

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Fisiología  
(Fisiología Animal II)



## TESIS DOCTORAL

**Efecto del estrés postnatal temprano en los procesos cognitivos en rata:  
estudio morfofuncional**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Natalia Sanz del Rosario**

Directores

María Luisa Leret Verdú  
Carmen Rúa Rodríguez

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTOS DE FISIOLÓGÍA ANIMAL II Y BIOLOGÍA CELULAR



TESIS DOCTORAL

EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL TEMPRANO  
EN LOS PROCESOS COGNITIVOS EN RATA.  
ESTUDIO MORFOFUNCIONAL.

NATALIA SANZ DEL ROSARIO

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTOS DE FISIOLÓGÍA ANIMAL II Y BIOLOGÍA CELULAR



TESIS DOCTORAL

EFFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL TEMPRANO  
EN LOS PROCESOS COGNITIVOS EN RATA.  
ESTUDIO MORFOFUNCIONAL.

Trabajo de investigación codirigido por las doctoras  
D<sup>ª</sup> MARIA LUISA LERET VERDÚ y D<sup>ª</sup> CARMEN RÚA RODRÍGUEZ.

Memoria presentada por NATALIA SANZ DEL ROSARIO  
para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, Mayo 2014

Directoras:

M<sup>ª</sup> Luisa Leret Verdú

Carmen Rúa Rodríguez

La interesada:

Natalia Sanz del Rosario

## **ABSTRACT**

### **INTRODUCTION**

The effects of acute and repeated stress have been studied from different perspectives in view of the importance of the heterogeneous consequences observed in behavioural and neurochemical parameters. It is known that stress activates the HPA axis, increasing the synthesis and release of glucocorticoids (GC) (Selye, 1950) and that the HPA system is also correlated with several neurotransmitters including the glutamatergic system (Riaza Bermudo-Soriano et al., 2012, Reznikov et al., 2007), the dopaminergic system (Jahng et al., 2010, Chocyk et al., 2011), the serotonergic system and the gabaergic system (Walker et al., 2002). Maternal separation (MS) is considered a postnatal stress model (Ruedi-Bettschen et al., 2005, Colorado et al., 2006, Pickering et al., 2006) that induces alterations that are maintained throughout the lifetime (Plotsky and Meaney, 1993, El Khoury et al., 2006).

The perinatal environment in the majority of mammals is mainly determined by maternal care that influences the pups' development (Meaney et al., 1996, Colorado et al., 2006). In rats, corticosterone is maintained at low levels during the stress hyporesponsive period (SHRP) from postnatal day 4 (PN 4) to PN 12 (Catalani et al., 2011). Also, during the first two weeks of life, the functioning of aminoacidergic neurotransmission systems changes and they finish their development (Herlenius and Lagercrantz, 2004, Pickering et al., 2006) and monoaminergic systems complete their maturation (Lidov and Molliver, 1982; Park et al., 2000). It is known that an increase of GC mediates enhanced excitatory aminoacid activity that could lead to excitotoxicity processes if it is maintained over a long period (Lephart and Watson, 1999, Aisa et al., 2007). Early exposure to adverse situations, such as repeated maternal separation, alters the stress response (Kalinichev et al., 2002; Macri and Wurbel, 2006), as well as the development of neurotransmission systems (Kaufman et al., 2000). But there is much controversy about the effects that maternal separation can have on behaviour. Some studies suggest that MS increases general activity, impulsive and exploratory behaviour (Colorado et al., 2006, Slotten et al., 2006), while other studies claim that maternal separation increases anxiety (Huot et al., 2002, Aisa et al., 2007) and decreases exploratory behaviour (Wigger and Neumann, 1999).

The mechanisms underlying glucocorticoid release include the negative feedback of glucocorticoids on the HPA axis itself, and extra-hypothalamic control (Sapolsky, 2003). Several limbic structures containing GC receptors mediate the indirect regulation of the HPA axis, including the hippocampus, the amygdala (Dedovic et al. 2009; Diaz Lujan et al., 2008), the basal ganglia and the prefrontal cortex (Dedovic et al. 2009; Sapolsky, 2003). These cerebral areas show structural and functional alterations as a result of maternal separation (Schwabe et al., 2012, Diaz Lujan et al., 2008, Jacobson and Sapolsky, 1991). Moreover, the hippocampus is connected to the prefrontal cortex and basal ganglia, which have a motor function in the brain but also regulate hippocampal activity (Rossato et al., 2007). The accumbens nucleus of basal ganglia regulates the hippocampal activity through the septum (Beck, 2010) and is implicated too on memory processing (Cammarota et al., 2008; Schwabe et al., 2012; Steckler, 1998). Through prefrontal cortex (Cammarota et al., 2008; Roozendaal et al., 2002; Schwabe L., 2012) and basal ganglia (Cammarota et al., 2008), the amygdala is also connected to the hippocampus. The basal ganglia are also altered as a result of maternal separation (McCormick et al., 2002, Fone and Porkess, 2008).

Sexual steroids exert a powerful influence on the nervous system during critical periods of development, organising neural circuits involved in neuroendocrine and behavioural functions observed in adult life. Sexual differences induced by these hormones are reflected in the anatomical and functional characteristics of many neurotransmitter and neuromodulation systems, such as gabaergic, dopaminergic, and serotonergic (Palanza, 2001). Changes in the perinatal environment thus affect males and females differently.

During SHRP, neurones are sensitive to excessive calcium influx (Herlenius and Lagercrantz, 2004) and there are several mechanisms regulating calcium homeostasis to avoid excitotoxicity processes, such as calcium binding proteins, nitric oxide and taurine. The calcium binding proteins calbindin (CB) and parvalbumin (PV) (Baimbridge et al., 1992) modulate intracellular calcium concentration to ensure neuronal survival (Lephart and Watson, 1999). Nitric oxide (NO) acts as a neuroprotective retrograde messenger by blocking NMDA receptor-mediated intracellular calcium influx (Zhang and Snyder, 1995, Wink et al., 1996). Taurine is necessary for correct nervous system development (Heller-Stilb et al., 2002), as it exerts a neuroprotective role against excitotoxicity (Wu et al., 2005) by acting as a modulator of calcium homeostasis (Chepkova et al., 2006, Chen et al., 2004). This aminoacid is also considered as a neuromodulator of aminoacidergic neurotransmission (del Olmo et al., 2000, Chepkova et al., 2006, El Idrissi, 2008) and is associated with the glutamatergic synaptic terminals (Torp et al., 1992), where it modulates presynaptic

NMDA receptors, facilitating axon excitability (del Olmo et al., 2000). Maternal separation also alters these compensatory mechanisms; it is known that MS modifies the expression of calcium binding proteins in cerebral regions implicated in stress response, such as the hippocampus (Giachino et al., 2007, Lephart and Watson, 1999), as well as nNOS expression (Lopez-Figueroa et al., 2002). Taurine concentration increases as a general response to stress exposure (Wu et al., 1998, Kong et al., 2006).

## AIM

We wanted to analyse the effects of maternal separation during the two first weeks of life on the neurobiological systems that determine the cognitive processes of male and female Wistar rats.

In this study, we established more specific goals: (1) to analyse what are the effects of maternal separation during the first two weeks of life on the corticosterone secretion and the neurotransmission systems and the involvement of gender-specific factors; (2) to evaluate how the cognitive processes in adolescent rats are modified as a consequence of early postnatal stress exposure procedure; (3) to determine the possible neurochemical and neuroanatomical variations on the neurotransmission system as a consequence of maternal separation; (4) to analyse if maternal separation has long-term effects on adult life.

For this purpose, we have first carried out a corticosterone measure and a neurochemical analysis of glutamate, GABA, taurine, dopamine and serotonin concentration, on postnatal period, after maternal separation procedure had finished. Then, in adolescent and adult life, we have carried out behavioural tests to study the motor and impulsive activity, and the spatial and non-spatial memory of adolescent and adult male and female Wistar rats. We have also analysed neuroanatomical modifications and the variations in aminoacids and monoamines content in extra-hypothalamic areas related to stress response, particularly in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals and experimental groups**

For this study, we have used litters of Wistar albino rats, that were assigned to control (C) and maternal separated (MS) experimental groups. The MS procedure was performed 5 hours daily for 10 days total, following the protocol of Colorado et al. (2006). From postnatal day (PND) 3 until PND 7 and from PND 10 until PND 14, the dams of MS litters were removed from their pups for 5h during the dark phase and taken to a separate room. The subjects were not manipulated on PND 7, 8. After PND 14, C and MS animals were weighed. Then the pups stayed in their home cage with their respective dams until PND 21 when they were weaned and separated into male and female groups.

### **Corticosterone measurement**

On PND 15, blood samples from control and maternal separated animals were collected to determine the corticosterone content in plasma. The analysis was done using a radioimmuno assay (RIA) technique.

### **Behavioural study**

The behaviour of C and SM animals were examined in two different apparatus. In the open field we evaluated the locomotor activity, the impulsivity, and the spatial and non-spatial recognition memory. The behavioural tests in the open field were carried out on early and late adolescence (PND 26, 50) and on the adult life (PND 170) of male and female rats. Indeed, a more complete evaluation of the working and the reference spatial memory was carried out in radial maze on late adolescence.

### **Histological Procedures**

A group of C and MS animals of both sexes that did not perform the behavioural test were used for neuroanatomical study on PND 26. Rats were perfused transcardially and the fixed brains were removed and cryostat sectioned in the sagittal plane.

Immunohistochemical reactions were carried out by using the biotin–avidin method or the fluorescence-binding technique on sections incubated with different antibodies. We analysed the specific binding to: the calcium binding proteins calbindin and parvalbumin; the specific nuclear protein NeuN; the GluR1 and GluR2/3 subunits and the NR1 subunit of AMPA and NMDA glutamate receptors, respectively and the neuronal nitric oxide synthase enzyme (nNOS).

The hippocampus, the medial prefrontal cortex, the amygdala, the septum and the accumbens nucleus of striatum were selected for neuroanatomical study and identified following the Paxinos and Watson atlas (1998).

### **Neurochemical analysis with HPLC**

Male and female offspring from C and MS litters were sacrificed on PND 15, PND 34, PND 58 or PND 178 by decapitation at the end of the behavioural test for neurochemical study. The brains were quickly removed and frozen. Tissue samples of dorsal and ventral hippocampus, septum and striatum were taken separately from the left and right brain structures and weighed.

For the monoamines and aminoacids analysis a high-performance liquid chromatography system with electrochemical detection (HPLC-EC) was used.

The compounds readily quantifiable included: dopamine and its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovalinic acid, serotonin and its metabolite 5-hidroxiindolacetic acid, glutamate, gamma-aminobutyric acid (GABA) and taurine.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Our results show that maternal separation causes different alterations in the cerebral systems of males and females, pointing to a different activation of neuroprotective mechanisms as a response to repeated stress depending on sex. Stress is a well-recognized factor that induces adaptive plasticity in the brain. Specifically, early stress during a sensitive period of development can interfere with normal experience-induced plasticity, affecting the programming of specific brain functions (Chocyk et al., 2013). In our study, MS females seem to activate neuroprotective systems to avoid neuronal damage induced by repeated stress, while MS males seem to alter their glutamatergic system. It has been previously described how early stress has effects not only on functional plasticity, but also on the neurogenesis of the glutamatergic system, among others (Chocyk et al., 2013).

Our results point that the activation of neuromodulation mechanisms, as a compensatory action against the alterations induced by maternal separation, is different depending on sex. Indeed, the modifications on females persist on adult life, but are reversed on males.

