



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE MICHOACAN,
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**“Efectos del estrés postnatal sobre la supervivencia de los precursores
neurales en el hipocampo de la rata neonata”.**

Tesis para obtener el grado de
Maestría en Farmacología Básica

Que presenta la alumna:
QFB. Mónica Juárez Cervantes.

TUTOR: D.C. Luz Torner Aguilar.

2009

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**.

Por mi formación académica desde la preparatoria hasta la Facultad de Químico farmacobiología de esta universidad y ahora al Departamento de Posgrado de la Facultad de Ciencias Medicas y Biológicas “ Dr. Ignacio Chávez” por la culminación formal de la maestría en Farmacología Básica.

A todos mis profesores de la maestría ya que sin su ayuda así como enseñanzas no sería posible este trabajo.

Al **Instituto Mexicano del Seguro Social. (IMSS)**

Ya que dentro del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI) del IMSS se llevó acabo la realización de este trabajo. Por todas las facilidades prestadas para que este se llevará acabo en especial al **Laboratorio de Neuroendocrinología**.

A la **D.C. Luz Torner Aguilar** mi tutora y guía de esta tesis, por todo tu apoyo, por permitirme la oportunidad de sentir la ciencia de cerca, por todas tus enseñanzas sobre Neurociencia por presentarme un panorama actual así como internacional del conocimiento por toda tu ayuda y apoyo para lograr culminar este trabajo sobretodo por tu amistad. “Muchas gracias Luz”.

Así también a mis compañeras del laboratorio de Neuroendocrinología y a todos los integrantes del CIBIMI. “Gracias por hacer los largos días de trabajo buenos días de convivencia.”

Al **Instituto de Neurobiología de la UNAM** por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A mis compañeras de la maestría.

Ya que las largas jornadas dentro de las aulas y fuera de ellas logró unir a diferentes personas que tenían una meta en común y que más haya del conocimiento también se logró una gran amistad. “Gracias por esos grandes momentos juntas”.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES.

Quiero agradecer a “**Dios**” por la vida tan llena de plenitud que me ha permitido tener, por los logros que me ha ayudado a conseguir, entre ellos la realización de esta tesis que hoy presento y que más haya de un reto profesional se ha convertido en una satisfacción de vida.

“Gracias Dios mío porque siempre estás conmigo”.

A mis padres:

Este trabajo solo refleja apoyo y cariño de una vida junto a ustedes, gracias por la confianza y fe depositada siempre en mí, por sus palabras de aliento y de consuelo cuando han sido necesarias.

El ejemplo que ustedes me han dado con su esfuerzo y su trabajo hoy aquí se ven reflejados. “Gracias por enseñarme y darme herramientas para luchar y lograr las metas propuestas.”

A mis hermanos y sobrinos:

La familia es quién siempre está contigo “Gracias por ser mi familia”.

A Ricardo.

De la manera menos esperada llegaste a mi vida en medio de mi travesía por la ciencia, tu apoyo, tus ánimos, tu confianza así como tu amor, han sido parte importante de este trabajo.

“Gracias por vivir junto a mi este proyecto y ser parte fundamental de mi nuevo proyecto.”

Que la vida nos ponga siempre metas más altas que alcanzar, para siempre tener nuevos objetivos por los cuales luchar, aún cuando las condiciones parezcan adversas, siempre hay un motivo, una razón para seguir adelante y la retribución llegará, ya que los retos siempre vienen acompañados de grandes satisfacciones. “Simplemente gracias a todos los involucrados directa e indirectamente para que este trabajo se haya llevado a cabo”.

QFB Mónica Juárez Cervantes.

INDICE

Tema	Página
Introducción.....	3
Estrés: Definición.....	4
Activación del eje hipotálamo-pituitaria-suprarrenales (HPA).....	6
Consecuencias en el cerebro del aumento de Glucocorticoides.....	7
Estrés postnatal : importancia y consecuencias.....	8
Consecuencias de la exposición al estrés.....	9
Alteraciones del eje HPA y el Hipocampo.....	9
Neurogénesis : definición.....	10
Zonas de Neurogénesis.....	10
Factores que aumentan o disminuyen la neurogénesis.....	12
Justificación.....	13
Hipótesis.....	13
Objetivo general	13
Objetivos particulares.....	14
Materiales y métodos.....	14
Resultados	22
Discusión.....	30
Conclusiones.....	37
Referencias.....	38

INTRODUCCIÓN

La respuesta al estrés forma parte integral de los sistemas biológicos adaptativos. Dicha respuesta, que abarca cambios conductuales y fisiológicos, se requiere tanto en los humanos como en otros animales para funcionar dentro de los confines de un medio ambiente dinámico y a menudo hostil (Chrousos, 1998). Diferentes estudios han demostrado que la exposición crónica al estrés predispone al padecimiento de trastornos afectivos lo que se acompaña de alteraciones morfofuncionales en el hipocampo y otras estructuras cerebrales y de una hiperactividad del eje hipotálamo-pituitaria-suprarrenales (eje HPA).

La exposición crónica al estrés durante periodos postnatales o en la etapa adulta provoca la disminución de los precursores neurales en el hipocampo así como el aumento de la ansiedad y alteraciones neuroendocrinas. (Mc Intosh 1999). Un modelo experimental en ratas es el de la separación maternal, el cual consiste en separar a las crías de la madre por varias horas al día durante los primeros días de vida postnatal lo cual es un estresor suficientemente adverso para activar al eje HPA aun durante el periodo postnatal, el cual se caracteriza por ser hiporresponsivo (Huot R.L. Plotsky P. M. 2002).

En condiciones normales, después de las dos primeras semanas de nacimiento la rata madre deja el nido materno regularmente, separándose de la camada por periodos de diez minutos a una hora, dependiendo de la edad de las crías sin que haya daños aparentes en su desarrollo. (Kalinichev, Plotsky 2002). Sin embargo, separaciones frecuentes mayores a dos horas de duración son suficientes para provocar alteraciones morfológicas y funcionales en el hipocampo y otras estructuras cerebrales de la progenie. Esto resulta en alteraciones de la ansiedad en la etapa adulta (Plotsky y Meaney 1993, Heim,

Nemeroff 2001) ya que los animales neonatos, especialmente los mamíferos, necesitan de los estímulos de la madre (como caricias y estímulos táctiles) los cuales son fundamentales para el desarrollo de las crías así como la respuesta adecuada de estas al estrés. (Caldji Christian 1997).

En este trabajo presentamos el establecimiento del modelo experimental de la Separación Materna dentro del laboratorio de Neuroendocrinología, del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, perteneciente al IMSS.

Estrés.

La activación del sistema de estrés produce una serie de cambios físicos y conductuales de tiempo limitado que son notablemente consistentes en su presentación cualitativa y que han sido llamados colectivamente como Síndrome de estrés o de Adaptación general (Chrousos, 1998). Selye definió el estrés como la respuesta no específica del organismo a cualquier demanda (Carrasco G.A. 2003).

La exposición a una condición hostil (Estresor) da lugar a una serie de respuestas organizadas para asegurar la probabilidad de sobrevivir. Esta respuesta se conoce como respuesta al estrés la cual se compone de alteraciones en el comportamiento y la secreción de múltiples hormonas como la Hormona adrenocorticotropa (ACTH), y cortisol (glucocorticoides; corticosterona en animales) por el eje hipotálamo – pituitaria – suprarrenales (o eje HPA), y la secreción de catecolaminas suprarrenales, oxitocina, prolactina y renina (Van de Kar y Blair 1999).

Existen algunos cambios físicos asociados al estrés como son:

- 1) Movilización de la energía para mantener la función muscular y cerebral,
- 2) Mantener al sistema en estado de alerta,

- 3) Aumento en el gasto cardiaco,
- 4) Disminución en la frecuencia respiratoria,
- 5) Aumento en la concentración de energía muscular,
- 6) Modulación del sistema inmune
- 7) Inhibición de la conducta sexual

(Tomado de Habib y cols 2001; Sapolsky, 2000, Saposky y cols 2000).

La respuesta neuroendocrina está considerada como un muy importante mecanismo de supervivencia durante la exposición al estímulo estresante. Por ello la importancia de la activación del eje HPA y la intervención de las catecolaminas adrenales para mantener el balance de la energía, así como el rol del sistema renina angiotensina para mantener la distribución de los fluidos sanguíneos hacia el cerebro y otros órganos vitales (Van de Kar y Blair, 1999).

Los componentes centrales del sistema de estrés se localizan en el hipotálamo y el tallo cerebral. Estos incluyen a las neuronas parvocelulares de los núcleos paraventriculares (PVN) del hipotálamo, productoras de la Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH) y de Arginina Vasopresina (Chrousos 1998; Aguilera 1998; Koob 1999). Los brazos periféricos del sistema de estrés están constituidos por el eje HPA, el sistema simpático/adrenomedular eferente y el sistema parasimpático (Chrousos 1998; Koob 1999). Diversas estructuras cerebrales intervienen en la regulación del eje HPA. Estas incluyen la amígdala, el hipocampo, el septum, el cíngulo, y la región del tallo cerebral. También incluye a las neuronas productoras de CRH de los núcleos paragigantocelular y parabranchial de la médula, así como el locus ceruleus (LC) y otros grupos neuronales de la médula y puente, los cuales son en su mayor parte noradrenérgicos.

El sistema nervioso central y en particular el eje HPA son críticos en la mediación de la reactividad al estrés, ya que se activan en respuesta a cualquier estímulo estresante (Sapolsky RM. 1986). Esta resulta en la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) por la pituitaria la cual es liberada al torrente sanguíneo llegando a las glándulas suprarrenales donde se estimula la secreción de glucocorticoides. (Sapolsky RM 1986, Shilenssinge AR 1975).

