Mullan, M., Diamond, D.M., and Crawford, F. (2014). Neurobehavioral, neuropathological and biochemical profiles in a novel mouse model of co-morbid post-traumatic stress disorder and mild traumatic brain injury. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 213. 20.
- Oken, B. S., Salinsky, M. C., & Elsas, S. M. (2006). Vigilance, alertness, or sustained attention: physiological basis and measurement. *Clin. Neurophys.*, 117(9), 1885-1901.
- Olton, D. S., & Paras, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17(6), 669-682.
- Oomen C, Girardi C, Cahyadi R, Verbeek E, Krugers H, Baune B. (2009). Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PLoS One*;4:e3675.
- Oomen, C. A., Soeters, H., Audureau, N., Vermunt, L., van Hasselt, F. N., Manders, E. M., ... & Krugers, H. (2010). Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood. *J. Neuroscience*, 30(19), 6635-6645.
- Oomen, C.A., Soeters, H., Audureau, N., Vermunt, L., van Hasselt, F.N., Manders, E.M., Joëls M, Krugers, H., and Lucassen, P.J. (2011). Early maternal deprivation affects dentate gyrus structure and emotional learning in adult female rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 214, 249–260.
- Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol. Rev.*, 43(4), 425-473.
- Pavlidis, C., Nivón, L.G., and McEwen, B.S. (2002). Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 12, 245–257.
- Peters, A. J., Villasana, L. E., & Schnell, E. (2018). Ketamine alters hippocampal cell proliferation and improves learning in mice after traumatic brain injury. *Anesthesiology*, 129(2), 278-295.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P. R., & McEwen, B. S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Europ. J. Neurosci*, 17(4), 879-886.
- Pihoker, C., Owens, M. J., Kuhn, C. M., Schanberg, S. M., & Nemeroff, C. B. (1993). Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychoneuroendocrinology*, 18(7), 485-493.
- Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res. Mol.* 18, 195–200.
- Posmantur, R., Kampfl, A., Siman, R., Liu, S. J., Zhao, X., Clifton, G. L., & Hayes, R. L. (1997). A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience*, 77(3), 875-888.

- Pravosudov, V. V., & Roth II, T. C. (2013). Cognitive ecology of food hoarding: the evolution of spatial memory and the hippocampus. *Ann. Rev. Ecol. Ev. Syst.*, 44, 173-193.
- Pryce CR, Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2003;27:57–71.
- Réus, G. Z., Stringari, R. B., Ribeiro, K. F., Cipriano, A. L., Panizzutti, B. S., Stertz, L., ... & Quevedo, J. (2011). Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res.*, 36(3), 460-466.
- Rice, D., & Barone Jr, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. health perspect.*, 108(suppl 3), 511-533.
- Richardson, R. M., Singh, A., Sun, D., Fillmore, H. L., Dietrich III, D. W., & Bullock, M. R. (2010). Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair: A review. *J Neurosurgery*, 112(5), 1125-1138.
- Richter, C.P. (1943). Total self-regulatory functions in animals and human beings. *Harvey Lecture Series* 38, 63–103.
- Ridout, K. K., Parade, S. H., Kao, H. T., Magnan, S., Seifer, R., Porton, B. & Tyrka, A. R. (2019). Childhood maltreatment, behavioral adjustment, and molecular markers of cellular aging in preschool-aged children: A cohort study. *Psychoneuroendocrinology*, 107, 261-269.
- Robertson, S., Hapgood, J. P., & Louw, A. (2013). Glucocorticoid receptor concentration and the ability to dimerize influence nuclear translocation and distribution. *Steroids*, 78(2), 182-194.
- Rodríguez-Fernández, J. M., García-Acero, M., & Franco, P. (2012). Neurobiología del Estrés Agudo y Crónico: Su Efecto en el Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y la Memoria. *Rev. Ecuat. Neurol.*, 21(1-3).
- Romero, L. M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.*, 19(5), 249-255.
- Romine, J., Gao, X., & Chen, J. (2014). Controlled cortical impact model for traumatic brain injury. *J. Visual. Exp* (90).
- Roosendaal, B. (2000). Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 25(3), 213-238.
- Rosenfeld, P., Wetmore, J. B., & Levine, S. (1992). Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweaning rats. *Physiol. Behav.*, 52(4), 787-791.
- Ruiz, R., Roque, A., Pineda, E., Licona-Limón, P., Valdéz-Alarcón, J. J., & Lajud, N. (2018). Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology*, 96, 203-211.