The response to stress is influenced by sex (Diaz Lujan et al., 2008). Differences of deleterious stress-induced effects on males and females could be due to a dimorphism in the regulation of the HPA axis by gonadal steroid hormones. During the sexual differentiation of early postnatal development, males produce and are exposed to a greater estradiol concentration in the brain as a consequence of the aromatisation of testosterone (Colciago et al., 2005, Schwarz and McCarthy, 2008). During SHRP, it could be that the altered activity of the HPA axis induced by MS was enhanced in males. Our results show a sexual dimorphism on corticosterone concentration on PND 15 that indicates a different response on HPA axis regulation due to early postnatal stress.

We have observed different variations, in dopamine, serotonin, glutamate, GABA and taurine concentration on MS animals in all the studied cerebral regions. Maternal separation modifies monoaminergic and aminoacidergic neurotransmission systems in a sexually dimorphic manner, depending on the age of the animals too.

The recognition memory studied in the open field does not vary due to the sex of the animals, neither due to age nor as a consequence of maternal separation. However, we have observed alterations of the spatial memory. In adolescence, it is improved on males; in adult life, the variations induced by maternal separation depend on sex.

We have also seen modifications in the motor activity and the impulsivity of the animals due to early postnatal stress. Maternal separation affects short-term motor activity of the animals, which is also modified on adult life, differently on both sexes. This experimental procedure alters too the impulsive behaviour, more noticeable on males. It seems that impulsive behaviour is related to spatial recognition memory in the open field.

The diverse modifications seen on neurotransmitter content can explain the behavioural variations observed in the adolescence and the adult life.

In conclusion, maternal separation during the first two weeks of life modifies response systems to stress and neurotransmission systems differently depending on sex, inducing alterations on the cognitive processes, as seen in our results. Considering our observations as a whole, early stressful experiences are important predicting events that prepare an effective response to adverse situations throughout the animal's lifetime.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

5HIAA: ácido 5-hidroxiindol acético

5HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

5HT<sub>1-7</sub>: receptores 1-7 de serotonina

Ab: anticuerpo

ABC: método de tinción inmunohistoquímica avidina-biotina peroxidasa

ABL: amígdala basolateral

Acc: núcleo accumbens

ACTH: *adrenocorticotropic hormone* (hormona adrenocorticotropa)

AMPA: receptor alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico de glutamato

ANOVA: análisis de la varianza

ATV: área tegmental ventral

BO: bulbo olfativo

CA1: región 1 del Asta de Amón hipocampal

CA3: región 3 del Asta de Amón hipocampal

CaMKII: calcio calmodulina kinasa II

CB: calbindina

cig: capa infragranular del giro dentado

COMT: enzima catecol-O-metil transferasa

CPFm: corteza prefrontal medial

CR: calretinina

CRF: *corticotropin releasing factor* (factor de liberación de corticotropina)

csg: capa infragranular del giro dentado

DA: dopamina

DAB: diaminobenzina

DAT: transportador de dopamina

DC: deambulaci3n central

DE: deambulaci3n externa

DHEA: dehidroepiandrosterona

DI: deambulaci3n interna

DOPAC: 3,4 hidroxifenilac3tico

DT: deambulaci3n total

EAAC-I: transportador de amino3cidos excitatorios-I

EDTA: 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyl)dinitrilo)tetraacetic acid (3cido etilendiaminotetraac3tico)

E-LTP: *early long-time potentiation* (potenciaci3n a largo plazo temprana)

EMR: errores de la memoria de referencia

EMT: errores de la memoria de trabajo

ET: errores totales

GABA: 3cido gamma-aminobuti3rico

GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, GABA<sub>C</sub>: receptores A, B y C de GABA

GABA-T: GABA alfa-oxoglutarato transaminasa

GAD: 3cido glut3mico descarboxilasa

GC: glucocorticoides

GD: giro dentado del hipocampo

GDP: *giant depolarizing potential* (potencial de despolarizaci3n gigante)

GLAST: transportador de glutamato-aspartato

GLT-1: transportador de glutamato 1

GluR1, GluR2/3: subunidades 1, 2/3 del receptor AMPA de glutamato

GR: receptor de glucocorticoides

HC: hipocampo

HHA: *hypothalamic-hypophysal-adrenal axis* (eje hipotálamo-hipófisis-adrenal)

HPLC-ED: *high-performance liquid chromatography-electrochemical detection* (detección electroquímica de cromatografía líquida de alta resolución)

HSD: 3beta-hidroxiesteroide dehidrogenasa

HVA: *homovalinic acid* (ácido homovalínico)

KCC2: canal de sinporte de potasio/cloro

LLP<sub>TAU</sub>: *taurine long-lasting potentiation* (potenciación de larga duración por taurina)

L-LTP: *late long-time potentiation* (potenciación a largo plazo tardía)

LTP: *long-time potentiation* (potenciación a largo plazo)

MAO<sub>A, B</sub>: enzima monoamino oxidasa A y B

MR: receptor de mineralocorticoides

NeuN: proteína del núcleo neuronal

NKCC1: canal de sinporte de sodio/potasio

NMDA: receptor N-metil D-aspartato de glutamato

nNOS: *neuronal nitric oxyde synthase* (óxido nítrico sintasa neuronal)

NO: *nitric oxyde* (ácido nítrico)

NPV: núcleo paraventricular del hipotálamo

NR1, NR2A, NR2B: subunidades 1, 2A y 2B del receptor NMDA de glutamato

OPA: *optaldheide acid* (ácido optaldheído)

PB: *phosphate buffer* (tampón fosfato)

PCA: *percloric acid* (ácido perclórico)

PE: postura erguida

PN: postnatal

PV: parvalbúmina

RIA: *radio immuno assay* (ensayo radioinmunológico)

SEP: septo, septum

SERT: transportador de serotonina

SHRP: *stress hiporresponsive period* (periodo de hiporrespuesta al estrés)

SM: separación materna

ST: estriado

TAU: taurina

TH: tirosina hidroxilasa

TO: tubérculo olfativo

VMA T1, 2: transportador vesicular de membrana 1, 2 de dopamina

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1 LA SEPARACIÓN MATERNA COMO MODELO DE ESTRÉS POSTNATAL	8
1.1 Respuesta del organismo al estrés: eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	12
1.2 Otros mecanismos de respuesta al estrés: proteínas enlazantes de calcio	16
2 DESARROLLO POSTNATAL DEL CEREBRO	17
2.1 Actividad del eje HHA durante el desarrollo postnatal del cerebro	17
2.2 Sistemas aminoacídicos de neurotransmisión	19
2.2.1 Sistema GABAérgico	19
2.2.2 Sistema glutamatérgico	22
2.2.3 Neurotransmisión aminoacídica durante el desarrollo encefálico	27
2.2.4 Taurina	29
2.3 Sistemas monoaminérgicos de neurotransmisión	31
2.3.1 Sistema dopaminérgico	31
2.3.2 Sistema serotoninérgico	34
2.3.3 Ontogenia de los sistemas monoaminérgicos	37
2.4 Esteroides neuroactivos	38
3 PROCESOS COGNITIVOS: MEMORIA DE RECONOCIMIENTO	42
3.1 Mecanismos celulares del aprendizaje y la memoria	43
4 EFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA EN LOS PROCESOS NEUROBIOLÓGICOS QUE SUBYACEN A LA MEMORIA	48
4.1 Efectos de la separación materna en los sistemas neurotransmisión	52
<b>OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>59</b>
1 ANIMALES	60
2 SEPARACIÓN MATERNA	62
3 CONTROL DEL PESO	62
4 VALORACIÓN DE CORTICOSTERONA POR RADIOINMUNOENSAYO	63
4.1 Toma de muestras para valoración de corticosterona	63
4.2 Procesamiento y análisis de las muestras	63
5 ESTUDIO COMPORTAMENTAL	64
5.1 Pruebas en el campo abierto	65
5.2 Pruebas en el laberinto radial de 8 brazos	69
6 ESTUDIO NEUROQUÍMICO	73
6.1 Sacrificio y toma de muestras para el estudio neuroquímico	73
6.2 Procesamiento y análisis de las muestras	75
7 ESTUDIO NEUROANATÓMICO	78
7.1 Perfusión y toma de muestras para el estudio neuroanatómico	78
7.2 Procesamiento de las muestras	79
7.2.1 Método avidita-biotina peroxidasa (ABC)	79
7.2.2 Técnica de inmunofluorescencia simple y doble	82
7.3 Análisis de las muestras	84
8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87

<b>RESULTADOS</b>	<b>88</b>
1 CONTROL DEL PESO	89
2 VALORACIÓN DE CORTICOSTERONA	89
3 ESTUDIO COMPORTAMENTAL	90
3.1 <i>Procesos cognitivos en el campo abierto</i>	90
3.1.1 Actividad motora	90
3.1.2 Comportamiento impulsivo	91
3.1.3 Memoria de reconocimiento no espacial	92
3.1.4 Memoria de reconocimiento espacial	93
3.2 <i>Memoria espacial en el laberinto radial de 8 brazos</i>	94
3.2.1 Aprendizaje	94
3.2.2 Adquisición de memoria	94
3.2.3 Consolidación de memoria	94
4 POBLACIÓN NEURONAL. INMUNOMARCAJE CONTRA NEUN	96
5 SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN AMINOACIDÉRGICOS	98
5.1 GABA	98
5.2 Glutamato	101
5.2.1 Receptores de glutamato	104
5.3 <i>Expresión de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS)</i>	107
5.4 Taurina	110
5.5 <i>Proteínas enlazantes de calcio</i>	112
6 SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN MONOAMINÉRGICOS	119
6.1 Dopamina	119
6.2 Serotonina	122
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>125</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO</b>	<b>148</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>160</b>

# **INTRODUCCIÓN**

# 1 LA SEPARACIÓN MATERNA COMO MODELO DE ESTRÉS POSTNATAL

El entorno postnatal es objeto de gran cantidad de estudios debido a la amplia y creciente literatura que indica que las experiencias durante la vida temprana pueden ser la causa de gran diversidad de alteraciones. Durante años se ha visto que las variaciones en el entorno temprano tienen distintos efectos en el desarrollo cerebral de las crías: las variaciones hormonales en madres gestantes y lactantes (*Casolini P., 1997; Catalani A., 2000, 2002, 2011; González J. C., 2004; Leret M. L., 2004a, b, 2007*), la manipulación de las camadas (*Biagini G., 1998; Bilbo S. D., 2007*) o las diferentes formas de separación materna (*Aisa B., 2007; Arborelius L., 2007; Banihashemi L., 2011; Barbosa-Neto J. B., 2012; Clinton S. M., 2010; Leret M. L., 2010a, b; Llorente R., 2007, 2008, 2009, 2012; Viveros M. P., 2009*), inducen modificaciones que se ponen de manifiesto en la adolescencia y la edad adulta.

En los roedores, como en la mayoría de los mamíferos, el hábitat postnatal de las crías está determinado principalmente por la madre (*Colorado R., 2006; Meaney M. J., 1996; Mogi K., 2011*). Incluso durante la etapa prenatal, las crías son susceptibles de alteraciones en su desarrollo cerebral; estudios previos realizados en nuestro laboratorio revelan que los tratamientos neurotóxicos a madres gestantes y lactantes alteran el desarrollo de los distintos sistemas cerebrales de las crías (*Antonio M. T., 1999, 2000; Leret M. L., 2002*), aunque como consecuencia de tratamientos más leves como el estrés sufrido durante la gestación también induce alteraciones en el mismo (*Bowman R. E., 2004; McCormick C. M., 1995, 2002*).