Activación del eje hipotálamo-pituitaria-suprarrenales (HPA)

La exposición a eventos estresantes de forma crónica se ha relacionado con el inicio de enfermedades de tipo afectivo, como depresión mayor. El sistema nervioso central y en particular el eje HPA son críticos en la mediación de la reactividad al estrés, ya que se activan en respuesta a cualquier estímulo estresante (Sanchez 2001 MM. Newport.DJ. 2002, Levine S.2000). Esta activación resulta en un aumento marcado en la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) por la pituitaria (adenohipófisis), la cual después de viajar por el torrente sanguíneo llega a las glándulas suprarrenales, donde estimula la secreción de glucocorticoides; estos últimos preparan al sistema para una respuesta inmediata así como también tienen un efecto autorregulador del sistema ya que regresan al hipotálamo dando una señal negativa para así regular la respuesta al estrés (Yi SJ. 1994).

El eje HPA es fuertemente regulado por la inhibición con los glucocorticoides por la vía de dos receptores corticosteroideos, los receptores mineralocorticoides (MR) y los receptores a Glucocorticoides (GR). Los receptores MR presentan una gran afinidad por los glucocorticoides y se saturan con las concentraciones habituales de corticosterona en el plasma. Los MR se expresan abundantemente

en el hipocampo y el Septum del cerebro de la rata (de Kloet y cols 1994, 2000; Reul y cols 2000). Se cree que los MR hipocampales son proactivadores del sistema de retroalimentación dentro del eje HPA activados durante el día con las concentraciones normales de glucocorticoides circulantes (Van Haarst y cols 1997). En contraste, los receptores GR tienen poca afinidad por los glucocorticoides y son ocupados primariamente por el aumento marcado en su concentración seguido de un estrés agudo (de Kloet y cols 1998). Los receptores GR están ampliamente distribuidos en la corteza de la rata, en el sistema límbico, y en el cerebelo (McEwen y cols 1968, 1969; Sapolsky y cols 1983). Se piensa que los receptores GR presentes en regiones hipocampales, corteza prefrontal, en la pituitaria y en núcleos paraventriculares del hipotálamo regulan la actividad del eje HPA (Dallman y cols 1994; Diorio y cols 1993; Meaney y Aitken 1985; Meaney y cols 1996).

Tanto los MR como los GR se requieren para mantener las concentraciones adecuadas de ACTH y de corticosteroides en el plasma, así como para propiciar la recuperación del sistema después de la exposición a un estresor (Bradbury y cols 1994; Spencer y cols 1998).

Consecuencias en el cerebro del aumento de GC.

Se ha postulado que la predisposición genética aunada a la exposición a experiencias adversas constantes confiere cierta vulnerabilidad al individuo aumentando así el riesgo de desarrollar desórdenes afectivos. Esta vulnerabilidad al estrés estaría mediada por cambios en los sistemas neurobiológicos que son responsivos al estrés y que regulan el comportamiento afectivo. De este modo, se han descrito alteraciones en los sistemas glutamatérgico (Ladd Ch 2004) y en el

sistema serotoninérgico (Hayashi y cols 1998), a consecuencia de la exposición crónica al estrés. Asimismo, la exposición al estrés o a concentraciones altas de glucocorticoides en forma repetida provoca diversas alteraciones en el hipocampo debido en parte a la interacción de altas concentraciones de glucocorticoides con sus receptores hipocampales (Ladd Ch 2004). Esto afecta a la arborización dendrítica (Arias Carrion 2004), por lo que se ha hipotetizado que la menor densidad hipocampal observada en pacientes con depresión pudiera ser parcialmente debida a la acción de los glucocorticoides sobre esta estructura cerebral (Laad Ch.O. 2004).

Estrés postnatal : importancia y consecuencias.

En las especies de mamíferos, el recién nacido requiere del cuidado materno para su supervivencia. En la mayoría de los casos, la madre representa la fuente principal de alimento, calor, protección y educación esenciales para el desarrollo de habilidades sociales. De hecho, se ha comprobado la asociación entre las variaciones en el cuidado materno durante la etapa postnatal temprana y el desarrollo de diferencias individuales en las respuestas neuroendocrinas y de comportamiento al estrés (Carrasco 2003). Por ejemplo, se ha observado que los animales separados de la madre durante el periodo neonatal exhiben profundas alteraciones en las respuestas neuroendocrinas y de comportamiento al estrés (Mirescu 2004), debido a la alteración que sufren tanto los sistemas de neurotransmisores así como las estructuras cerebrales que controlan el modo afectivo (Arborelius, 1999). Así, se ha propuesto que dichos cambios neurobiológicos confieren una mayor vulnerabilidad para el desarrollo de la depresión mayor y de otros desórdenes psiquiátricos.

CONSECUENCIAS DE LA EXPOSICIÓN AL ESTRÉS:

Alteraciones del eje HPA y el hipocampo.

Las primeras dos semanas de vida postnatal de la rata se caracterizan por tener concentraciones basales bajas de glucocorticoides y una respuesta disminuida de la glándula suprarrenal al estrés, lo que se ha denominado como “periodo hiporesponsivo” (Schapiro y cols., 1962; Sapolsky, 1986). Sin embargo, es conocido que ciertos estresores tales como la separación maternal prolongada pueden elevar las concentraciones de glucocorticoides aun durante el periodo hiporesponsivo (Levine, 1994). Una de las áreas cerebrales que es afectada por la exposición en periodos tempranos al estrés es el hipocampo, debido en gran medida a la interacción de altas concentraciones de glucocorticoides con sus receptores hipocampales (Ladd Ch O., 2004).

El hipocampo es una estructura que se ha relacionado con muchas de las funciones que se ven alteradas a causa de la Separación Maternal. Primeramente, el hipocampo es un modulador negativo de la actividad del eje HPA. Lesionar tanto el hipocampo como el Fórnix, que es su vía aferente al hipotálamo, da como resultado una recuperación mas lenta de los niveles de actividad del eje HPA después de un estímulo estresor (Magarinos y cols., 1987, Sapolsky y cols., 1989, Herman y cols., 1995). Por otro lado se ha visto que el hipocampo es una estructura implicada en la regulación del comportamiento de ansiedad, ya que las ratas con lesiones en esta estructura parecen ser menos ansiosas en pruebas como la exploración de un ambiente nuevo (Deacon y cols., 2002). Otro hecho importante es que el hipocampo tiene un rol muy bien descrito en el aprendizaje de navegación espacial (Riedel y cols., 1999) que también se ve

afectado por la SM. Por otra parte, en el hipocampo tienen lugar varios fenómenos plásticos tales como la generación de neuronas a partir de células neurales o neurogénesis (Schlessing. A.R. y cols 1986). Dichas células continúan produciéndose en el giro dentado (GD) del hipocampo en la capa granular durante la etapa adulta, siendo producidas varias miles de células por día (Jacobs 2001).

Neurogénesis

La neurogénesis, proceso que involucra la generación de nuevas neuronas, se ha demostrado en zonas específicas del cerebro de mamíferos adultos (Arias-Carrión 2007). Hasta hace algunos años el dogma enunciado por Ramón y Cajal en 1928 prevalecía, el cual indicaba que en el cerebro las neuronas no se reproducían, solo se morían. Desde los años 60's se comenzó a observar que algunas células del cerebro adulto son capaces de entrar en mitosis y que las células generadas se diferencian en neuronas las cuales migran para integrar circuitos nerviosos. En la última década se ha demostrado repetidamente la presencia de neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos, incluido el humano (Arias Carrión 2007, Ramón y Cajal 1928, Abrous D.N., 2005).

Zonas de neurogenesis

La neurogenesis parece ser particular de ciertas regiones cerebrales discretas, las cuales comprenden en el adulto a la zona subventricular (SVZ), giro dentado (GD) del hipocampo y bulbo olfatorio (Arias Carrión, 2007). Los acúmulos de células en división incluyen varios tipos celulares: precursores

neurales, neuroblastos, precursores gliales y precursores endoteliales. (Abrous y cols., 2005).

La población de células granulares del giro dentado se produce durante un periodo de tiempo muy extenso que comienza con la gestación y continúa hasta la etapa adulta, en varias especies de mamíferos, incluyendo primates (Schlesinger, 1975). En la rata, la mayoría de las neuronas granulares se producen durante las dos primeras semanas de vida postnatal, coincidiendo con el periodo hiporresponsivo al estrés (Schlessinger y cols.,1975). Durante este periodo un aumento marcado en la concentración de glucocorticoides, como ocurre por ejemplo mediante una inyección de esteroides adrenales, es capaz de suprimir la proliferación de los precursores de las células granulares (Gould y Woolley, 1991). La elevación de los esteroides adrenales durante este periodo hiporresponsivo puede sin embargo ocurrir a causa de la exposición del individuo a un estresor de gran intensidad (Sapolsky 1986), y se ha observado que dicha experiencia parece disminuir la producción de neuronas granulares del hipocampo durante el desarrollo (Tanapat, Gould, 1998) y persiste hasta la etapa adulta (Mirescu y cols., 2004).

Las células granulares se originan a partir de células precursoras que existen en el giro dentado. Estas células precursoras se dividen y producen células hijas las cuales migran a la capa de células granulares y se diferencian en neuronas granulares (Abrus DN, 2005, Arias Carrión 2007) Así, el periodo postnatal de neurogénesis en este sistema representa una ventana de tiempo durante la cual existe la posibilidad de sufrir alteraciones mayores en la tasa de producción de células granulares dependiendo de la experiencia y el medio ambiente.

Factores que aumentan o disminuyen la neurogénesis

Existen muchos estudios que demuestran la influencia de diversos factores sobre la neurogénesis del giro dentado, ya sea estimulándola o disminuyéndola, tales como la experiencia de la exposición a un ambiente enriquecido o de la exposición al estrés en forma crónica, y la presencia de concentraciones importantes de algunas hormonas, tales como glucocorticoides, (neurotóxicos), estrógenos o prolactina (neuroprotectores) (Gould y cols., 2000).

Un mecanismo que se ha propuesto como parcialmente responsable de la disminución de la neurogénesis hipocampal es la exposición perinatal al estrés. En 2004, Mirescu y colaboradores demostraron que la SM causa una disminución en la proliferación de neuronas inmaduras del giro dentado de ratas adultas y que este efecto se puede revertir disminuyendo los niveles de glucocorticoides por debajo del control. Sin embargo poco se ha descrito sobre los efectos de la SM durante el desarrollo y los posibles mecanismos protectores que podrían funcionar durante esta etapa. Además existe un número creciente de observaciones que correlacionan la inhibición en la neurogénesis en el giro dentado con la aparición de enfermedades afectivas en el adulto (Newport D.J. 2002). En apoyo a esta hipótesis, se ha demostrado que los tratamientos con antidepresivos incrementan la proliferación de los precursores de las células granulares con un retraso en tiempo paralelo al mejoramiento de los síntomas clínicos en individuos adultos con depresión (Santareli L. 2003.).