- Sapolsky, R. M. (2000). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch of Gen. Psych.*, 57(10), 925-935.
- Sapolsky, R. M., & Meaney, M. J. (1986). Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev.*, 11(1), 65-76.
- Sapolsky, R. M., Meaney, M. J., & McEwen, B. S. (1985). The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. III. Negative-feedback regulation. *Dev. Brain Res.*, 18(1-2), 169-173.
- Scheff, S. W., Baldwin, S. A., Brown, R. W., & Kraemer, P. J. (1997). Morris water maze deficits in rats following traumatic brain injury: lateral controlled cortical impact. *J. Neurotrauma*, 14(9), 615-627.
- Schimmer, B. P., & Funder, J. W. (2011). ACTH, adrenal steroids, and pharmacology of the adrenal cortex. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 1209-1236.
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 6-17). Karger Publishers.

- Scott, L. V., & Dinan, T. G. (1998). Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life sciences*, 62(22), 1985-1998.
- Seasholtz, A. (2000). Regulation of adrenocorticotrophic hormone secretion: lessons from mice deficient in corticotropin-releasing hormone. *J. Clin. Inv.*, 105(9), 1187-1188.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138(3479), 32.
- Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *Brit. Med. J.*, 1(4667), 1383.
- Sherry, D. F. (1985). Food storage by birds and mammals. *Adv. Study Behav.* 15(5), 153-188.
- Shi, J., Miles, D. K., Orr, B. A., Massa, S. M., & Kernie, S. G. (2007). Injury-induced neurogenesis in Bax-deficient mice: evidence for regulation by voltage-gated potassium channels. *Europ. J. Neurosci*, 25(12), 3499-3512.
- Smith, D. H., Okiyama, K., Thomas, M. J., Claussen, B., & McIntosh, T. K. (1991). Evaluation of memory dysfunction following experimental brain injury using the Morris water maze. *J. neurotrauma*, 8(4), 259-269.
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dial. Clin Neurosci.*, 8(4), 383.
- Smulders, T. V., Gould, K. L., & Leaver, L. A. (2010). Using ecology to guide the study of cognitive and neural mechanisms of different aspects of spatial memory in food-hoarding animals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1542), 883-900.
- Snyder, J. S., Choe, J. S., Clifford, M. A., Jeurling, S. I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J. F., et al. (2009). Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J. Neuroscience*, 29(46), 14484-14495
- Spiers, Hugo. (2012). Hippocampal Formation. *Encyclopedia Hum. Behav.* 2. 297-304.
- Sterling P, Eyer J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. En: Fisher S, Reason J, editors. *Handbook of life stress, cognition and health*. New York: John Wiley; 1988. p. 629-49.
- Stewart, J. A. (2006). The detrimental effects of allostasis: allostatic load as a measure of cumulative stress. *J. Phys. Anthropol.*, 25(1), 133-145.
- Suchecki, D., Duarte Palma, B., & Tufik, S. (2000). Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. *Behav. Brain Res.*, 111(1-2), 99-106.
- Sun, D., McGinn, M. J., Zhou, Z., Harvey, H. B., Bullock, M. R., & Colello, R. J. (2007). Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. *Exp. Neurol.*, 204(1), 264-272.
- Suri, D., & Vaidya, V. A. (2015). The adaptive and maladaptive continuum of stress responses—a hippocampal perspective. *Rev. Neurosci.*, 26(4), 415-442.
- Suri, D., Veenit, V., Sarkar, A., Thiagarajan, D., Kumar, A., Nestler, E.J., Galande, S., and Vaidya, V.A. (2013). Early stress evokes agedependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol. Psychiatry* 73, 658–666.
- Tank, A. W., & Lee Wong, D. (2015). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr. Physiol.*, 5(1), 1-15.
- Tarry-Adkins, J. L., & Ozanne, S. E. (2011). Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions—. *Am. J. Clin. Nut.* 94(suppl_6), 1765S-1771S.
- Tarullo, A. R., & Gunnar, M. R. (2006). Child maltreatment and the developing HPA axis. *Horm. Behav.*, 50(4), 632-639.
- Tata, D. A. (2012). Maternal separation as a model of early stress: effects on aspects of emotional behavior and neuroendocrine function. *Hell. J. Psychol.*, 9, 84-101.

- Tate, D. F., & Bigler, E. D. (2000). Fornix and hippocampal atrophy in traumatic brain injury. *Learn. Mem.*, 7(6), 442-446.