Tras el nacimiento, la cantidad o calidad de los cuidados maternos influyen en el desarrollo de las crías (*Kuhn C. M., 1998; Levine S., 2001*). La presencia materna no sólo es la fuente de calor y alimento necesaria para la supervivencia (*Huot R. L., 2004; Macrì S., 2006; Pryce C. R., 2003; Rüedi-Bettschen D., 2005*), sino que también regula numerosos procesos fisiológicos, como la apertura de los ojos, el desarrollo del comportamiento exploratorio (*Ellenbroek B. A., 2005*), la frecuencia cardíaca, el sueño o la producción de hormona del crecimiento o la respuesta al estrés (*Biagini G., 1998; Cirulli F., 2001; Kuhn C. M., 1998; Levine S., 2001*). Durante las dos primeras semanas de vida, la interacción madre-hijo es un factor modulador del desarrollo de la mayor parte de los sistemas que subyacen a la expresión de respuestas neuroendocrinas, emocionales y cognitivas de las crías (*Cirulli F., 2003; Díaz-Luján V. E., 2008; Liu D., 2000*).

Las variaciones en el cuidado materno producen modificaciones en el sistema de regulación de las respuestas frente al estrés (Aisa B., 2007; Banihashemi L., 2011; Champagne F. A., 2009; Daniels W. M. U., 2004; Díaz-Luján V. E., 2008; Gardner K. L., 2005; Kalinichev M., 2002; Ladd C. O., 2004, 2005; Pickering C., 2006; Pryce C. R., 2003; Wigger A., 1999). También induce cambios en los sistemas de neurotransmisión (Arborelius L., 2007; Barbosa-Neto J. B., 2012; Brake W. G., 2004; Daniels W. M. U., 2004; Ellenbroek B. A., 2005; Faturi C. B., 2010; Gardner K. L., 2009; Kaufman J., 2000; Marcos B., 2008). Además, a largo plazo, las diferencias en los cuidados postnatales pueden ser responsables de diversas alteraciones en las capacidades cognitivas (Aisa B., 2007; Bagot R. C., 2009; Barha C. K., 2007; Biagini G., 1998; Bronzino J. D., 1996; Cannizzaro C., 2006; Cirulli F., 2003; Colorado R., 2006; Garner B., 2007; Gruss M., 2008; Hui J., 2011; Huot R. L., 2002; Levine S., 2001; Liu D., 2000; Oitzl M. S., 2010).

En animales neonatos, la separación materna es considerada como un procedimiento experimental de inducción de estrés (Aisa B., 2007; Biagini G., 1998; Cannizzaro C., 2006; Colorado R., 2006; Daniels W. M. U., 2004; Huot R. L., 2002, 2004; Kosten T., 2007a, b; Ladd C. O., 2004, 2005; Orelan S., 2009; Pickering C., 2006; Rees S. L., 2006; Roman E., 2006; Rüedi-Bettschen D., 2005; Sloten H., 2006; Wigger A., 1999). El estrés se define como *“aquella amenaza real o interpretada para la integridad física o psicológica de un individuo que resulta en una respuesta fisiológica y/o comportamental”* (McEwen B. S., 2007). En situaciones de estrés el metabolismo celular está aumentado, y con él las hormonas glucocorticoideas que lo regulan (Selye H., 1950); por este motivo, el estrés también se define como *“todo aquello que induce un incremento de la secreción de glucocorticoides”* (Levine S., 2000). El responsable de la secreción de glucocorticoides es el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), vía que integra los sistemas nervioso y hormonal para producir una respuesta frente a un estímulo en el organismo (Engelman M., 2003; Tsigos C., 2002; Oitzl M. S., 2010). Los glucocorticoides también intervienen en el crecimiento y diferenciación neuronal (Catalani A., 2011; deKloet E. R., 2000), incluidos aquellos procedentes de las madres: otros estudios realizados por nuestro grupo de investigación demuestran que la alteración de los niveles de glucocorticoides maternos afectan al desarrollo de los sistemas de neurotransmisión de las crías (Leret M. L., 2004a, b).

En mamíferos, una parte sustancial del desarrollo cerebral ocurre después del nacimiento; durante las dos primeras semanas de vida postnatal, los sistemas de neurotransmisión aminoacídrgicos cambian su funcionalidad y terminan de desarrollarse (Herlenius E., 2004) y los sistemas monoaminérgicos completan su maduración (Herlenius E., 2004; Park M., 2000). Por ello, las variaciones en los niveles de glucocorticoides durante los primeros días de vida afectan el desarrollo postnatal y pueden producir alteraciones que persistan a lo largo de la vida del animal (Faturi C. B., 2010; McCormick C. M., 2010a, b; Plotsky P. M., 1993).

Existen muchos protocolos diferentes de inducción de estrés por separación materna, que incluyen desde la privación materna durante 24 horas hasta distintos procedimientos de separación repetida de duración muy variable en periodos de tiempo asimismo dispares (*Nishi M., 2013*). Como consecuencia, las distintas formas de estrés postnatal por separación materna repetida tienen efectos muy heterogéneos, dependiendo de los distintos protocolos utilizados, que no están claramente definidos y cuyas repercusiones a largo plazo no están bien establecidas.

La separación materna repetida consiste en aislar a la madre de sus crías un periodo de tiempo variable al día durante las primeras semanas de vida (*Ellenbroek B., 2005; Colorado R. A., 2006; Macri S., 2008; Plotsky P. M., 1993*) y está basado en la observación de las situaciones naturales en las que, durante la interacción normal madre-hijo, la madre muestra un comportamiento de cuidado intenso, pero también deja regularmente a las crías por cortos o largos periodos de tiempo (*Calhoun J. B., 1963; Kuhn C. M., 1998*). Además, las crías reciben mayores cuidados maternos durante la fase de luz, cuando la madre se encuentra en el nido, por lo que su falta en este periodo es más severa que durante la fase de oscuridad. Sin embargo, tras la separación el comportamiento materno está alterado, y tras la reunión, las crías reciben mayores cuidados compensatorios (*Macri S., 2006, 2008*). Consecuentemente, las crías desprovistas de cuidados durante la fase de oscuridad reciben comparativamente mayores cuidados compensatorios (*Clinton S. M., 2010; Huot R. L., 2004*), por lo que es mayor la sensibilidad a las experiencias tempranas durante la fase de oscuridad (*Rüedi-Bettschen D., 2005*). Por esto, las consecuencias de la separación materna dependen del momento en que se produce, así como de la duración de la misma (*Nishi M., 2013; McCormick C. M., 2002*).

Los periodos cortos de separación inducen un incremento de la ansiedad de las madres (*Eklund M. B., 2009*), que al retornar con sus camadas incrementan la intensidad de sus cuidados, lo que implica una disminución de los niveles de corticosterona (*Cannizzaro C., 2006; Cirulli F., 2001; Durand M., 1998*) y la estimulación del crecimiento y diferenciación neuronal, así como de la sinaptogénesis en el cerebro en desarrollo de las crías (*Cirulli F., 2003; Pryce C. R., 2003; Newberry R. C., 2008; Rüedi-Bettschen D., 2005*). Éstas, en la edad adulta, muestran una respuesta atenuada al estrés (*Banihashemi L., 2011; Cannizzaro C., 2006; Cirulli F., 2001, 2003; Lehmann J., 2000, 2002; Levine S., 2001*), una disminución del comportamiento de miedo y la ansiedad (*Biagini G., 1998; Bilbo S. D., 2007; Roman E., 2006*), y desarrollan una mejora en el aprendizaje y la consolidación de la memoria (*Cannizzaro C., 2006; Guijarro J. Z., 2007; Kosten T., 2007a, b; Lehmann J., 1999, 2002; Pickering C., 2006*).

Por el contrario, la separación materna repetida durante periodos de tiempo prolongados (3 horas o más) induce un comportamiento depresivo en la madre (*Boccia M. L., 2007*) y tiene efectos neuroendocrinos y comportamentales opuestos a los que tiene el aumento de los cuidados maternos: induce un incremento de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal de las crías (*Aisa B., 2007; Biagini G., 1998*), y a largo plazo, el desarrollo de ansiedad (*Colorado R., 2006; Daniels W. M. U., 2004; Hui J., 2011; Huot R. L., 2004; Kwak H. R., 2009; Lambas-Señas L., 2009; Neumann I. D., 2005; Pickering C., 2006; Rees S. L., 2006*), hiperactividad (*Brake W. G., 2004; Colorado R., 2006; Slotten H., 2006*) e hipersensibilidad al estrés (*Aisa B., 2007; Daniels W. M. U., 2004; Huot R. L., 2004; Zhang M., 2008*). En lo relativo a los procesos cognitivos, los efectos de este tipo de separación materna son muy dispares, y aunque numerosos trabajos experimentales apuntan un efecto negativo sobre el aprendizaje y la memoria (*Aisa B., 2007; Bagot R. C., 2009; Hui J., 2011; Huot R. L., 2002; Kosten T. A., 2007a, b; Roozendaal B., 2000, 2002*), hay otros que demuestran que la separación materna no tiene efectos sobre estos procesos (*Guijarro J. Z., 2007*) o que incluso los mejoran (*Barha C. K., 2007; Bronzino J. D., 1996; Lehmann J., 1999, 2002; Zhang M., 2008*).

Es al estudio de los efectos de la separación materna prolongada a la que está enfocado este trabajo y a la que se hace alusión en los apartados referentes a los efectos de la separación materna en los diversos sistemas analizados.

## 1.1 RESPUESTA DEL ORGANISMO AL ESTRÉS: EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL

Los glucocorticoides son unas hormonas corticoideas que están implicados en la respuesta al estrés a través de la regulación del metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas (Dubrovsky B., 1990; Seyle H., 1950). Además controlan la excitabilidad neuronal, la actividad de sistemas de neurotransmisores específicos y modulan el desarrollo del cerebro durante el periodo postnatal temprano (Catalani A., 2011; de Kloet E. R., 1998, 2000; McEwen B. S., 1986, 1991; Siegel G. J., 2006). Se sintetizan en la corteza de las glándulas adrenales que están situadas en los polos superiores de los riñones y se componen de dos partes distintas, médula y corteza. La médula, que constituye la parte interna de la glándula, secreta las hormonas adrenalina y noradrenalina en respuesta a la estimulación nerviosa simpática. La corteza está diferenciada morfológicamente en tres zonas en las que se sintetizan los tres tipos de hormonas corticoideas o corticosteroides que secreta. La zona glomerular sintetiza mineralocorticoides, la fascicular sintetiza glucocorticoides y la reticulada los esteroides gonadales u hormonas sexuales. Los corticosteroides son derivados del colesterol, del que se forma pregnenolona, que es el precursor común de los tres tipos de hormonas corticoideas (figura 1). Una vez sintetizados, los corticosteroides difunden directamente al torrente sanguíneo, por lo que su síntesis está regulada por el eje HHA (de Kloet E. R., 1998, 2000; Dubrovsky B., 1990; McEwen B. S., 1986, 1991; Tsigos C., 2002).