Justificación.

La proliferación, diferenciación y supervivencia de los precursores neurales que ocurre dentro de los primeros días de vida de la rata tiene una trascendencia de suma importancia dentro del desarrollo y el desempeño del individuo en la vida adulta (Gould, 2004). La exposición crónica al estrés postnatal se ha asociado a alteraciones en la ansiedad y a una disminución de la neurogénesis hipocampal en la etapa adulta. Esto se correlaciona con la disminución de la tasa de proliferación y supervivencia celular en el giro dentado del hipocampo del adulto (Mirescu y cols., 2004). Por ello es importante evaluar su efecto inmediato sobre la supervivencia de los precursores neurales del hipocampo en la etapa en que esto ocurre. Así, es relevante la pregunta: ¿la disminución del número de precursores neurales en el GD que se observa en el adulto a consecuencia de la separación maternal, tiene lugar desde etapas tempranas u ocurren en el adulto a consecuencia de la suma de alteraciones en la maduración del sistema neuroendocrino?

HIPOTESIS:

La separación maternal afectará el número de precursores neurales del hipocampo desde etapas tempranas postnatales.

Objetivo general.

Establecer un modelo de estrés postnatal en roedores en nuestro laboratorio, con el objeto de analizar su efecto sobre el número de precursores neurales en el giro dentado (GD) del hipocampo durante etapas tempranas postnatales.

Objetivos particulares.

- 1) Establecer y validar en nuestro laboratorio el modelo de separación maternal, como ejemplo de estrés postnatal.
- 2) Analizar si la exposición a la separación maternal provoca la disminución de los precursores neurales y/o la densidad celular en el GD del hipocampo, en forma inmediatamente posterior al periodo estresante.

MATERIAL Y METODOS:

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI) del Instituto Mexicano del Seguro Social, el cual está ubicado dentro de las instalaciones de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia, Michoacán.

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la guía de los Institutos de Salud de Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el cuidado y usos de animales de laboratorio (publicación NIH No 80-23), revisado en 1996. El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de Ética e Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, México. Durante la realización del protocolo, se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

Animales:

Se utilizaron camadas de ratas de la cepa Sprague- Dawley. A partir el día 1 postnatal se ajustó la camada a 8 crías, consistiendo de 4 hembras y 4 machos por camada. Se consideró el día de nacimiento como día 0. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones ambientales controladas de luz

- obscuridad (12h/12h) y temperatura (22 ± 2 °C), con suministro de alimento y agua *ad libitum*. Se utilizaron animales provenientes de diferentes camadas en el estudio. La n final utilizada se muestra en la tabla 1.

GRUPOS	PESO	TALLA	No. CELULAS	DENSIDAD CELULAR	CONDUCTA
Machos Control	22	22	5	5	7
Machos Sep Maternal	12	12	7	7	7
Hembras Control	11	11	7	7	7
Hembras Sep Maternal	8	8	5	5	6

Tabla 1. Se muestra el número de individuos machos y hembras que se incluyeron en el estudio. Estos corresponden a diferentes camadas de animales.

Protocolo experimental:

Se separaron las crías de rata de su madre a partir del día 1 de nacimiento (PN1) durante 3 horas diarias, y otras camadas permanecieron intactas en el nido con su madre. Se ajustaron las camadas a 8 crías/nido a partir del PN1. Las camadas fueron sometidas a la SM del PN1 al PN14, y se mantuvieron a temperatura controlada ($30-35^{\circ}$) en un cuarto adyacente a la colonia. Al término del periodo de separación se retornaron al nido materno. Los grupos de animales fueron sacrificados al PN15.

Paralelamente a otros grupos de animales se les hizo el mismo tratamiento arriba descrito pero se dejaron con vida, destetándose al día 21, y se dejaron crecer hasta los 60 - 90 días de edad para la evaluación conductual (pruebas de ansiedad), como se describe más abajo.

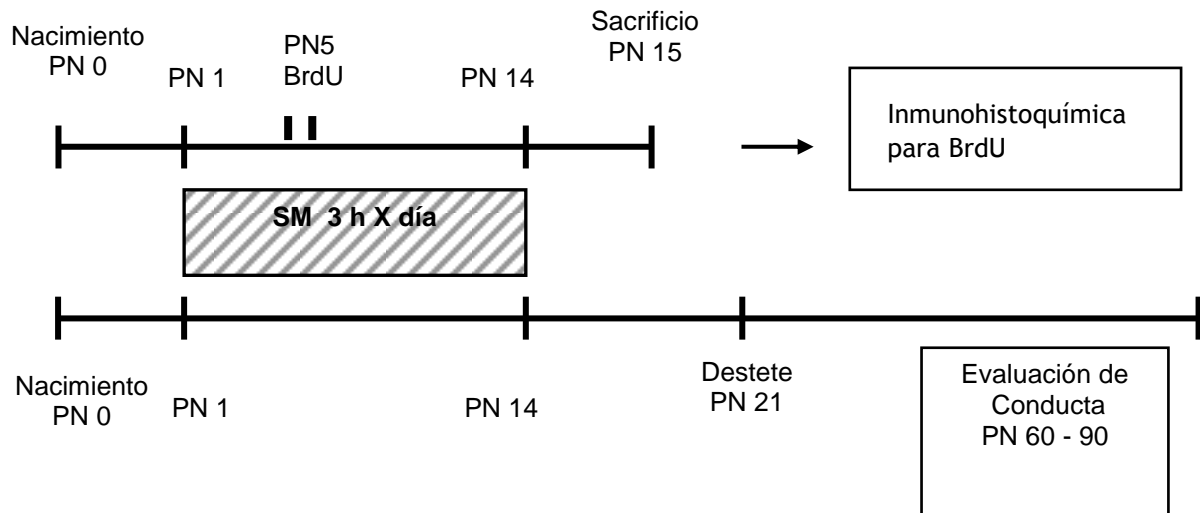


Fig. 1.- Esquema donde se muestra el diseño experimental llevado a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en el texto. Se seleccionaron camadas de ratas control y sometidas a separación maternal (SM) durante 14 días. En el día PN5 se hizo una doble inyección de BrdU. La mitad de las camadas se sacrificaron al PN15 y sus cerebros fueron posteriormente cortados e inmunoteñidos. Otros grupos de animales fueron dejados sin perturbar hasta la etapa adulta, para evaluar su conducta. PN = día postnatal, SM = separación maternal. BrdU=Bromodeoxiuridina.

Marcaje celular:

Se utilizó bromodeoxiuridina (BrdU) como marcador celular, ya que es un análogo de la timina, y se incorpora al ADN durante la división celular, por lo que se le considera un marcador de células nuevas. El PN5 (día de más intensa neurogénesis) los grupos de crías control y sometidas a SM fueron inoculadas (9:00 y 18:00 h) con BrdU (50 mg/Kg peso corporal), para marcar las células nuevas, lo que nos permitió posteriormente evaluar la supervivencia celular en el giro dentado de los animales al PN15 por medio de una inmunotinción.

Las crías fueron sacrificadas y perfundidas transcárdialmente con paraformaldehído (PFD) al 4% al PN 15, y se les extrajeron los cerebros, se postfijaron con PFD al 4%, y fueron colocados en una solución de sacarosa al 30% hasta su procesamiento posterior.

Inmunocitoquímica:

Los cerebros fueron procesados en un criostato para obtener cortes seriados de 40 micras de orientación sagital, los cuales se almacenaron a 4°C en solución crioprotectora (glicerol, etilenglicol y buffer de fosfatos 0.1M, en proporción 1:1:2 por volumen). Se utilizó un anticuerpo específico contra BrdU para teñir las células que lo incorporaron empleando un estuche ABC para inmunocitoquímica. Brevemente, los cortes se incubaron por flotación en buffer de fosfatos 0.1M conteniendo 0.3% de Tritón X-100 (PB-T) y H₂O₂ al 3%, durante 10 minutos, y después se les hicieron 3 lavados (10 min c/u) con PB-T. Más adelante los cortes se incubaron durante 2h en Formamida al 50% en buffer de citratos 2X (SSC: 0.3M NaCl, 0.03M citrato de sodio a pH 7.0) a 65°C. Después se lavaron los cortes en SSC 2X, y se incubaron durante 30 min con HCl 1N a 37°C. Los cortes se incubaron en buffer de Borato de sodio 0.1M (pH 8.5) durante 10 min, se lavaron 3X en PB-T, y se incubaron con solución de bloqueo (PB-T mas Suero de Caballo 5%) durante 30 min. Posteriormente las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en anticuerpo primario anti BrdU (dil. 1:1000, Roche Diagnostics) en solución de bloqueo. Al día siguiente se lavaron 3X en PB-T y se incubaron durante 2h en anticuerpo secundario contra IgG de ratón (estuche ABC, Vector) en suero de bloqueo. Al término de la incubación, las secciones se lavaron 3X en PB-T y se incubaron durante 90 min en una solución de conjugado Avidina – Biotina para amplificar la señal del anticuerpo secundario y más adelante se lavaron 3X en PB-T. A las secciones se les agregó la solución de revelado consistente en el cromógeno 3,3-diamino bencidina, H₂O₂, y NiCl₂ al 8% en buffer Tris, y se dejó desarrollar el color durante 3 minutos

aproximadamente. Tras lo cual se lavaron las secciones con buffer de fosfatos y se montaron en portaobjetos.