- Taylor, S. E. (2010). Mechanisms linking early life stress to adult health outcomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(19), 8507-8512.
- Teissier, A., Le Magueresse, C., Olusakin, J., da Costa, B. L. A., De Stasi, A. M., Bacci, A., & Gaspar, P. (2019). Early-life stress impairs postnatal oligodendrogenesis and adult emotional behaviour through activity-dependent mechanisms. *Mol. Psychiatry*, 1-16.
- Thau-Zuchman, O., Shohami, E., Alexandrovich, A. G., & Leker, R. R. (2010). Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Met.*, 30(5), 1008-1016.
- Tsai, C. Y., Tsai, C. Y., Arnold, S. J., & Huang, G. J. (2015). Ablation of hippocampal neurogenesis in mice impairs the response to stress during the dark cycle. *Nat. Comm.*, 6, 8373.
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psych. Res.*, 53(4), 865-871.
- Tsigos, C., Kyrou, I., Kassi, E., & Chrousos, G. P. (2016). Stress, endocrine physiology and pathophysiology.
- Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., & Lajud, N. (2016). Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with postweaning social isolation in rats. *PloS one*, 11(9), e0162665.
- Veltri, C. J., & Klem Jr, D. (2005). Comparison of fatal bird injuries from collisions with towers and windows. *J. Field Ornithol.* 76(2), 127-133.
- Vetulani, J. (2013). Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol. Rep.*, 65(6), 1451-1461.
- Walker, C. D., Sapolsky, R. M., Meaney, M. J., Vale, W. W., & Rivier, C. L. (1986). Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat. *Endocrinology*, 119(4), 1816-1821.
- Wallach, D. (1997). Cell death induction by TNF: a matter of self control. *Trends Biochem. Sci.*, 22(4), 107-109.
- Wang, X., Gao, X., Michalski, S., Zhao, S., & Chen, J. (2016). Traumatic brain injury severity affects neurogenesis in adult mouse hippocampus. *J. Neurotrauma*, 33(8), 721-733.
- Watanabe, Y., Gould, E., & McEwen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.*, 588(2), 341-345.
- Westfall TC, Westfall DP. Neurotransmission: The autonomic and somatic motor nervous systems. In: Brunton LL, editor. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12th ed). McGraw Hill Medical, 2011, pp. 171-218.
- Wigger, A., & Neumann, I. D. (1999). Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Phys. Behav.*, 66(2), 293-302.
- Wilber, A. A., & Wellman, C. L. (2009). Neonatal maternal separation alters the development of glucocorticoid receptor expression in the interpositus nucleus of the cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 27(7), 649-654.
- Wilber, A. A., Southwood, C. J., Sokoloff, G., Steinmetz, J. E., & Wellman, C. L. (2007). Neonatal maternal separation alters adult eyeblink conditioning and glucocorticoid receptor expression in the interpositus nucleus of the cerebellum. *Dev. Neurobiol.*, 67(13), 1751-1764.
- Witter, M. P. (2007). The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.*, 163, 43-61.

- Xing, G., Barry, E.S., Benford, B., Grunberg, N.E., Li, H., Watson, W.D., and Sharma, P. (2013). Impact of repeated stress on traumatic brain injury-induced mitochondrial electron transport chain expression and behavioral responses in rats. *Front. Neurol.* 4, 196.
- Yu, T. S., Zhang, G., Liebl, D. J., & Kernie, S. G. (2008). Traumatic brain injury-induced hippocampal neurogenesis requires activation of early nestin-expressing progenitors. *J. Neuroscience*, 28(48), 12901-12912.
- Yun, J., Koike, H., Ibi, D., Toth, E., Mizoguchi, H., Nitta, A. & Nagai, T. (2010). Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.*, 114(6), 1840-1851.
- Zalosnik, M. I., Pollano, A., Trujillo, V., Suarez, M. M., & Durando, P. E. (2014). Effect of maternal separation and chronic stress on hippocampal-dependent memory in young adult rats: Evidence for the match-mismatch hypothesis. *Stress*, 17(5), 445-450.
- Zheng, W., ZhuGe, Q., Zhong, M., Chen, G., Shao, B., Wang, H. & Jin, K. (2013). Neurogenesis in adult human brain after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 30(22), 1872-1880.
- Zimmerberg, B., Foote, H. E., & Van Kempen, T. A. (2009). Olfactory association learning and brain-derived neurotrophic factor in an animal model of early deprivation. *Dev. Psychobiol.*, 51(4), 333-344.