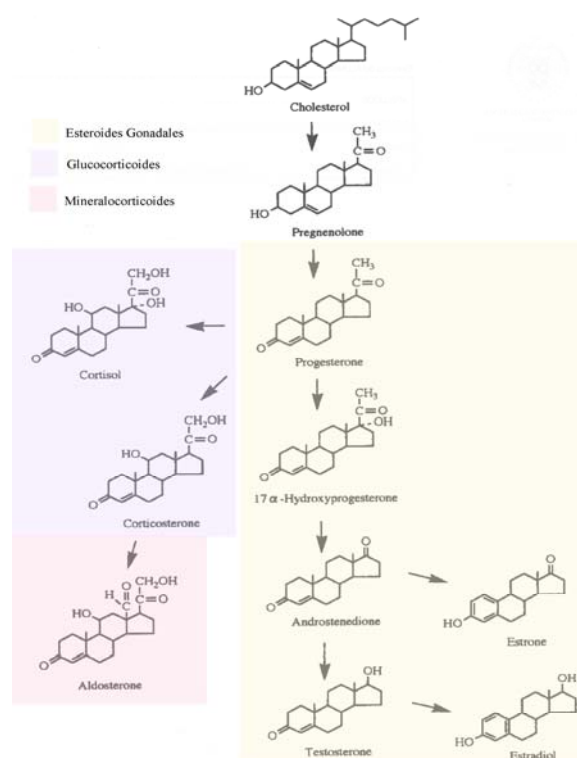


Fig. 1: Esquema de la síntesis de las hormonas corticoideas a partir de colesterol. Siegel G. J., 2006

El eje HHA constituye la vía integradora de los sistemas nervioso y hormonal y regula las respuestas neuroendocrinas, por lo que este eje es un componente esencial en la reacción del organismo frente al estrés (*Engelman M., 2003; de Kloet E. R., 1998, 2000; McEwen B. S., 1986, 1991*). Los cambios que ocurren en el entorno interno o externo producen una estimulación nerviosa que resulta en una respuesta fisiológica de liberación hormonal. En el hipotálamo medial se encuentra el núcleo paraventricular (NPV), que recibe numerosas conexiones nerviosas procedentes del sistema límbico y de la parte inferior del tronco encefálico. En respuesta a un estímulo activador, como el estrés físico o mental, el NPV sintetiza el factor liberador de corticotropina (CRF, *Corticotropin Releasing Factor*) que se transporta a través del sistema portal hipofisario a la adenohipófisis, donde induce la síntesis de hormona adrenocorticotropa o adrenocorticotropina (ACTH, *AdrenoCorticoTropic Hormone*); a su vez la ACTH se libera al torrente sanguíneo y activa la síntesis de corticosteroides en la corteza adrenal (*Baillieu E. E., 2001; de Kloet E. R., 1998, 2000; Lopez-Calderon A., 2008; McEwen B. S., 1986, 1991; Schwabe L., 2012*).

La secreción basal de glucocorticoides fluctúa a lo largo del día como consecuencia del ritmo circadiano de la actividad del eje HHA. Los niveles de máxima concentración en plasma se encuentran al iniciar el individuo su periodo de actividad (*Lopez-Calderon A., 2008*). El principal glucocorticoide en rata es la corticosterona, y su pico de liberación máxima ocurre al anoecer, por ser un animal de hábitos nocturnos. El eje HHA comienza a funcionar antes del nacimiento: a partir del día 16 de gestación se detecta actividad ACTH en la hipófisis fetal y alrededor del día 17 empiezan a ser funcionales las glándulas adrenales (*Dubrovsky B., 1990; Tsigos C., 2002*).

Los glucocorticoides ejercen su efecto biológico a través dos tipos de receptores: de mineralocorticoides (MR) y de glucocorticoides (GR). Ambos tipos son intracelulares y se distribuyen en el cerebro según un patrón de expresión diferente. En rata, la expresión de los receptores de glucocorticoides comienza en el periodo embrionario y tras el nacimiento sus niveles de expresión varían. Durante la primera semana de vida disminuye, presentando un mínimo entre los días PN 10-12, tras los que aumenta hasta alcanzar los niveles típicos de adulto en la tercera semana de vida (*de Kloet E. R., 1998, 2000; Díaz-Luján V. E., 2008; McEwen B. S., 1986, 1991; Tsigos C., 2002*).

Los MR tienen una alta afinidad por la corticosterona y se encuentran ocupados casi en su totalidad en condiciones basales (McEwen B. S., 1986). Se localizan principalmente en el hipocampo y en el núcleo paraventricular del hipotálamo, aunque también se expresan en neuronas del septo dorsolateral y en los núcleos cortical, central y basolateral de la amígdala (de Kloet E. R., 1998). Los GR tienen una baja afinidad por la corticosterona y su ocupación aumenta cuando la concentración de glucocorticoides circulantes es elevada, durante los intervalos de máxima expresión basal o después de un estrés agudo (McEwen B. S., 1986). Están ampliamente distribuidos por el sistema nervioso central, tanto en neuronas como en células de glía (de Kloet E. R., 1998; McEwen B. S., 1991). Las estructuras límbicas son especialmente ricas en GR: se encuentran en una elevada densidad de estos receptores en el hipocampo, septo, amígdala y corteza cerebral, aunque también están presentes en el núcleo supraóptico y paraventricular hipotalámicos, el tálamo y los ganglios basales (de Kloet E. R., 1998).

Cantidades excesivas y mantenidas de glucocorticoides pueden ser dañinas para el organismo (Fisher A. K., 2002; Lowy M. T., 1993; Sapolsky R. M., 2003), por esto, la activación secuencial del eje HHA está estrechamente regulada por retroalimentación negativa a través de sus receptores y los niveles de expresión de los mismos dependen de la concentración de glucocorticoides en la sangre. La retroalimentación negativa puede ocurrir de dos modos, “proactivo” o “reactivo”, mediados por los receptores MR y GR respectivamente. Los MR intervienen en el mantenimiento de la actividad basal de eje HHA a través de un control inhibitorio tónico de la activación del eje HHA por un umbral, de manera que la sensibilidad del sistema central al estrés depende de este tipo de receptores. Los GR intervienen en la inhibición a través de la finalización de la activación del eje HHA inducida por estrés (de Kloet E. R., 1998; Díaz-Luján V. E., 2008).

Los propios glucocorticoides regulan su concentración plasmática ejerciendo una retroalimentación negativa directa de la actividad del eje HHA a nivel hipotalámico y a nivel adenohipofisario (figura 2): en el hipotálamo inhiben la secreción de CRF y en la adenohipófisis inhiben la secreción de ACTH. También regulan la actividad del eje HHA de manera indirecta (figura 2) actuando sobre receptores en áreas del sistema límbico, como el hipocampo y la amígdala (Dedovic K., 2009; Díaz-Luján V. E., 2008), el estriado y la corteza prefrontal (Dedovic K., 2009; Jacobson L., 1991; Sapolsky R. M., 2003).

En el hipocampo, los glucocorticoides ejercen una regulación negativa del eje HHA (*Dedovic K., 2009*). Esta región cerebral posee una alta concentración de receptores MR y GR (*Kosten T., 2007a; Margineanu D., 1994*) que median la inhibición de la respuesta del eje HHA o la limitación de la magnitud e intensidad de la misma (*Jacobson L., 1991*). En la corteza prefrontal, los glucocorticoides también regulan negativamente la actividad del eje; sin embargo, en la amígdala estas hormonas la regulan positivamente (*Dedovic K., 2009*).

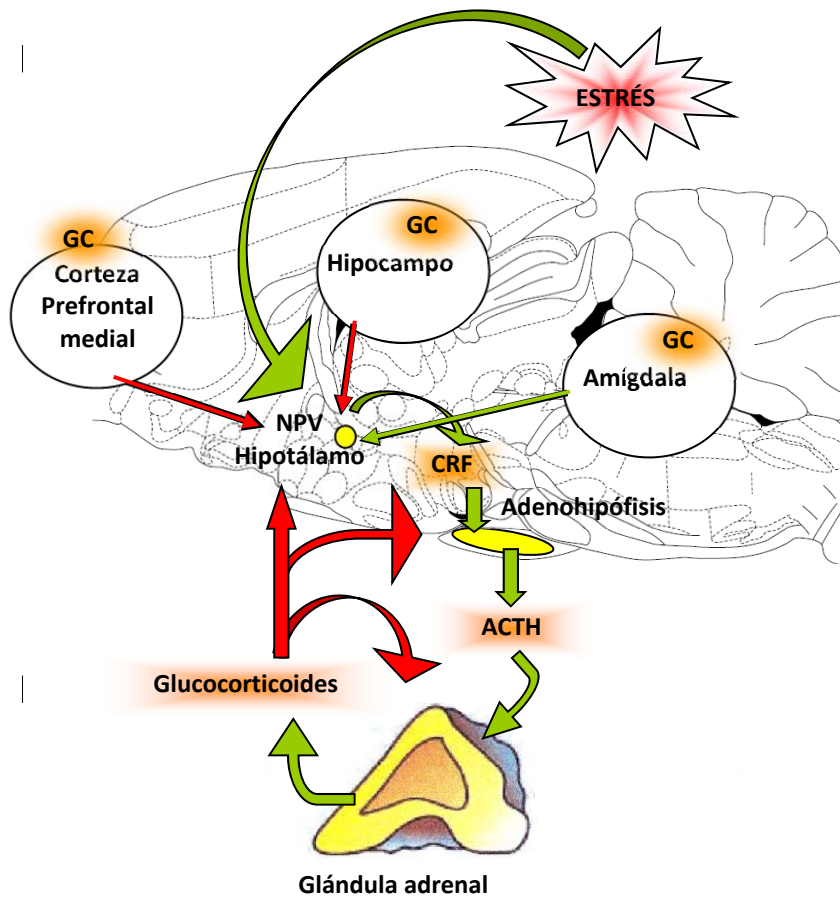


Fig. 2: Esquema de la regulación del eje HHA.

Las flechas verdes representan estímulos activadores. Las flechas rojas representan estímulos inhibidores. Adaptado de McCormick 2009.

Además de los glucocorticoides, existen otros factores que regulan la actividad del eje HHA. Las aferencias GABAérgicas inhiben la síntesis y liberación de CRF en el NPV (*Walker C. D., 2002*); por el contrario, la dopamina (*Lowy T. M., 1993*) y la serotonina (*Walker C. D., 2002*) ejercen una regulación positiva sobre este núcleo hipotalámico (*Tsigos C., 2002*). Las hormonas sexuales modulan la secreción de ACTH a nivel hipotalámico: la testosterona la inhibe y el estradiol la estimula (*Catalani A., 2011; Kudielka B. M., 2005; Sutcliffe 2009*). Además, los receptores de andrógenos y estrógenos se distribuyen en diversas áreas cerebrales, y a través de ellos, tanto las hormonas sexuales por sí mismas como sus metabolitos y otros neuroesteroides, regulan la respuesta del eje HHA frente al estrés (*Catalani A., 2011; Mellon 2007*). La taurina también interviene en la regulación de la respuesta de secreción de glucocorticoides del eje HHA (*Engelmann M., 2003*).

## 1.2 OTROS MECANISMOS DE RESPUESTA AL ESTRÉS: PROTEÍNAS ENLAZANTES DE CALCIO

Uno de los mecanismos que median los glucocorticoides por unión a sus receptores es el aumento de la acción de aminoácidos excitatorios (*Abrahám I., 1996; Moghaddam B., 1994*), que incrementan el flujo de calcio hacia el interior de las neuronas (*Lephart E. D., 1998, 1999*). Pero un aumento excesivo es citotóxico, es decir, perjudicial para el desarrollo y la supervivencia celular (*Abrahám I., 1996; Karst H., 2002, Li M., 2008; Sapolsky R. M., 2003*).

Como mecanismo de defensa ante el aumento de calcio intracelular citotóxico mediado por los glucocorticoides, el sistema nervioso cuenta con proteínas de unión a calcio, principalmente calbindina (CB), calretinina (CR) y parvalbúmina (PV) (*Baimbridge K. C., 1992*). Estas proteínas modulan la concentración de calcio intracelular, facilitando la maduración y la supervivencia neuronal (*Lephart E. D., 1998*), y además regulan las señales pre y postsinápticas e intervienen en la plasticidad de las dendritas (*Giachino C., 2007*).

Se distribuyen por todo el sistema nervioso central, principalmente en la corteza, núcleos basales, cerebelo, tálamo, hipotálamo, áreas del sistema límbico como el hipocampo. De manera generalizada, están asociadas a neuronas GABAérgicas. Mientras las proteínas CB y CR comienzan a expresarse en el periodo embrionario, la PV no aparece hasta la primera semana postnatal. Los tres tipos aumentan sus concentraciones hasta el final de la segunda semana de vida (*Baimbridge K. C., 1992; Celio M. R., 1990; Giachino C., 2007; McDonald A. J., 2001*).