Tinción vs. BrdU

Se estableció la inmunotinción para BrdU en rebanadas flotantes, y se utilizó en los cortes sagitales de cerebro de los animales al PN15. En la Fig. 2 (panel superior) se ejemplifica un corte sagital donde se observan las diferentes estructuras cerebrales, siendo evidentes algunas de las zonas de neurogenesis en esa etapa postnatal, tales como bulbo olfatorio, hipocampo y cerebelo, las cuales resultaron intensamente teñidas con el anti-BrdU, lo que indica la presencia de precursores neurales. En el panel inferior (Fig. 3) mostramos ejemplos de microfotografías a diferentes magnificaciones (5X y 40X) de las zonas arriba mencionadas, donde se observa con más detalle la presencia de los precursores neurales teñidos con anti-BrdU.

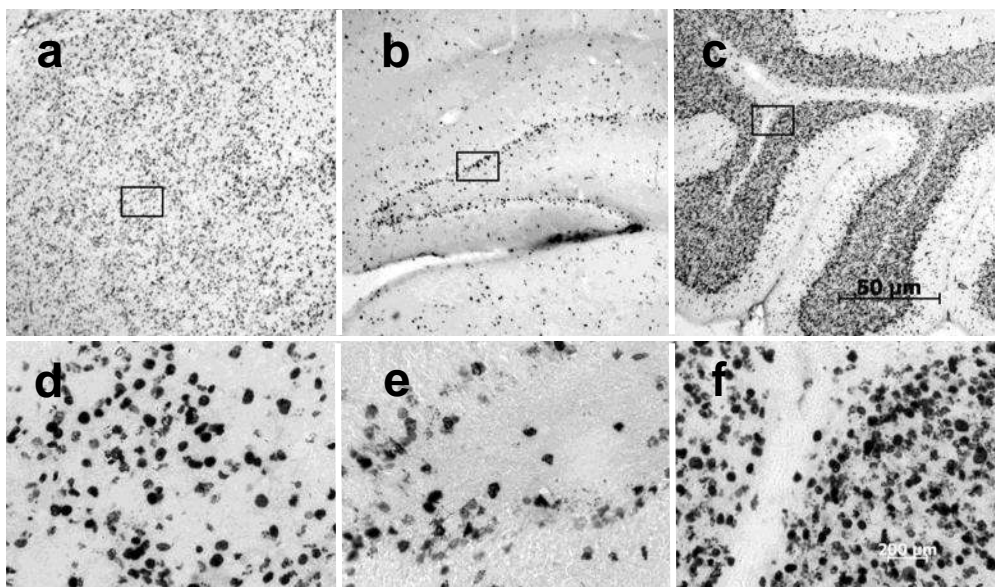
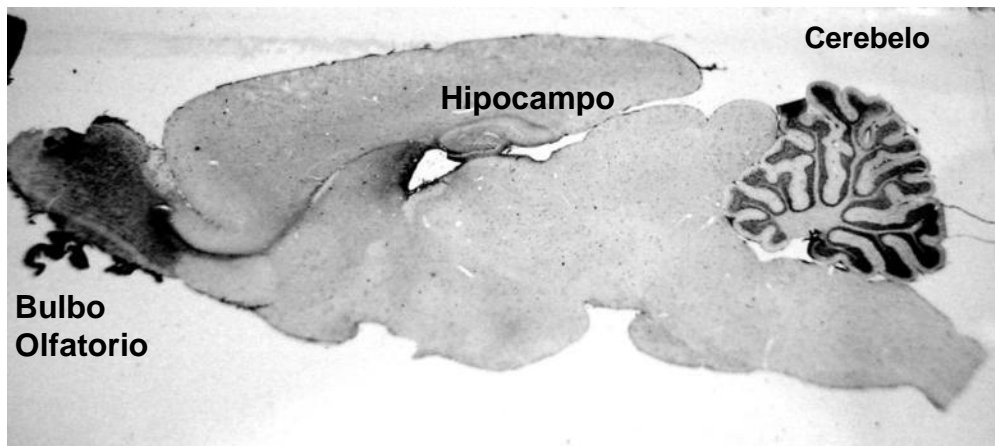


Fig. 2. En el panel superior se muestra una microfotografía representativa de un corte sagital de 40 μm inmunoteñido para BrdU. En el panel inferior se muestran microfotografías representativas del bulbo olfatorio (a, d), giro dentado del hipocampo (b, e) y cerebelo (c, f) con magnificación de 5X (a, b, c) o de 40X (d, e, f).

Evaluación de la producción de células precursoras neurales en el hipocampo:

Para determinar el número de células positivas a BrdU se utilizaron uno de c/6 cortes para la evaluación (240 μm intervalo), de acuerdo a Brown y cols., (2003). Se examinaron las células positivas a BrdU en las zonas granular y subgranular del giro dentado del hipocampo (definidas como un área de dos células de ancho entre el borde del hilus y la zona granular), las cuales fueron contadas bajo magnificación de 20 y 40X. El número total de células positivas a BrdU se multiplicó por un factor de 6. Se utilizó un microscopio axioscop (Zeiss, Alemania) acoplado a un analizador de imágenes para trazar el área de la zona subgranular del giro dentado. Para determinar la densidad de las células positivas a BrdU en el área examinada, se relacionó el número de células positivas a BrdU con el área trazada del GD.

Pruebas de conducta:

El estado de ansiedad de los animales que sufrieron el estrés postnatal así como los animales control, fue evaluado mediante la prueba del laberinto en cruz elevada.

Laberinto elevado en cruz (EPM)

Una de las pruebas más utilizadas para evaluar el efecto de diversos tratamientos sobre las emociones de los animales de experimentación es la prueba del laberinto elevado en forma de cruz (EPM, de las siglas Elevated Plus Maze, en inglés), el cual ha sido validado para la detección de respuestas emocionales a sustancias ansiogénicas y ansiolíticas (Pellow y cols., 1985). Esta prueba se basa en la creación de un conflicto entre la naturaleza exploratoria de

la rata y su miedo innato a las áreas abiertas y expuestas. Se evalúan los siguientes parámetros durante cinco minutos:

- (i) número de entradas a los brazos abiertos y porcentaje respecto al total de entradas a todos los brazos,
- (ii) tiempo en los brazos abiertos y porcentaje respecto al tiempo total,
- (iii) número total de entradas a los brazos cerrados (índice de actividad total).
- (iv) número de entradas completas a los brazos abiertos de la cruz.

Las entradas pueden ser parciales o completas, dependiendo de si el cuerpo del animal se ubica totalmente dentro de un mismo compartimiento o si este solamente explora el área con la cabeza y miembros superiores.

El predominio de la conducta exploratoria de los brazos abiertos de la cruz (alto porcentaje de entradas, tiempo y entradas completas en los brazos abiertos) indica una baja ansiedad en el animal de experimentación, mientras que lo opuesto se interpreta como una mayor ansiedad. El número de entradas a los brazos cerrados de la cruz se toma en cuenta como un índice de la actividad locomotora del animal.

Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron utilizando el programa de estadística GB-Stat 6.0, de Dynamic Microsystems, Silver Springs, MD, USA. Los datos numéricos se expresaron como la media \pm S.E.M. Todos los datos fueron sometidos en forma simultánea al análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, y a la prueba no paramétrica de Mann-Withney U.

RESULTADOS

Peso PN15

Con el objeto de evaluar si se afecta el peso y talla de los neonatos por la separación maternal diaria (SM), comparamos primero los pesos corporales al PN15 de los animales de las diferentes camadas control o sometidas a la SM, a saber: MC (Machos Control), ME (Machos Estrés), HC (Hembras Control), HE (Hembras Estrés). Después de someter los datos obtenidos a un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías), no encontramos diferencias significativas ni debido al sexo (machos y hembras) ni por el tratamiento (estresados y controles), así como tampoco la interacción entre los dos factores resultó significativa. (Figura 3a.)

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras se decidió agrupar los datos y hacer la comparación entre los grupos control y estrés, donde tampoco obtuvimos significancia (Figura 3b).

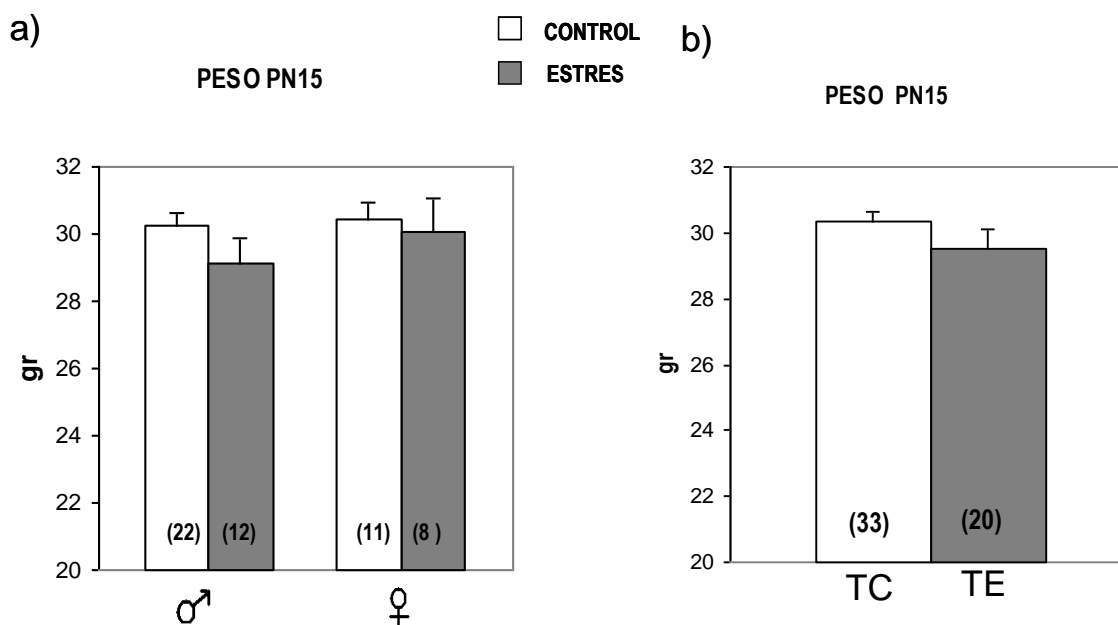


Fig. 3. a) Comparación del peso corporal al PN15 entre los grupos sometidos a la SM y sus respectivos controles agrupados por sexo y tratamiento. b) Comparación de datos reordenados por tratamiento. TC=Todos Control. TE=Todos Estrés. Entre paréntesis se muestra la n de cada grupo. PROM + SEM.

Talla PN15

Asimismo, se evaluó la talla de todos los animales al PN15 antes de realizar la perfusión. Como se observa (Figura 4a) y, al igual que con el peso, el análisis de varianza de los datos obtenidos con respecto a la talla no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos. Así, también se reagruparon los datos solo por tratamiento como control y estrés, (Figura 4b) donde no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos.

Esto corrobora que los animales se mantuvieron en las mismas condiciones nutricionales y de crecimiento pese a la separación maternal diaria (Fig. 4).

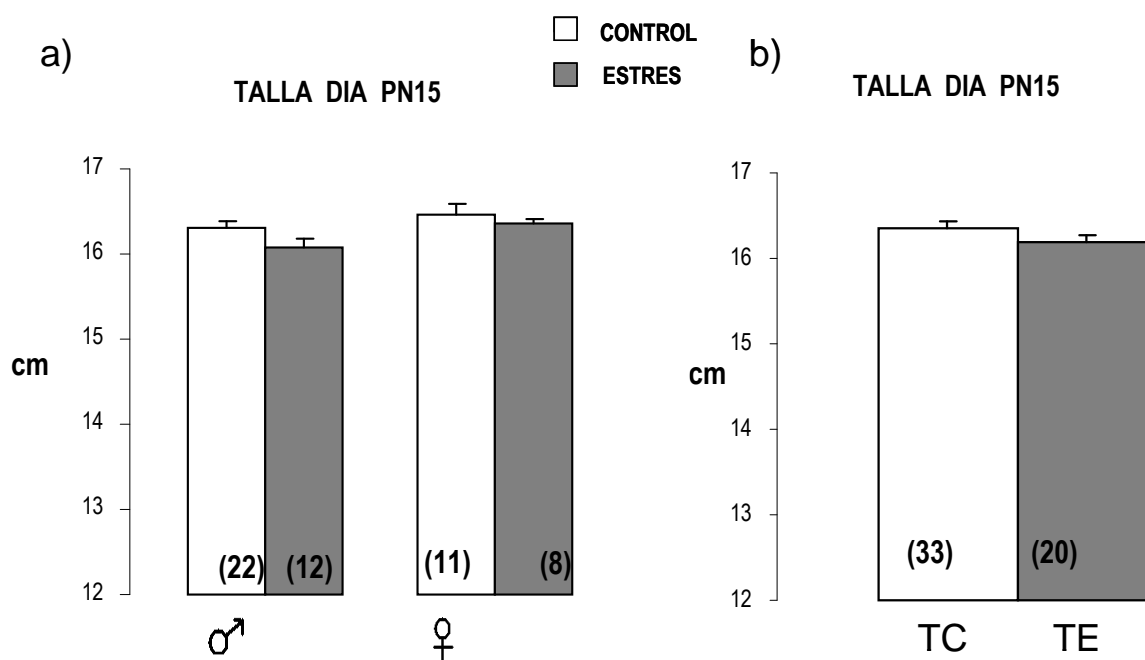


Fig.4 a) Comparación de la talla entre los animales al día PN15 agrupados por sexo y tratamiento. b) Comparación de talla reagrupada solo por tratamiento al día PN15. Entre paréntesis se muestra la n de cada grupo. PROM + SEM.

CONTEO CELULAR PN15

Con el objeto de evaluar el número de células en el giro dentado del hipocampo de los animales control y los sometidos a la SM, se hicieron cortes sagitales seriados como se observa en la Figura 5, de los diferentes grupos: MC, ME, HC, HE. Se analizaron cortes elegidos mediante un muestreo sistemáticamente aleatorio, y se estableció la primera rebanada a contar, a partir de una distancia de 4.2 micras lateral, eligiendo rebanadas con una distancia de 240 micras hasta un total de 10 cortes, a todos los cuales se hizo el conteo celular respectivo, dentro de la zona del giro dentado del hipocampo delimitado por la capa granular y la subgranular (2 células de distancia de la capa granular y el hilus).

Dicha zona se definió en cada corte mediante el programa de análisis Axion Vision, con el cual se delimitó el perímetro a la vez que se calculó el área correspondiente en cada corte. El conteo se realizó en los cerebros que presentaron rebanadas completas en número y forma de los cortes seriados antes mencionados y en los que el cerebelo y la vía rostral migratoria tuvieran una tinción adecuada. (Figura 6)

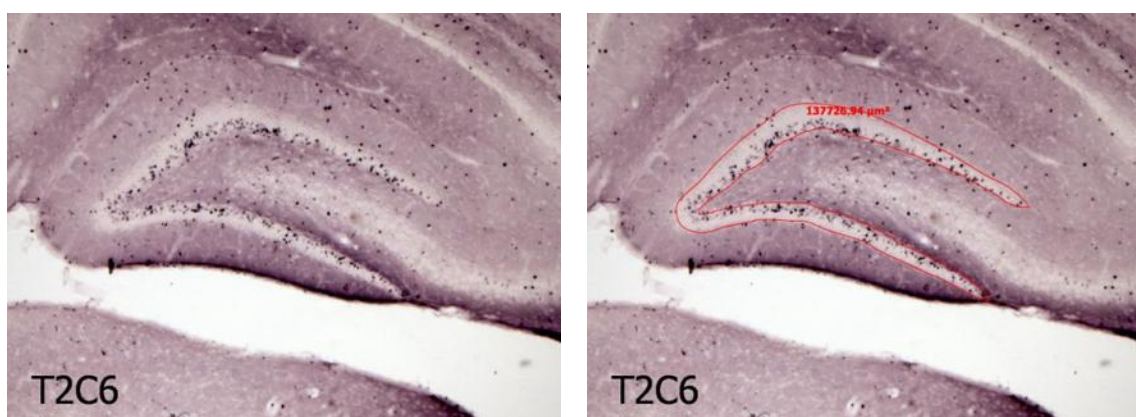


Fig 6. Cortes sagitales del hipocampo al PN15, teñidos con anticuerpos vs BrdU y diaminobencidina. En ellos se muestra el perímetro (marcado en rojo) que limita la zona granular y subgranular del hipocampo que corresponde al área evaluada. Fotografías con magnificación 5X.

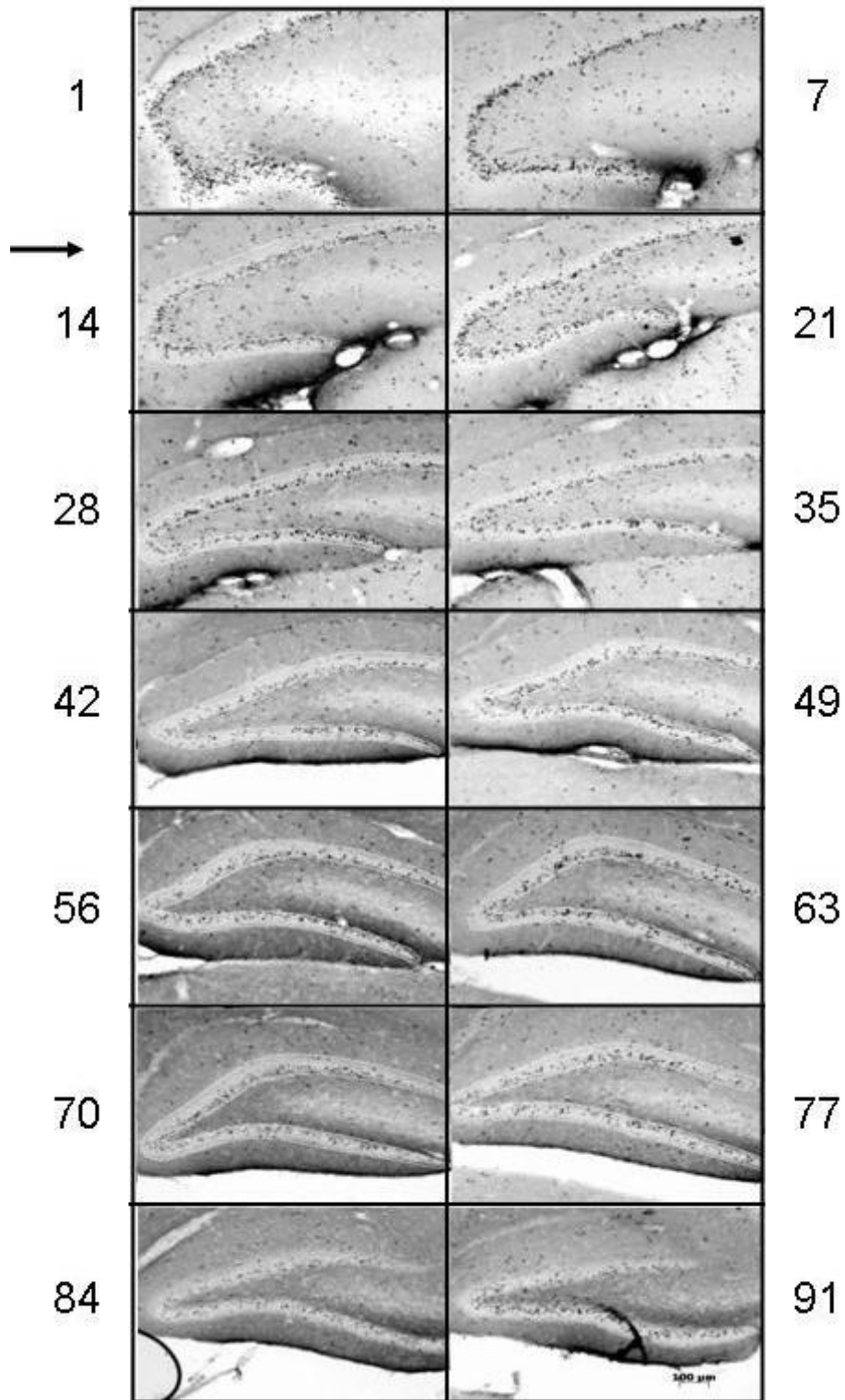


Fig 5: Macrofotografías representativas de cortes sagitales seriados del Giro Dentado del hipocampo de animales neonatos al PN15 inmunoteñidos contra BrdU. La distancia entre los cortes fue de 240 μ . La flecha indica la coordenada lateral a partir de la cual se realizó el análisis del número y densidad de los precursores neurales.