## 2 DESARROLLO POSTNATAL DEL CEREBRO

### 2.1 ACTIVIDAD DEL EJE HHA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL CEREBRO

En las primeras semanas de vida, durante el desarrollo postnatal del cerebro la síntesis de glucocorticoides, que median fundamentalmente la activación de procesos catabólicos (*Dubrovsky B., 1990; Seyle H., 1950*), así como la de sus receptores, no es la misma que tiene lugar en el adulto (*Ben-Ari Y., 2004; Catalani A., 2011; Pickering C., 2006*).

La secreción de corticosterona en rata comienza durante el periodo fetal (*Dubrovsky B., 1990*), pero existe una marcada reducción durante los primeros días de vida (*Catalani A., 2011; Sapolsky R. M., 2003*): los niveles de esta hormona, así como de CRH y ACTH, se mantienen bajos desde el día PN 4 hasta el PN 12 (*Catalani A., 2011; Levine S., 2001*). En este periodo también disminuye la expresión de receptores GR y aumenta la unión de glucocorticoides a receptores MR. Esto se traduce en una atenuación de la capacidad de responder con un aumento de la liberación de ACTH en respuesta a los aumentos circadianos de glucocorticoides y a estímulos estresantes leves (*Díaz-Luján V. E., 2008; Wigger A., 1999; Lehmann J., 2002; Pickering C., 2006*). Sin embargo, a pesar de que la unión a GR está disminuida, la afinidad de unión a estos receptores es mayor en las crías que la que se observa en el adulto (*Tsigos C., 2002; Vázquez D. M., 1998*), por lo que la capacidad de activar una respuesta frente a situaciones amenazantes o agentes nocivos durante este periodo está mantenida (*Catalani A., 2011; Dent G. W., 2000; Lehman J., 2002; Pickering C., 2006*). Durante estos días, la baja actividad del eje HHA se mantiene debido a la potenciación de la retroalimentación negativa de los glucocorticoides en la adenohipófisis, que no depende de los receptores MR sino de los GR, cuya actividad a este nivel está incrementada (*Catalani A., 2011; Schmidt M., 2003*).

En el hipocampo, la expresión de receptores de glucocorticoides también varía en este periodo (*Catalani A., 2011; Gould E., 1999*). Tras el nacimiento la concentración de ambos tipos de receptores está disminuida, pero en el caso de los MR tanto su concentración como su afinidad aumentan rápidamente y alcanzan las concentraciones típicas del adulto al final de la primera semana de vida, mientras que los GR aumentan lentamente para alcanzar los niveles típicos de adulto alrededor de la tercera semana de vida (*Catalani A., 2011*).

Debido a la inactividad basal del eje HHA, a este intervalo de tiempo se le denomina período de hiposensibilidad al estrés (SHRP, *stress hiporresponsive period*) (*Catalani A., 2011; Levine S., 2001; Pickering C., 2006; Sapolski R. M., 2003; Vazquez D. M., 1998*). Esta hiposensibilidad está regulada por la alimentación y los cuidados que las crías reciben de sus madres (*Catalani A., 2011; Díaz-Luján V. E., 2008; Suchecki D., 2000, 2007*).

Este periodo es fundamental para la correcta maduración del eje HHA (*Díaz-Luján V. E., 2008; Levine S., 2001; Wigger A., 1999*). El SHRP constituye un mecanismo de protección que asegura unos niveles bajos y estables de glucocorticoides durante el desarrollo postnatal temprano. Las acciones de la corticosterona son predominantemente catabólicas y suprimen la neurogénesis y la proliferación, por lo que su inhibición relativa es una adaptación durante el desarrollo, periodo caracterizado por procesos anabólicos. En áreas cerebrales como el hipocampo que tiene desarrollo postnatal, durante el SHRP los bajos niveles de corticosterona aseguran un correcto balance entre nacimiento y muerte neuronal, la migración y la proliferación (*Gould E., 2000; Leinekugel X., 2003*).

## 2.2 SISTEMAS AMINOACIDÉRGICOS DE NEUROTRANSMISIÓN

### 2.2.1 SISTEMA GABAÉRGICO

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido dicarboxílico considerado como el neurotransmisor inhibitorio más importante en el sistema nervioso central de mamíferos y ampliamente distribuido en todas las regiones cerebrales (*Herlenius E., 2004; Olsen R. W., 2006; Ruiz-Gayo M., 2008*).

El principal precursor en la síntesis de GABA es la glucosa, aunque también puede sintetizarse a partir de piruvato y otros aminoácidos. La síntesis de GABA es un proceso altamente regulado en el sistema nervioso central. Se forma a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato procedente del metabolismo de la glucosa en el ciclo de Krebs (figura 3). La enzima GABA  $\alpha$ -oxoglutarato transaminasa (GABA-T) da lugar a ácido L-glutámico, que es descarboxilado por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) formando GABA. La síntesis de este neurotransmisor ocurre exclusivamente en los terminales de neuronas GABAérgicas, puesto que la enzima GAD no se encuentra en células de glía. Una vez sintetizado, se almacena en vesículas sinápticas desde donde se libera al espacio extracelular tras la despolarización de la membrana. La acción de este neurotransmisor finaliza por recaptura, neuronal (tanto pre- como postsináptica) y glial, por un transportador altamente específico. El GABA recapturado por los terminales presinápticos no se metaboliza, se une al transportador vesicular y se reutiliza. Sin embargo, si se recaptura en células postsinápticas o gliales se metaboliza para dar lugar a ácido succínico que entra a formar parte del ciclo de Krebs. Además, en las células gliales el GABA también puede ser metabolizado por la glutamina sintetasa produciendo glutamina, que se transporta a células neuronales y da lugar al glutamato por la acción de la glutaminasa neuronal. Por acción de la enzima GAD, el glutamato es el precursor de GABA (*Olsen R. W., 2006; Ruiz-Gayo M., 2008*).

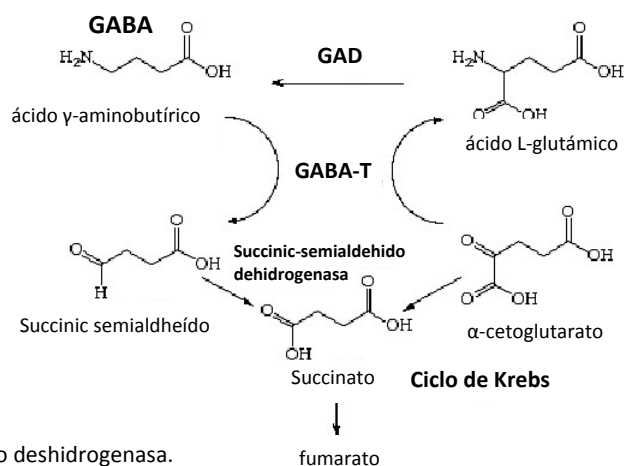


Fig. 3: Esquema de la síntesis de GABA.  
GABA-T: GABA transaminasa; GAD: ácido glutámico deshidrogenasa.

La enzima GAD está implicada en la diferenciación sexual del cerebro (McCarthy M. M., 2002). Tras el nacimiento, la enzima GAD se expresa en mayor cantidad en regiones donde la concentración de glucocorticoides es más elevada en el hipotálamo y regiones del sistema límbico, pero sin embargo, el día PN 15 las diferencias de concentración entre machos y hembras desaparecen (Davis A. M., 1996), y su concentración se ha relacionado con los niveles de testosterona (Davis A. M., 1998).

Hasta el día PN10 GABA actúa como neurotransmisor excitatorio y posee funciones tróficas (Represa A., 2005): regula el crecimiento y la maduración celular (Berninger B., 1995), promueve la supervivencia neuronal y favorece la sinaptogénesis (Ganguly K., 2001). Esto es debido a que en el periodo postnatal temprano los sistemas aminoacídicos no han terminado de desarrollarse y su funcionalidad se modifica durante las dos primeras semanas de vida (Ben-Ari Y., 2004; Chelujá M. G., 2007). Al madurar estos sistemas, el GABA adquiere una función inhibitoria y actúa modulando la actividad excitatoria en el cerebro, por lo que el sistema GABAérgico se establece principalmente en circuitos de interneuronas de axones cortos localizados en áreas como el tronco encefálico, el bulbo olfatorio, el cerebelo, los ganglios basales, la corteza cerebral, el tálamo, el hipotálamo y el hipocampo (Herlenius E., 2004; Wilson M. A., 1996).

También existen circuitos de proyección larga a través de los que el GABA interviene en el comportamiento motor. Las principales proyecciones GABAérgicas van (Herlenius E., 2004; Wilson M. A., 1996):

- desde el estriado hasta la sustancia nigra
- desde la sustancia nigra hasta el colículo superior y el núcleo motor talámico
- desde la sustancia incierta y el núcleo tegmental ventral hasta la corteza prefrontal
- desde las células de Purkinje a los núcleos grises del cerebelo y al sistema vestibular

Existen dos tipos principales de receptores de GABA en el cerebro: los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. Ambos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, pero su patrón de distribución no es igual: hay regiones cerebrales en las que coexisten ambos tipos de receptores y regiones en las que solo se encuentra uno de los dos tipos. Además, durante el desarrollo cerebral, pre y postnatal, tienen lugar cambios en la expresión de las diferentes subunidades que conforman estos receptores (Herlenius E., 2004; Olsen R. W., 2006). Existe un tercer tipo de receptor, GABA<sub>C</sub>, estructuralmente similar al receptor GABA<sub>A</sub> (Olsen R. W., 2006; Wilson M. A., 1996).

El receptor GABA<sub>A</sub> es un receptor ionotrópico acoplado a un canal de Cl<sup>-</sup>. Se localiza en el sistema nervioso central a nivel postsináptico. La unión de GABA a este receptor es directamente responsable de la apertura del canal de Cl<sup>-</sup> que produce una hiperpolarización de la membrana (Hevers W., 2002; Olsen R. W., 2006). Las subunidades que lo conforman dependen de la región cerebral en que se encuentre, y la distribución de las mismas en regiones como el tálamo, el hipocampo o la amígdala juega un importante papel estableciendo la respuesta fisiológica de este receptor, que está implicada en la diferenciación sexual del cerebro (Davis A. M., 2000). Cabe destacar que la corticosterona actúa como agonista de este receptor, de manera que una elevada concentración de esta hormona en el cerebro puede actuar como depresora de la actividad cerebral (Baulieu E. E., 2001).

El receptor GABA<sub>B</sub> es un receptor metabotrópico acoplado mediante proteínas G a un canal de K<sup>+</sup>. Este receptor puede mediar inhibiciones tanto pre- como postsinápticas. En el primer caso su activación disminuye la conductancia a Ca<sup>2+</sup>, disminuyendo la liberación de neurotransmisores, y en el segundo su activación aumenta la conductancia al K<sup>+</sup>, hiperpolarizando la membrana neuronal. Este receptor no es funcional hasta el momento del nacimiento (Herlenius E., 2004; López-Bendito G., 2002).

El receptor GABA<sub>C</sub> es un receptor ionotrópico de acción inhibitoria a través de canales de Cl<sup>-</sup> (Olsen R. W., 2006; Wilson M. A., 1996). Media la inhibición lateral a las respuestas lumínicas en la retina.

## 2.2.2 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante del sistema nervioso central de mamíferos y el precursor de GABA (Hassel B., 2006). Es el principal mediador de la información sensorial, la coordinación motora, las emociones y la cognición. De forma semejante al sistema GABAérgico, se distribuye ampliamente por todo el cerebro (Herlenius E., 2004; Pickering C., 2006).

El glutamato es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que es sintetizado fundamentalmente a partir de la glucosa, aunque puede formarse a partir de otros sustratos. Su síntesis y metabolismo ocurre tanto en neuronas como en células de glía.

Cuando la glucosa actúa como precursor, el glutamato se forma a partir del piruvato obtenido en el ciclo de Krebs (figura 4). La biosíntesis tiene lugar en la mitocondria por transaminación del 2-oxoglutarato, reacción reversible que puede ser catalizada por dos enzimas diferentes: la aspartato aminotransferasa y la glutamato deshidrogenasa (Hassel B., 2006).

En las células de glía se forma a partir de glutamina. El glutamato puede ser capturado por el transportador glutamato-1 (GLT-1) o por el transportador glutamato-aspartato (GLAST) y metabolizado en las células gliales a glutamina por la enzima glutamina sintetasa. La glutamina, a través de un transportador de baja afinidad, alcanza el terminal nervioso y por medio de una glutaminasa, de localización mitocondrial, se metaboliza de nuevo en glutamato (Hassel B., 2006).

Además el glutamato puede producirse por transaminación a partir de aspartato y se forma continuamente durante el recambio de proteínas tisulares y en las numerosas reacciones de transaminación en las que está involucrado (Bradford H. F., 1998).

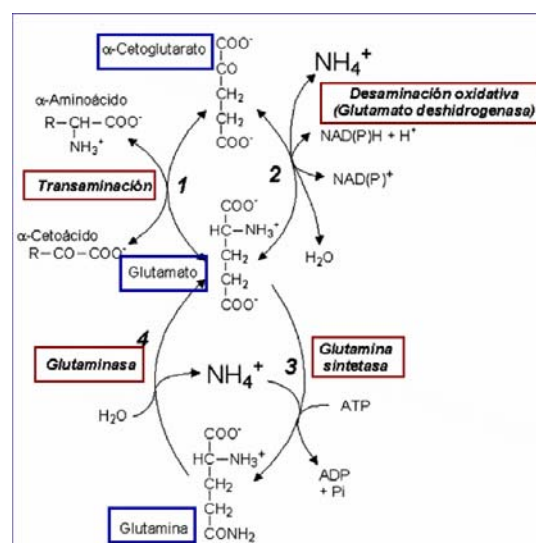


Fig. 4: Esquema de la síntesis del glutamato.

El glutamato sintetizado de uno u otro modo es empaquetado en vesículas sinápticas (Hassel B., 2006), desde donde se libera tras la despolarización de la membrana neuronal. La principal vía de inactivación del glutamato es la recaptura por parte del terminal nervioso mediante un transportador de alta afinidad denominado transportador de aminoácidos excitatorios-I (EAAC-I). También puede ser recapturado por las células de glía (Bradford H. F., 1998).

Las principales vías de conexión glutamatérgicas están relacionadas con el control del comportamiento motor y la modulación de las vías dopaminérgicas (Reiner A., 2010); parten desde la corteza y se dirigen al estriado y al tálamo principalmente. Cabe destacar la conexión cortical de las neuronas piramidales con las interneuronas GABAérgicas (Riaza Bermudo-Soriano C., 2012).

También hay vías intrínsecas glutamatérgicas en el hipocampo (figura 5) que están relacionadas con el aprendizaje y la memoria por la activación de receptores de glutamato en esta región cerebral (Bliss T., 1996; Kosten T., 2007a, b), así como implicadas en la regulación de la respuesta al estrés (Riaza Bermudo-Soriano C., 2012).

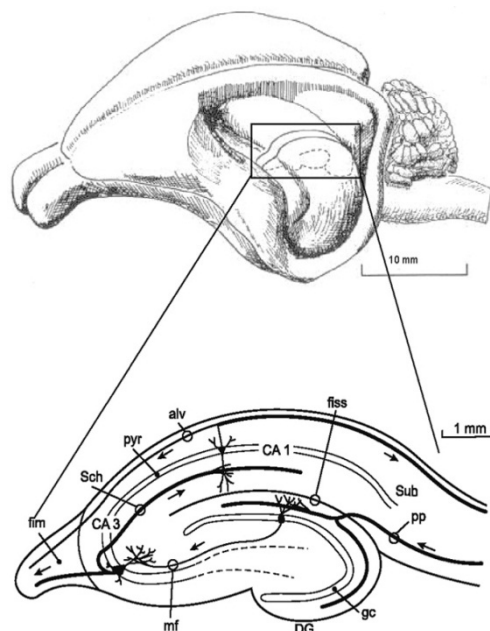


Fig. 5: Representación gráfica de las vías intrínsecas glutamatérgicas del hipocampo. CA1, CA3: regiones CA1, 3 del Asta de Amón; DG: giro dentado; fim: fimbria; Sch: colaterales de Schaffer; mf: fibras musgosas; pyr: capa piramidal del Asta de Amón; alv: alveo; fiss: fisura hipocampal; gc: capa granular del giro dentado; Sub: subículo; pp: tracto perforante. Siegel G. J., 2006.

Existen dos tipos principales de receptores de glutamato de los que depende su acción excitatoria: los receptores metabotrópicos y los ionotrópicos. Ambos pueden localizarse tanto en la membrana pre- como postsináptica (Riaza Bermudo-Soriano C., 2012). La expresión de las diferentes subunidades que conforman cada receptor varía durante el desarrollo prenatal y tras el nacimiento (Herlenius E., 2004).

Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y median acciones más lentas y duraderas que los receptores ionotrópicos. Pueden localizarse tanto pre- como postsinápticamente. Hay ocho receptores metabotrópicos diferentes (mGluR1-mGluR8) agrupados en tres clases funcionales. Los receptores pertenecientes al grupo I favorecen la liberación de neurotransmisores por inducción de la liberación de  $Ca^{2+}$  de reservas citoplasmáticas. La activación de los receptores pertenecientes a los grupos II y III resulta en una inhibición de la liberación de neurotransmisores (Hassel B., 2006; Riaza Bermudo-Soriano C., 2012).

Los receptores ionotrópicos son canales iónicos dependientes de ligando, que se dividen en tres grupos en función de los agonistas que se unen a ellos (Riaza Bermudo-Soriano C., 2012): AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico), NMDA (N-metil D-aspartato) y ácido kainico. Están ampliamente distribuidos por todo el sistema nervioso central, aunque los encontramos en mayor densidad en el hipocampo, la corteza cerebral, el septo, estriado y amígdala. Los receptores AMPA y NMDA han sido muy estudiados por su implicación en la potenciación a largo plazo, proceso molecular de formación de la memoria (Bliss T., 1996; Kosten T., 2007a, b). También se han estudiado los cambios en la expresión de sus diferentes subunidades a lo largo del desarrollo, que suponen un cambio en su funcionalidad e implicación en la acción excitatoria en el cerebro. Los receptores de kainato forman un canal iónico que permite principalmente el paso de  $Ca^{2+}$  (Herlenius E., 2004; Pickering C., 2006).

Los receptores AMPA están acoplados a un canal catiónico no específico permeable a  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  y a través del que median las sinapsis excitatorias rápidas en el cerebro (Pickering C., 2006). Pueden estar compuestos por cuatro subunidades: GluR1 - GluR4. Cabe destacar que la presencia de la subunidad GluR2 en el receptor disminuye la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  (Pickering C., 2006). Las subunidades de los receptores AMPA muestran un patrón de expresión diferente a lo largo de las tres primeras semanas de vida postnatal. La subunidad GluR1 del receptor AMPA se detecta desde el día 15 embrionario y su expresión aumenta hasta el momento del nacimiento, cuando se estabiliza. La subunidad GluR2 también está presente durante el periodo prenatal. Tras el nacimiento, su expresión incrementa hasta los días PN 5-7, disminuye hasta los niveles típicos del

nacimiento en PN 10 y disminuye su expresión hasta alcanzar niveles por debajo de los del nacimiento hasta el día PN 18 (*Pickering C., 2006*).

Los receptores NMDA son canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que están bloqueados de manera voltaje-dependiente por iones  $\text{Mg}^{2+}$  a un potencial de membrana en reposo (*Lee H., 2003; Siegel G. J., 2006*). El  $\text{Zn}^{2+}$  también bloquea el receptor NMDA pero de una forma independiente de voltaje. Ejerce un efecto protector ya que retrasa y alarga la acción del glutamato. La localización de estos receptores es postsináptica y son los más regulados del sistema nervioso central; requieren la unión simultánea de dos agonistas diferentes para activarse: el glutamato y la glicina, que por separado no pueden abrir el canal iónico. Además, para su activación es necesaria una despolarización de la membrana neuronal que elimine el bloqueo por  $\text{Mg}^{2+}$ .

Están compuestos por una subunidad NR1, necesaria para la funcionalidad del canal (*Lee H., 2003*), combinada con una subunidad NR2A o NR2B. El cerebro embrionario contiene receptores NMDA con subunidades NR1 y NR2B. Durante las tres primeras semanas de vida postnatal, la expresión de las subunidades de los receptores NMDA cambia. La expresión de NR1 incrementa desde el día PN 3 hasta el PN 14, cuando empieza a disminuir hasta alcanzar niveles inferiores a los del nacimiento a partir del día PN 21. NR2A tiene una baja expresión hasta el día PN 10, tras el cual está sobreexpresado en relación con los niveles del nacimiento. NR2B está sobreexpresado hasta el día PN 7 y disminuye sus niveles por debajo de los del nacimiento hasta el día PN 10 (*Pickering C., 2006*). Las subunidades NR1 y NR2A están relacionadas con la respuesta a variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  de los receptores NMDA, por lo que durante el periodo perinatal el cerebro es más vulnerable a apoptosis por incrementos de calcio intracelular; los factores neurotróficos durante el desarrollo postnatal incrementan la expresión de estas subunidades, interviniendo en la maduración de la neurotransmisión glutamatérgica (*Glazner G. W., 2000*).

## MODULACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA: ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula con gran capacidad para difundir que actúa como mensajero transcelular y ejerce su acción sobre la misma neurona y las células adyacentes (*Garthwaite J., 1988*). Se diferencia de los neurotransmisores tradicionales en que no se almacena en vesículas, actúa directamente sobre segundos mensajeros y finaliza su actividad reaccionando con oxígeno, no se degrada ni recaptura. La síntesis de NO está catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que está regulada por calcio: la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por la activación de receptores NMDA de glutamato induce la activación de NOS (*Griscavage J., 1993; Rogers L. E., 1992*). El NO producido puede actuar de forma retrograda, modificando la función de las terminaciones presinápticas que llegan a la neurona nitrérgica. Actuando sobre las enzimas mitocondriales y sobre la propia NOS, el NO puede inducir la liberación de vesículas de neurotransmisores y producir la despolarización de la membrana, de manera  $\text{Ca}^{2+}$  independiente (*Garthwaite J., 1988; Ignarro L. J., 2000*).

El NO está implicado en procesos de plasticidad sináptica, ya que por su función de mensajero retrógrado estimula los receptores NMDA de glutamato favoreciendo el proceso de LTP. Asimismo, el NO posee un papel neuroprotector porque también es capaz de bloquear el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por la activación de receptores NMDA (*Bliss T., 1996; Wink D. A., 1993, 1996*).

Las neuronas nitrérgicas aparecen fundamentalmente en la corteza cerebral y el hipocampo (*Valtschanoff J. G., 1993*). En la corteza estas neuronas son GABAérgicas (*Chesselet M. F., 1989; Gabbott P. L., 1995*), aparecen en el periodo embrionario y aumentan su número en las primeras semanas de vida postnatal. En el hipocampo no aparecen hasta la primera semana de vida. También hay neuronas nitrérgicas en otras estructuras cerebrales como el septo, el estriado y núcleo accumbens, la amígdala y el hipotálamo, incluyendo el NPV (*Vincent S. R., 2000*).