Número total de células.

El análisis cuantitativo del número total de células inmunoteñidas con BrdU en cada rata fue otro parámetro que se analizó, ya que por este medio se trata de hacer un estimado del número total de nuevas células que sobrevivieron al tratamiento al día PN15. Para ello sumamos el número total de células de las 10 rebanadas de cada cerebro multiplicado por un factor de 6, dentro de la zona del giro dentado en cada cerebro.

Los datos obtenidos del número total de células se compararon entre los diferentes grupos experimentales, sometiendo los datos a un análisis estadístico ANOVA de dos vías donde no se encontró una diferencia significativa (Figura 7a). Al no encontrarse diferencias significativas entre los datos de machos y hembras, se reagruparon los datos, formando solo dos grupos por tratamiento y se sometieron los datos nuevamente a un análisis estadístico no paramétrico donde tampoco se encontró una diferencia significativa (Figura 7b).

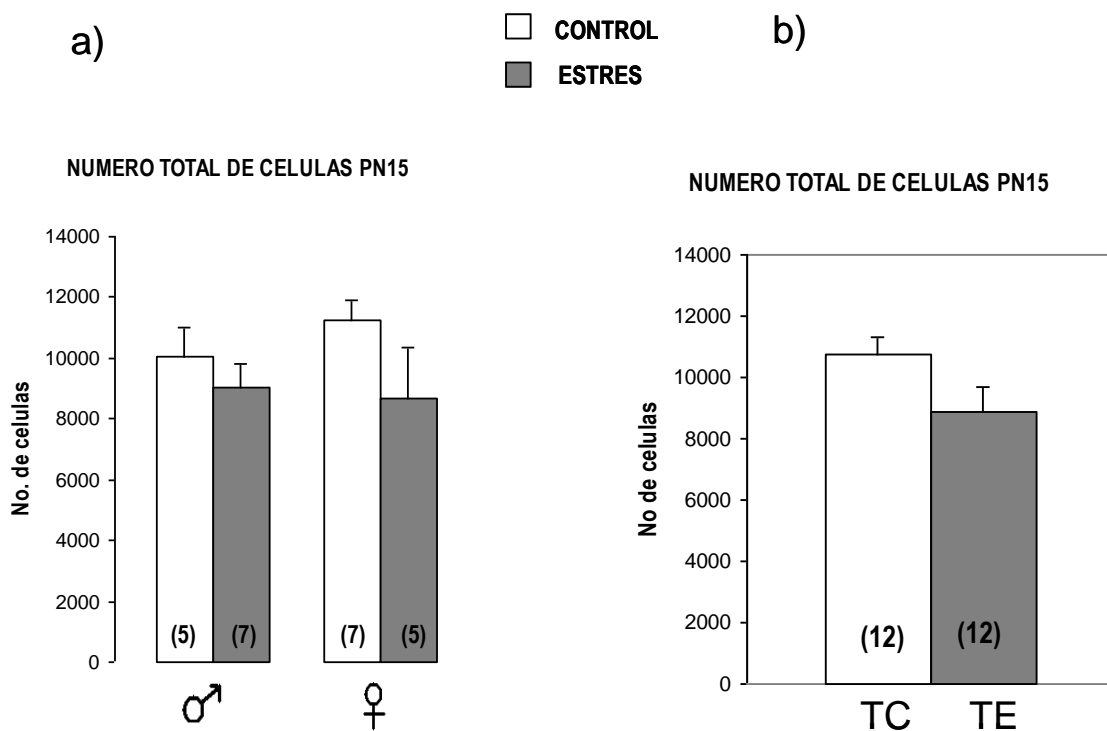


Fig 7. a) Comparación de Número de células totales entre los animales al día PN15 agrupados por sexo y tratamiento. b) Comparación del Número de células totales se reagrupó solo por tratamiento al día PN15. Entre paréntesis se muestra la n de cada grupo. PROM + SEM.

DENSIDAD PN15 (Numero de células/mm²)

La densidad la definimos como: número de células por milímetro cuadrado. Por medio del analizador Axion vision se calculó el área del giro dentado delimitada con anterioridad en milímetros cuadrados y posteriormente se relacionó con el número de células obtenido en cada corte.

El cálculo de las densidades se realizó con todos los grupos MC, ME, HC, HE, y posteriormente se aplicó una prueba estadística paramétrica ANOVA de dos vías en donde no se encontró diferencia significativa entre los diferentes grupos (Figura 8a). Por lo anterior se reagruparon nuevamente los datos para su análisis, como controles vs estrés, y ya que los datos obtenidos tienen una gran dispersión se les aplicó también un análisis estadístico no paramétrico para dos grupos U de Mann Whitney, donde se encontró una diferencia significativa entre los dos grupos antes mencionados, con una $p < 0.05$ (Figura 8b).

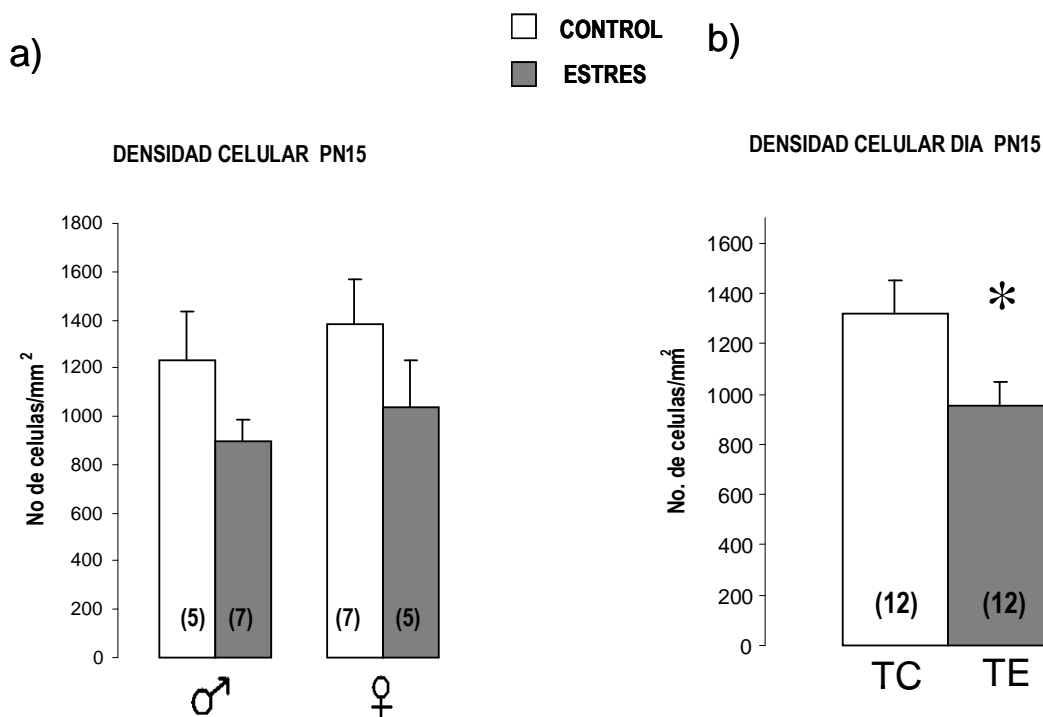


Fig. 8 .a) Comparación Densidad celular de los animales al PN15 agrupados por sexo y por tratamiento. b) Comparación Densidad celular reagrupando solo por tratamiento al día PN15. Entre paréntesis se muestra la n de cada grupo. PROM + SEM. * $p < 0.05$

LABERINTO EN CRUZ ELEVADA.

Con el objeto de validar nuestro modelo de SM, evaluamos la conducta relativa a la ansiedad utilizando el laberinto elevado en forma de cruz, en los animales adultos de los grupos control y sometidos a la SM. Debido a que los parámetros evaluados en este laberinto varían en forma dependiente del sexo, separamos los grupos para su análisis en machos y hembras.

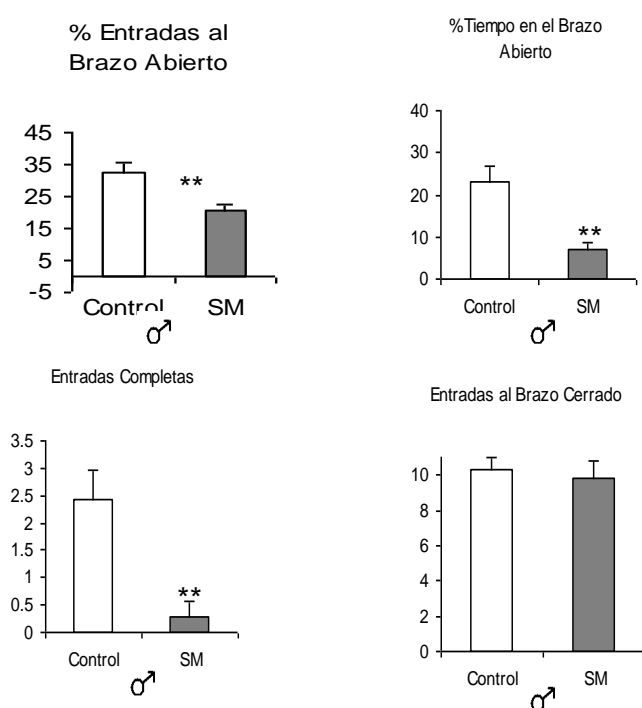


Fig. 9. La SM provoca un aumento en la conducta relativa a la ansiedad en los machos, como se observa por la disminución del porcentaje de entradas y de tiempo que las ratas permanecen en el brazo abierto del laberinto en cruz elevada. La locomoción de los animales sometidos a SM no se encuentra alterada, como se refleja en el número de entradas al brazo cerrado. n=7. PROM + SEM. *p<0.05, **p<0.01

Como se muestra en la Figura 9, las ratas machos sometidas a la SM exploran menos los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz, como se refleja en la disminución del porcentaje de entradas a los brazos abiertos y el menor porcentaje de tiempo en los brazos abiertos y en el número de entradas completas a los mismos (p<0.01 en todos los parámetros). En contraste, el número de entradas a los brazos cerrados fue similar en los grupos control y

estresados, lo que indica que no hubo alteraciones en la locomoción de los animales estresados.