### 2.2.3 NEUROTRANSMISIÓN AMINOACIDÉRGICA DURANTE EL DESARROLLO ENCEFÁLICO

La generación de impulsos nerviosos excitatorios en el cerebro maduro depende del trabajo conjunto de los receptores AMPA y NMDA del sistema glutamatérgico (Ben-Ari Y., 1997; Pickering 2006): la activación del receptor AMPA despolariza la membrana neuronal permitiendo el desbloqueo ejercido por el  $Mg^{2+}$  en el canal NMDA y, por tanto, su activación (Riaza Bermudo-Soriano C., 2012). La modulación de la neurotransmisión excitatoria depende de los circuitos de interneuronas inhibitorias GABAérgicas. Pero los sistemas de neurotransmisión aminoacidérgica así establecidos en el cerebro adulto no son iguales que los presentes en las primeras etapas del desarrollo cerebral (figura 6): su configuración cambia en el proceso de maduración, durante el desarrollo prenatal y las primeras semanas de vida postnatal (Ben-Ari Y., 1997, 2004; Herlenius E., 2004; Pickering C., 2006).

Hasta el día PN 10 el GABA posee carácter excitatorio y la excitación neuronal del cerebro prenatal depende de los receptores  $GABA_A$  y NMDA (Ben-Ari Y., 1997; Herlenius E., 2004). La vía excitatoria mediada por la actuación sinérgica de los receptores AMPA y NMDA se establece en el periodo postnatal temprano. De esta manera, en el cerebro inmaduro, los receptores  $GABA_A$  realizan la función que depende de los receptores AMPA más tarde en el desarrollo, cuando GABA adquiere su papel de neurotransmisor inhibitor (Ben-Ari Y., 1997, 2004; Ganguly K., 2001, Leinekugel X., 1997).

Las sinapsis glutamatérgicas son silentes hasta el final de la primera semana de vida postnatal, puesto que el bloqueo por  $Mg^{2+}$  es tan eficiente en los receptores de neuronas neonatales como en las adultas, y los receptores AMPA no son activos hasta el día PN 5-7 (Ben-Ari Y., 1997, 2004; Herlenius E., 2004; Pickering C., 2006).

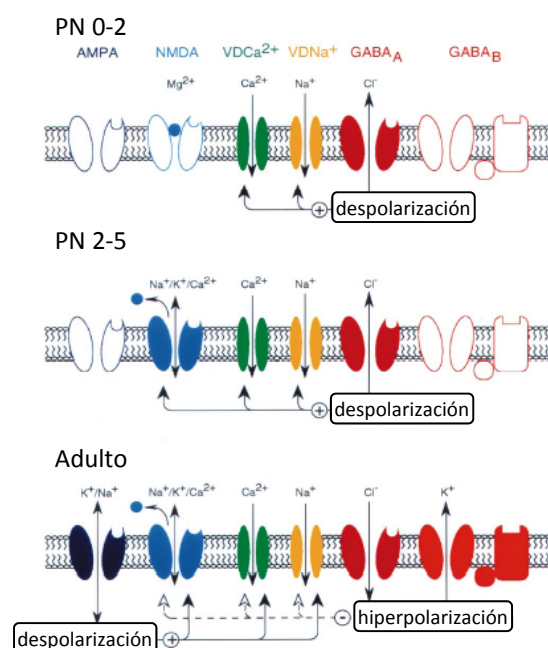


Fig. 6: Representación gráfica de la funcionalidad de los receptores de GABA y glutamato en diferentes etapas del periodo postnatal, durante el desarrollo del cerebro (PN 0-2 y PN 2-5), y en la edad adulta. BenAri 1997.

En el cerebro neonatal, la concentración de  $\text{Cl}^-$  intracelular es más elevada que en el cerebro maduro (Ben Ari Y., 2004) (figura 7). En las neuronas maduras, el cloro citoplasmático debe ser transportado al exterior para que haya una actividad GABAérgica correcta. Este transporte está mediado por un sinporter KCC2 de  $\text{Cl}^-/\text{K}^+$ ; sin embargo, las neuronas inmaduras acumulan cloruros por un sinporter NKCC1 de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , y por ello la activación de  $\text{GABA}_A$  durante el desarrollo es despolarizante. En la primera semana de vida postnatal, la unión de GABA a receptores  $\text{GABA}_A$  no induce una hiperpolarización de la membrana, sino la generación de potenciales despolarizantes gigantes (Giant Depolarizing Potentials, GDPs). Estos GDP provocan la despolarización necesaria para eliminar el bloqueo de  $\text{Mg}^{2+}$  de los receptores NMDA facilitando su activación (Herlenius E., 2004). A través de esta acción excitadora, hasta la segunda semana de vida postnatal el GABA interviene junto con el glutamato en los procesos de neurogénesis y sinaptogénesis (Ben-Ari Y., 1997, 2004), actuando además como factor trófico (Ganguli K., 2001; Herlenius E., 2004; McCarthy M. M., 1997, 2002; Owens D. F., 2002).

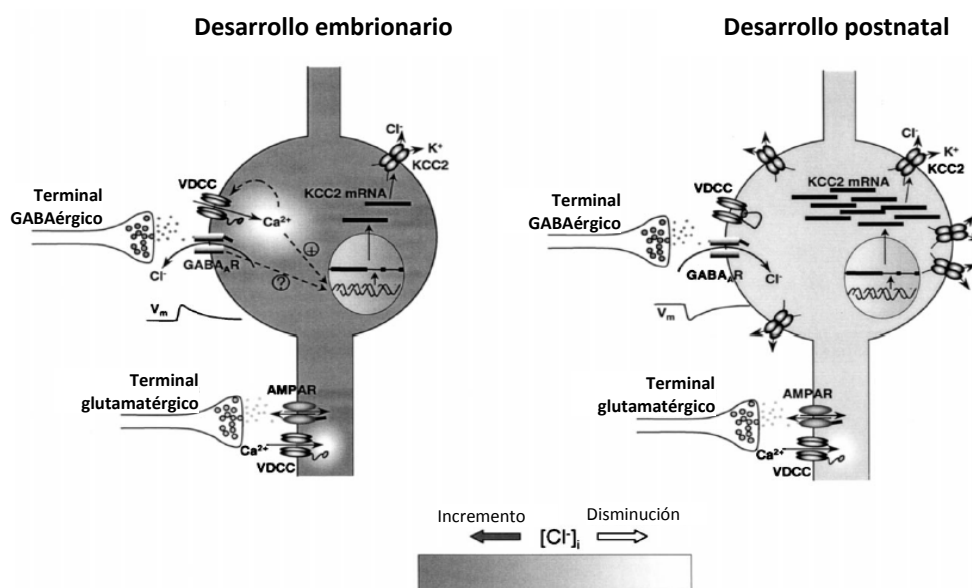


Fig. 7: Representación gráfica de las diferencias de concentración de calcio intracelular y funcionalidad de los receptores en el desarrollo embrionario y postnatal. Ganguli 2001. VDCC: canal de calcio dependiente de voltaje; KCC2: canal de cloro-potasio;  $\text{GABA}_A\text{R}$ : receptor  $\text{GABA}_A$ ; AMPAR: receptor AMPA.

Durante las primeras semanas de vida postnatal la regulación de la actividad neuronal se realiza sólo por inhibición a nivel presináptico a través de receptores  $\text{GABA}_B$  (Ben-Ari Y., 2004; Herlenius E., 2004; Lopez-Bendito G., 2002).

Cabe destacar además que entre los días PN 7-14 tiene lugar una superproducción de neuronas de aminoácidos excitatorios y de sinapsis (Herlenius E., 2004; Pickering C., 2006).

#### 2.2.4 TAURINA

La taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico) es un aminoácido no esencial que se encuentra en estado libre en la mayoría de las células de los mamíferos (Albrecht J., 2005; Chepkova A. N., 2006). Su concentración depende del aporte de este aminoácido por la dieta y de su síntesis en el organismo y existen transportadores de taurina que la capturan del plasma en todas las células animales (Hernández-Benítez R., 2012). Cabe destacar que en el cerebro de roedores su biosíntesis es muy elevada (Sturman J. A., 1993). En el periodo prenatal es el aminoácido libre más abundante del sistema nervioso central, de modo que en el momento del nacimiento, el cerebro contiene una elevada concentración de taurina. Ésta va disminuyendo durante la maduración hasta alcanzar la concentración típica en el adulto, que es la segunda más elevada después de la de glutamato (Albrecht J., 2005).

Se localiza en sinaptosomas en neuronas de diversas áreas cerebrales como el hipocampo, la corteza, el cerebelo o el estriado (Chen S. W., 2004) y su concentración está directamente relacionada con la de glutamato y GABA (El Idrissi A., 2008), pero no se considera la taurina como un neurotransmisor porque su liberación, por difusión simple o facilitada a través de canales (Oja S. S., 2000), es independiente de calcio y no posee receptores específicos (del Olmo N., 2000a).

La presencia de taurina es necesaria para el correcto desarrollo del sistema nervioso (Franconi F., 2004; Heller-Stilb B., 2002; Saransaari P., 1997a; Sturman J. A., 1993). Se ha observado que, en cultivos celulares, la taurina estimula la proliferación celular e incrementa el número de células progenitoras. Este aminoácido no es un mitógeno per se, sino que cuando la actividad proliferativa ha comenzado, estimula este proceso. La importancia de la taurina en la neurogénesis puede justificar el hecho de que en el bulbo olfatorio no se produzca una disminución de este aminoácido durante la maduración, al contrario que en el resto del cerebro (Hernández-Benítez R., 2012).

Además, este aminoácido tiene efectos osmorreguladores (Albrecht J., 2005; Hernández-Benítez R., 2012), actúa como modulador de la homeostasis de calcio (Chen S. W., 2004; Chepkova A. N., 2006) y como antioxidante (Hernández-Benítez R., 2012). Su concentración se eleva en condiciones estresantes (Kong W. X., 2006; Wu H., 2005) e interviene en la regulación del eje HHA (Engelmann M., 2003; Franconi F., 2004), por lo que se le atribuye una función neuroprotectora frente a la excitotoxicidad (Hada J., 1996; Saransaari P., 1997a; Tadros M. G., 2005; Wu H., 2005), especialmente en el cerebro inmaduro (Oja S. S., 2000).

La taurina también actúa como neuromodulador (del Olmo N., 2000a) e interviene en la neurotransmisión aminoacidérgica (del Arco A., 2001; Chepkova A. N., 2006; El Idrissi A., 2008). Por un

lado, debido a su similitud estructural a GABA (figura 8), actúa como agonista de sus receptores (Albrecht J., 2005; del Olmo N., 2000a, 2003), inhibiendo su liberación dependiente de calcio (Kong W. X., 2006). Es a través de receptores de glicina y GABA<sub>A</sub> como ejerce sus funciones fisiológicas y de regulación del desarrollo neuronal (del Olmo N., 2000a), a pesar de que sus efectos en la estimulación de la proliferación neuronal no están mimetizados ni por glicina ni por GABA (Hernández-Benítez R., 2012). Debido a su papel inhibitorio, el GABA actúa como ansiolítico (Olsen y Betz R. W., 2006), por lo que la taurina posee este mismo papel cuando ejerce su función a través de los receptores GABA<sub>A</sub> (del Olmo N., 2000b; Saransaari P., 1997a). Se ha visto también que de manera exógena la taurina inhibe la liberación y síntesis de serotonina (Kong W. X., 2006), por lo que también posee un efecto ansiolítico interviniendo de manera indirecta en la neurotransmisión de esta amina (Chen S. W., 2004; Kong W. X., 2006).

Por otro lado, la taurina modula a los receptores NMDA presinápticos, facilitando la excitabilidad del axón (del Olmo N., 2000a) por la disminución del umbral de activación de los potenciales de acción (del Olmo N., 2000a). De esta manera, es capaz de provocar cambios duraderos en la eficacia sináptica. Este mecanismo de acción se conoce como potenciación de larga duración (*long-lasting potentiation*, LLP<sub>TAU</sub>) y está relacionado con la formación de la memoria (del Olmo N., 2000a, 2003); de hecho, en adultos la administración de taurina está relacionada con la mejora de las funciones cognitivas (Chepkova A. N., 2006). Por su papel de modulador de la excitabilidad neuronal, este aminoácido se encuentra asociado a terminales sinápticos glutamatérgicos (del Olmo N., 2000a; Torp R., 1992).