Por otra parte, el análisis de los datos de las ratas hembra control y sometidas a la SM, no mostró diferencias significativas en el porcentaje de entradas y de tiempo en los brazos abiertos ni en el número de entradas completas a los mismos (Figura 10). Esto sugiere que las hembras no presentan alteraciones importantes en la conducta relativa a la ansiedad en la etapa adulta. Dado que el número de entradas a los brazos cerrados del laberinto tampoco mostró diferencias significativas entre las hembras control y las estresadas, concluimos que la locomoción tampoco se afecta en las hembras por la exposición a la SM.

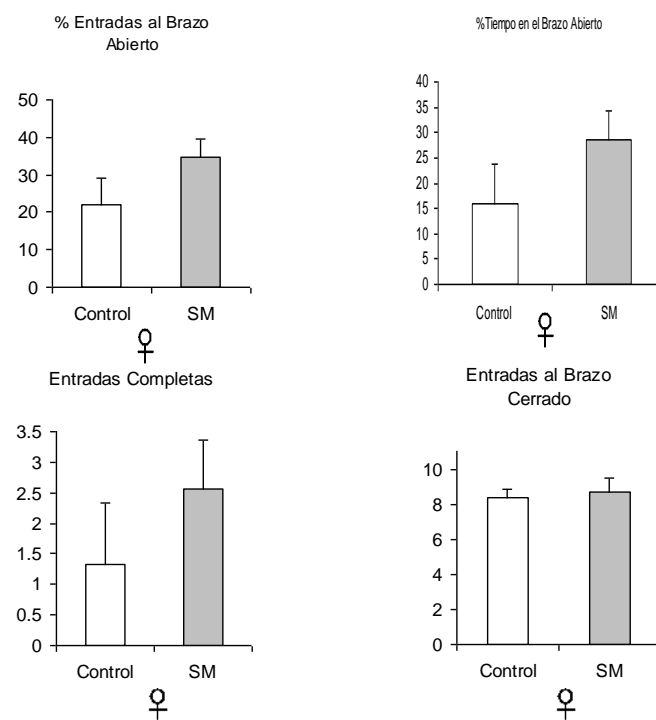


Fig 10. La SM no altera la conducta relativa a la ansiedad en las hembras, ya que no se observan diferencias significativas en el porcentaje de entradas y de tiempo que las ratas permanecen en el brazo abierto del laberinto en cruz elevada. La locomoción de los animales sometidos a SM no se encuentra alterada, como se refleja en el número de entradas al brazo cerrado. Controles n=7, SM n=6. PROM + SEM.

DISCUSION:

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por el tema de la influencia del medio ambiente que rodea al individuo durante las etapas tempranas de la vida y los cambios fisiológicos y conductuales de los organismos que la experimentan. Una gran cantidad de evidencia indica que la exposición a eventos adversos en los primeros días de vida es trascendente en la vida adulta (Heim y cols, 1997, 2000). Periodos diarios de separación materna neonatal en la rata han sido usados por varios investigadores como modelo para poder analizar los efectos de la exposición a un evento adverso en los primeros días de vida y evaluar sus consecuencias fisiológicas y de conducta en el adulto. (Plotsky y Meaney 1993). Así, en este trabajo se demostró el establecimiento del modelo de separación maternal como modelo de estrés postnatal crónico en el laboratorio de neuroendocrinología del CIBIMI, comparándolo con diversos reportes de la literatura. Dicho modelo nos permitirá posteriormente analizar el papel de hormonas y neuropéptidos durante la exposición al estrés postnatal.

Nosotros evaluamos inicialmente el peso y la talla de los animales en el día PN15, y no observamos diferencias significativas en el peso entre machos y hembras así como tampoco entre los grupos estrés y control, lo que nos indica que la separación maternal diaria por 14 días aparentemente no fue suficiente para producir un efecto de desnutrición severo que se reflejara en el peso de los diferentes grupos tratados. En concordancia con nuestros resultados, Slotten y cols. (2006) tampoco encontraron diferencias significativas al día PN15 ni al PN22 en el peso corporal de ratas Long Evans machos y hembras sometidas a separación maternal (PN3 a PN15), comparadas con sus controles respectivos.

En contraste, McIntosh y cols (1999) sí muestran una disminución significativa del peso corporal de grupos de ratas machos y hembras Sprague Dawley sometidos a la separación materna del día PN2 al PN21. Ellos muestran que en el día PN22 hay una disminución significativa del peso corporal en los grupos estresados tanto machos como hembras comparados con sus controles respectivos, sin embargo dichas diferencias desaparecen hacia el día PN50.

Asimismo Kalinichev y Plotsky en el 2002, utilizando ratas machos y hembras de la cepa Long Evans sometidas a separación materna del día PN2 al PN14, evaluaron el peso corporal a los días: PN14, 30, 60 y 90. Ellos encontraron una disminución significativa de 10% del peso corporal de los machos con separación materna comparados con sus controles al día PN14 y en contraste, una diferencia significativa de 10% del peso de las hembras sometidas a separación materna por arriba con sus controles; sin embargo dichas diferencias desaparecieron para los dos grupos a partir del día PN30.

En cuanto a la evaluación de la talla tomada en el día PN15, no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos, lo que confirma nuestro análisis sobre el peso. De manera curiosa, el dato de talla no es tomado en cuenta en muchos estudios, de acuerdo a la bibliografía encontrada, pero para nosotros represento otro parámetro indicativo de un buen desarrollo y crecimiento de los animales sometidos al tratamiento de la separación materna. Así, el parámetro de la talla tomado en conjunto con los datos obtenidos de peso corporal indica que la separación no induce una probable desnutrición en las crías.

En cuanto al número de precursores neurales evaluados no encontramos diferencias significativas en el número total de células marcadas con BrdU en el giro dentado que sobreviven al día PN15 en los animales estresados al compararlos con sus controles, así como tampoco se observaron diferencias significativas dividiendo en subgrupos de machos y hembras. Sin embargo, al efectuar el análisis del número de células marcadas con BrdU por unidad de área (mm^2), sí observamos una disminución significativa de la densidad celular ($p \leq 0.05$) dentro del giro dentado del hipocampo de los animales estresados con respecto a sus controles al día PN15, después de agrupar los datos de los animales machos y hembras. Estos resultados sugieren que sí existe un impacto de la exposición al estrés evaluable desde la etapa inmediatamente posterior al periodo de estrés, que afecta a la supervivencia celular, el cual se puede evaluar desde etapas tempranas cuando el evento acaba de ocurrir.

A la fecha prácticamente no se ha evaluado la alteración en la neurogénesis del hipocampo en etapas tempranas inmediatamente posteriores a la ocurrencia del evento adverso, y de hecho, no hay reportes de daño hipocampal en etapas tempranas utilizando el modelo de separación maternal diaria motivo de este estudio. En cambio, ha sido bien estudiado el efecto de la exposición crónica al estrés en el animal adulto, la cual provoca la disminución de la neurogénesis hipocampal (Gould y cols., 1997; Sapolsky y cols., 2000; Tanapat y cols., 2001; Malberg y cols., 2003). Se han mostrado muy pocas evidencias de que la exposición temprana a un evento estresante resulta en una neurogénesis hipocampal disminuida en animales adultos comparados con animales control (Tanapat y cols 2001, Gould E, 1998, Malberg J.E. 2003). Por otra parte, existe un reporte descrito por Tanapat y cols., en 1998, en el que muestran las primeras

evidencias sobre la neurogénesis al reportar la disminución significativa en la densidad celular del giro dentado del hipocampo evaluada el día PN6, al exponer el día previo a ratas neonatas (Spregue-Dawley) al olor de un depredador por 30 min.

En nuestro caso utilizando el modelo de separación maternal crónica (PN1 al PN14) encontramos que la densidad celular (No de células/mm²) dentro del giro dentado del hipocampo de los animales estresados disminuye en forma significativa con respecto a sus controles ($P \leq 0.05$) evaluados al día PN15. Esto sugiere que existe un impacto el cual afecta no solo a la proliferación sino también a la supervivencia celular, el cual se puede evaluar desde etapas tempranas cuando el evento acaba de ocurrir, y que persiste en la etapa adulta (Mirescu y cols., 2004). Estos últimos reportes (Mirescu Ch, Gould Elizabeth 2004) mostraban la disminución de los precursores neurales y de la densidad celular del giro dentado en el animal adulto previamente expuesto en su etapa neonatal al olor de un depredador (zorro) por 180 min desde el día PN1- PN14.

El hipocampo es una estructura particularmente vulnerable a los efectos del estrés. Esta estructura presenta un desarrollo prolongado (Benes y cols., 1994), y también presenta una gran densidad de receptores a glucocorticoides en las ratas. Así, la exposición temprana al estrés o a altas concentraciones de esteroides se ha asociado con la disminución de la arborización dendrítica, mayor vulnerabilidad a insultos subsecuentes, y una neurogénesis disminuida en el hipocampo durante la etapa adulta (Gould y cols., 2000). Dependiendo de la experiencia de vida, es posible entonces que el daño evocado al hipocampo y otras estructuras debido a la exposición en etapas tempranas a estímulos estresantes tenga consecuencias permanentes, como lo demuestran estos

estudios (Mirescu y cols., 2004). En nuestro caso, el daño provocado por la separación maternal se observó desde una etapa temprana cuando la generación de precursores neurales está en su máxima expresión, y es sugerente de que la disminución de la neurogénesis que ocurre en respuesta al estrés pudiera deberse tanto a la pérdida de neuronas debida a la exposición repetida al evento estresante como tal, así como también que ocurre en respuesta a cambios epigenéticos evocados en respuesta a las altas concentraciones de glucocorticoides (Seckl y cols., 2004). Por otra parte, si se expone al individuo a estímulos positivos, tales como un ambiente enriquecido, es posible que se reviertan los efectos evocados por la separación maternal, tal como lo demuestran los estudios de Francis y cols (2002). Estos datos apuntan a que el proceso de neurogénesis puede modificarse en respuesta a muy diversos estímulos, particularmente en etapas tempranas, dependiendo de la experiencia.

Los cambios en la tasa de precursores neurales en el hipocampo de los animales sometidos en etapas tempranas al estrés se han correlacionado con posibles alteraciones en la conducta relativa a la ansiedad, reportándose este efecto en animales machos. Así, en forma adicional evaluamos la conducta de ansiedad en machos y hembras de los grupos controles y estresados, sometiendo a los animales al laberinto elevado en forma de cruz. Como resultado observamos que los machos adultos expuestos a la separación materna postnatal resultaron más ansiosos que los machos control ya que realizaron menos entradas a los brazos abiertos del laberinto y permanecieron también menos tiempo en ellos que los machos control. Notablemente, este efecto no se observó en las hembras sometidas a los mismos procesos, e incluso observamos una tendencia de las

hembras sometidas a la SM a realizar mas entradas y permanecer mas tiempo en los brazos abiertos que sus respectivas controles. Estos resultados nos confirman los efectos de la separación maternal en la vida adulta, influyendo de manera significativa en la ansiedad, sin embargo, el efecto parece ser dependiente del género.

Comparando nuestros resultados con la literatura encontramos que existe una serie de discrepancias concernientes al comportamiento de ansiedad en los animales sometidos a SM (Lehmann y Cols. 2000). Dichas discrepancias pudieran deberse a la diversidad de los procedimientos de separación utilizados ej. Cepas de animales, duración de los días de separación, separación individual o a toda la camada, edades al realizar la prueba de conducta, etc. (Slotten y cols., 2006;

En varios estudios, la comparación de las conductas incluye un grupo adicional al de los animales sometidos a la SM y los animales control, y que constituye un grupo de animales a los cuales se les hace una manipulación diaria por 15 minutos, lo que constituye un estímulo positivo para las crías. Este grupo adicional es el que se compara con los animales del grupo de la SM observándose claramente una conducta divergente entre los dos grupos experimentales, esto es, los animales sometidos a la SM son significativamente mas ansiosos en los diversos parámetros evaluados que los animales manipulados 15 min. (McIntosh y cols 1999, Wigger y cols. 1999, Huot y cols. 2001). Sin embargo, al comparar los animales sujetos a SM con los grupos control sin disturbar, las diferencias en la conducta no siempre son significativas. Así, existen reportes donde no encuentran diferencias significativas en el estado de ansiedad de los animales

sometidos a SM versus los animales control, no manipulados (Biagini G, Pich EM, y cols 1998).

Aun cuando no se tienen establecidos todos los factores o mecanismos reguladores de la neurogénesis que operan durante la etapa adulta y cómo se relacionan con el estado de ansiedad del individuo, se puede pensar que existe una participación activa hormonal dependiente del sexo dentro de estos mecanismos. Lo que nos inclina a pensar este razonamiento fueron las observaciones sobre la conducta menos ansiosa presentada en las hembras adultas sometidas a la SM la cual contrastó con la conducta más ansiosa de los machos sometidos a SM, comparados con sus controles respectivos. Estos resultados son parecidos a lo reportado por otros investigadores (Wigger y Neumann, 1999; Faraday, 2002, McIntosh y cols., 1999), quienes también encuentran diferencias en los efectos de la SM dependiendo del sexo, aunque difieren de otros reportes que muestran un aumento en la ansiedad en ratas hembra separadas en el periodo neopnatal (Kalinichev y cols., 2002)..

Conclusiones.

La exposición al estrés en etapas tempranas de la vida es capaz de alterar el desarrollo normal del cerebro, y modificar el estado de ansiedad de los individuos volviéndolos vulnerables a una variedad de padecimientos mentales en la etapa adulta. Utilizando el modelo animal de separación materna, es posible evaluar los efectos inmediatos de la exposición temprana al estrés sobre el desarrollo y maduración de diversas estructuras cerebrales, tal como lo pusimos en evidencia mediante la observación de la disminución de la densidad celular en el giro dentado del hipocampo de animales sometidos a la SM en el día PN15 de nacimiento. Estas alteraciones se pueden correlacionar además con diversos paradigmas de conducta para evaluar el resultado de los cambios morfofuncionales debidos a la exposición temprana al estrés.

Finalmente, queda establecido el modelo de separación materna dentro del laboratorio de Neuroendocrinología del Centro de investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social, para estudios posteriores.

REFERENCIAS:

- Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R. (2007) Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol.* 44: 541-50.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. ((2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* 85: 523-69.
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J. Endocrinol.* 160: 1-12.
- Biagini G, Pich EM, Carani C, Marrama P, Agnati LF. (1998) Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int J Dev Neurosci.* Department of Biomedical Sciences, University of Modena, Italy. 16(3-4):187-97.
- Caldji C., Tannenbaum B., Sharma S., Francis D., Plostky P.M., Meaney M. J., (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neuronal systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad SCI USA* 95:5335-5340.
- Carrasco G.A., Louis D. Van de Kar. (2003). Neuroendocrine Pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology* 463 235-272.
- Chrousos G. P. (1998) Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptive response, The 1997 Hans Selye memorial lecture. *Ann NY. Acad SCI* 851:311-335.
- Dallman MF, Akana SF, Levin N, y cols (1994) Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Ann NY Acad Sci* 746:22-31.
- De Kloet ER, Van Acker y cols (2000): Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated function. *Kidney Int* 57: 1329-1336.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ. (1993): The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic- pituitary- adrenal responses to stress. *J Neurosci* 13:3839-3847.
- Faraday M. M. (2002) Rat sex and strain differences in responses to stress. *Physiol. Behav.* 75: 507-522.
- Gage F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*; 287: 1433-8.

- Gould E., Mc Ewen B. S., Tanapat, P., Galea, L. A. Fuchs, E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation *J. Neurosci* 17, 2492-2498.
- Gould E. Tanapat, P., Mc Ewen, B.S. Flugge, G. Fuchs, E. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3168-3171.
- Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N. (2000) Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry* 48(8):715-20.
- Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. (1998). Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring, *Int J Dev Neurosci* 16(3-4):209-216.
- Heim C, Nemeroff CB. (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol. Psychiatr.* 49,1023-1039.
- Huot RL, Smith MA, Plotsky PM. (1997) Alteration of maternal-infant interaction as a result of maternal separation in Long- Evans rats it's behavioral y neuroendocrine consequences. *Psychoneuroendocrinology*; 22:S173
- Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, Macnamara RK (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans Rats. *Brain Res.* 950 52-63.
- Jacobs B. L. (2001). Adult brain neurogenesis and depression, *Brain, behavior & Immunity* 16:602-609.
- Johnston AL, File SE, (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.* 49, 245-250.
- Kalinichev M. Easterling K.W., Plotsky P. Hotzman S. (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 Biochem Behav.* 73(1):131-40.
- Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol. Psychiatry* 55:367-375.

- Levine S. (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann NY Acad Sci.* 746(93)275-293.
- Levine S. (2000). Influence of Psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur. J. Pharmacol.* 405, 149-160.
- Malberg, J. E. y Duman, R.S. (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28: 1562-1571.
- McEwen BS, Wess JM, Shwartz LS (1968): Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220:911-912.
- McEwen BS, Wess JM, Shwartz LS (1969): Uptake of corticosterone by rat brain and its concentration by certain limbic structures. *Brain Res* 16:227-241.
- McIntosh J., Anisman H., Merali Z, (1999) Short and Long Periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res.* 113:97-106.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM. (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: Implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18:49-72.
- Mirescu Ch, Peters J.D., Gould E,(2004). Early life Experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience.* 7:841-846.
- Newport, D.J., Stowe, Z.N., Nemeroff, C.B. (2002). Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am. J. Psychiatry* 159: 1265-1283.
- Ramón y Cajal S. (1928) Degeneration y regeneration of the nervous system. In Ramón y Cajal S, Ed. New York: Haffner Publishing.
- Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec IS, Weber A, Bachmann C, Bilang-Bleuel A, Holsboer F, Linthorst AC. (2000). The brain mineralocorticoid receptor: Greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol* 405:235-249.
- Sanchez, M.M., Ladd, C.O. Plotsky P.M., (2001). Early adverse experience as a developmental risk factor for the later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev. Psychopathol.* 13, 419-449.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C., Surget A, Battaglia F, Dulawa S. Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Rene Hen R. (2003). Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science* 301:805-809.

- Sapolsky R.M. and Meaney, M.J. (1986). Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res. Rev.* 11: 65-76.
- Sapolsky, R.M., (2000). Stress hormones: good and bad. *Neurobiol. Dis.* 7, 540–542.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21: 55–89.
- Sapolsky RM, McEwen B, Rainbow TC (1983). Quantitative autoradiography of (3H) corticosterone receptor in rat. *Brain Res* 271:331-334.
- Schapiro S, Galler, E., Eiduson S., (1962) Neonatal adrenal cortical response to stress and vasopressin. *Proc. Soc. Biol. Med.* 109:937-941.
- Schlessinger. A. R., Cowan, W.M. Gottlieb. D. I. (1975) An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 159:149-175.
- Seckl JR, Meaney MJ. (2004) Glucocorticoid programming. *Ann N Y Acad Sci.* 1032:63-84.
- Tanapat P, Galea L, A.M Gould E. (1998). Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci.* 16(3-4): 235-239.
- Tanapant P, Hasting N.B, Rydel, T. A., Galea, L.A., Gould E. (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone- dependent mechanism. *J. Comp. Neurol* 437, 496- 504.
- Torner L, Toschi N, Nava G, Clapp C., Neumann I. D. (2002). Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neurosci.* 15 :1381-1389.
- Van de Kar, L.D., Blair, M.L., (1999). Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front. Neuroendocrinol.* 20: 1 – 48.
- Van Haarst AD, Oitzl MS, de Kloet ER (1997): Facilitation of feed-back inhibition through blockade of glucocorticoid receptors in the hippocampus. *Neurochem Res* 22: 1323-1328.