Fig. 8: Representación esquemática de la estructura de la moléculas de taurina y GABA.

## 2.3 SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS DE NEUROTRANSMISIÓN

### 2.3.1 SISTEMA DOPAMINÉRGICO

La dopamina (dihidroxifeniletilamina, DA) es la catecolamina más abundante del cerebro (López M. G., 2008), grupo al que pertenece junto con la noradrenalina y la adrenalina. El sistema dopaminérgico interviene en los procesos neurales de asociaciones aprendidas (Besheer J., 1999), y la función de la DA está relacionada con los procesos de integración sensoriomotora y cognitivos (Herlenius E., 2004; Jay T. M., 2003).

Se sintetiza a partir de la L-tirosina (Martín M. I., 2008) por la acción de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH), limitante de su síntesis, y la dopa descarboxilasa (Ruiz-Gayo M., 2008) (figura 9), y se almacena en vesículas en el interior neuronal por la acción de un transportador vesicular (VMA T1, 2). Una vez la dopamina ha sido liberada y ha ejercido su acción sobre los receptores correspondientes es inactivada, bien por recaptura, bien por degradación enzimática. Tras la recaptura, realizada por un transportador de membrana (DAT) (Kuhar M. J., 2006), la dopamina puede ser integrada de nuevo en vesículas sinápticas o degradada enzimáticamente en el interior neuronal o en la brecha sináptica. En la degradación intraneuronal interviene la enzima monoamino oxidasa (MAO), localizada en la membrana externa de la mitocondria. Existen dos isoformas de MAO: MAO<sub>B</sub>, con menor especificidad de sustrato, es la encargada de degradar la dopamina; MAO<sub>A</sub> posee mayor afinidad para noradrenalina y serotonina. La degradación extraneuronal la realiza la enzima catecol-O-metil transferasa (COMT), que metila catecoles de manera general debido a su baja especificidad de sustrato. La degradación resulta en la formación de dos metabolitos: ácido 3,4 hidroxifenilacético (DOPAC), el más importante en los roedores, y ácido homovalínico (HVA), característico de humanos (Kuhar M. J., 2006).

A través de diversas vías dopaminérgicas, la dopamina regula diversos sistemas cerebrales. Éstas pueden dividirse según la longitud de sus fibras en ultracortas, intermedias y largas (Barili P., 1998). Las vías ultracortas son el sistema retiniano y el sistema glomerular del bulbo olfatorio, que modulan la información visual y olfativa respectivamente. Las vías intermedias están implicadas en el control de la secreción hormonal y regulan la función hipotalámica. Las vías largas están implicadas en los mecanismos de interés y refuerzo de motivación, y son las responsables de iniciar la actividad motora que modula la respuesta del animal frente a estímulos ambientales.

Las vías dopaminérgicas largas son tres (figura 10):

- Mesolímbica, cuyas fibras van desde el área tegmental ventral hasta estructuras del sistema límbico, como el núcleo accumbens, núcleo de la estría terminal, amígdala, hipocampo y núcleo septal lateral. El sistema dopaminérgico mesolímbico se relaciona con el mecanismo de recompensa y el refuerzo natural (Barili P., 1998). Junto con la vía mesocortical, está implicada en los procesos de memoria y control emocional y forma parte de los circuitos de recompensa implicados en los procesos de adicción (Ruiz-Gayo M., 2008).
- Mesocortical, cuyas fibras van desde el área tegmental ventral hasta la corteza frontal y prefrontal. Esta vía está involucrada en la memoria de trabajo y en las funciones ejecutivas (Buckert M., 2012) a través de la modulación de la neurotransmisión excitatoria en la corteza prefrontal, que está relacionada con el hipocampo (Barili P., 1998).
- Nigroestriatal, cuyas fibras van desde la sustancia nigra hasta el estriado, desde donde surgen proyecciones que forman circuitos internos en el estriado o que van hasta el núcleo ventral del hipotálamo y la corteza. El sistema nigroestriatal es la vía dopaminérgica más importante, ya que alrededor del 80% de la DA cerebral se encuentra en el estriado (Barili P., 1998). Esta vía está relacionada con la regulación motora, con el control del movimiento involuntario y el tono muscular (Ruiz-Gayo M., 2008).

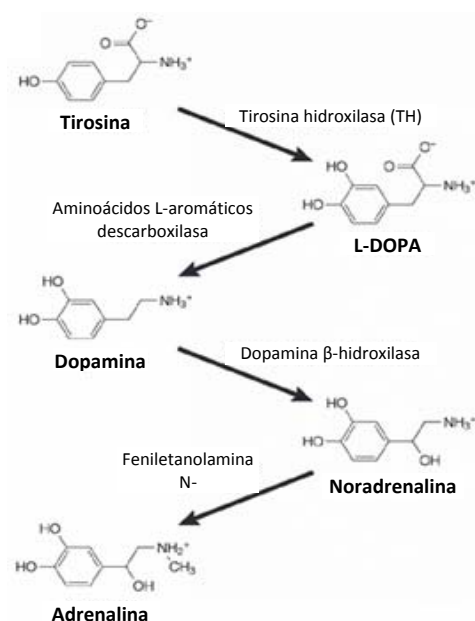


Fig. 9: Representación esquemática de la síntesis de dopamina. Siegel G. J., 2006

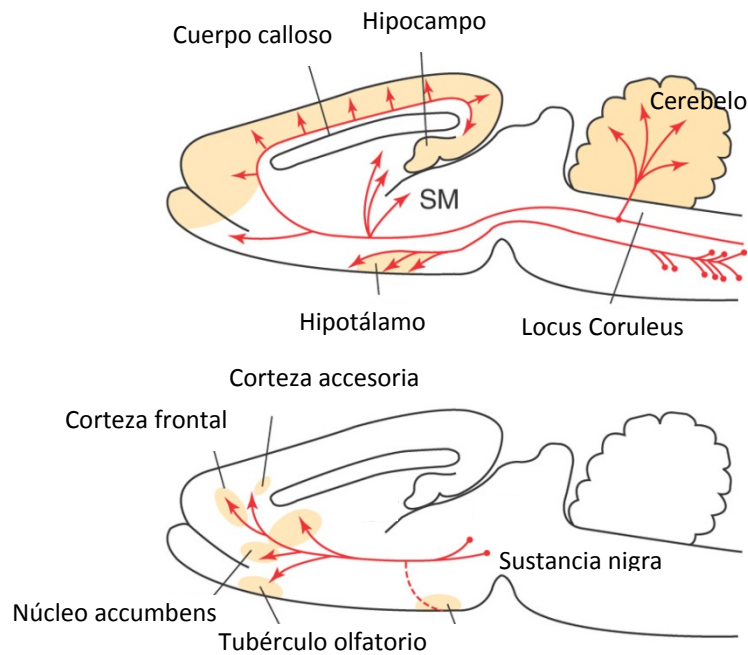


Fig. 10: Representación esquemática de las vías dopaminérgicas.  
 En la imagen superior se representan las vías mesolímbica y mesocortical. SM: septo medial.  
 En la imagen inferior se representa la vía nigroestriatal. Siegel G. J., 2006.

La dopamina se une a dos tipos de receptores, ambos acoplados a proteínas G: tipo I o activadores y tipo II o inhibidores, acoplados a proteínas  $G_s$  y  $G_i$  respectivamente (Herlenius E., 2004; Kuhar M. J., 2006; Ruiz-Gayo M., 2008).

Los de tipo I son los receptores  $D_1$  y  $D_5$ , son postsinápticos y provocan un aumento de permeabilidad a  $Ca^{2+}$  y por tanto despolarización de la membrana (Ruiz-Gayo M., 2008). Se expresan en el hipocampo y la corteza. Cabe destacar que a través de los receptores  $D_1$  el sistema dopaminérgico tiene una importante función en la memoria de trabajo espacial en roedores (Herlenius E., 2004; Hotte M., 2005). En la amígdala, la activación de estos receptores tiene efectos ansiogénicos (de la Mora M. P., 2010), y en la corteza prefrontal medial, existe una relación en forma de U invertida entre la activación de los receptores  $D_1$  por estimulación hipotalámica y la inducción de LTP en esta región cerebral (Gurden H., 1999; Zhang M., 2008).

Los de tipo II son los receptores  $D_{2A}$ ,  $D_{2B}$ ,  $D_3$  y  $D_4$ , que provocan un aumento de la permeabilidad a  $K^+$  y por tanto, una hiperpolarización de membrana.  $D_{2A}$  y  $D_3$  son presinápticos y actúan como autorreceptores en la modulación de la síntesis y liberación de dopamina;  $D_{2B}$  y  $D_4$  son postsinápticos (Ruiz-Gayo M., 2008). Se expresan en neuronas del estriado, de la corteza cerebral y del sistema límbico, especialmente en el núcleo accumbens, la amígdala y el hipocampo.

### 2.3.2 SISTEMA SEROTONINÉRGICO

La 5-hidroxitriptamina o serotonina (5HT) se sintetiza a partir del aminoácido L-triptófano, procedente mayoritariamente de la dieta, por la acción secuencial de la enzima triptófano hidroxilasa y una descarboxilasa inespecífica (Ruiz-Gayo M., 2008) (figura 11). Una vez sintetizada, la serotonina se almacena en vesículas por el transportador vesicular (VMA T1, 2). Después de ejercer su acción sobre los receptores correspondientes, la serotonina es recapturada por un transportador de membrana específico (SERT) y degradada por la enzima MAO<sub>A</sub>. El producto desaminado, 5hidroxiacetaldehído, es oxidado por una aldehído deshidrogenasa produciendo el metabolito 5-hidroxi indol acético (5HIAA) (Hensler J. G., 2006).



Fig. 11: Representación esquemática de la síntesis de serotonina. Siegel G. J., 2006

La función principal de la serotonina es el mantenimiento del tono basal activador de cerebro. Actúa como un modulador general, de manera directa por la modulación de funciones inhibitorias o indirecta por la activación del sistema GABAérgico (Kalueff A. V., 2007). Este neurotransmisor está implicado en la memoria de trabajo a corto plazo (Hritcu L., 2007) y también modula la neurotransmisión dopaminérgica (Alex K. D., 2007; di Matteo V., 2002). Además, el sistema serotoninérgico influye en la secreción de corticosteroides: existen conexiones sinápticas entre neuronas serotoninérgicas y células secretoras de CRH en el NPV hipotalámico (Lanfumey L., 2008) que sugieren que la 5HT interviene directamente en la respuesta al estrés; en el hipocampo la serotonina aumenta los niveles de expresión de receptores GR (Lee J. H., 2007).

El principal centro serotoninérgico lo constituyen los núcleos del rafe, que están situado en el tronco encefálico y consta de nueve grupos celulares (B1-9) (Hensler J. G., 2006; Herlenius E., 2004) de los que parten vías serotoninérgicas ascendentes y descendentes (figura 12).

Las vías descendentes parten de los grupos B1-B4, de localización caudal, y se dirigen a la médula espinal (Charnay Y., 2010). Las vías ascendentes parten de los grupos B6- B9:

- Desde los núcleos B6 y B7 parte la vía ascendente dorsal, que emite proyecciones hacia el estriado (que regulan de la actividad motora), hacia la corteza (relacionadas con los comportamientos agresivos), hacia el hipotálamo (que intervienen en la regulación del comportamiento sexual) y al cerebelo y tálamo (que regulan el sueño) (Hensler J. G., 2006).
- Desde los núcleos B8 y B9 parte la vía ascendente ventral que inerva principalmente el hipotálamo y regiones del sistema límbico como el hipocampo, el septo y la amígdala, donde la 5HT regula funciones neuroendocrinas y comportamentales (Hensler J. G., 2006).

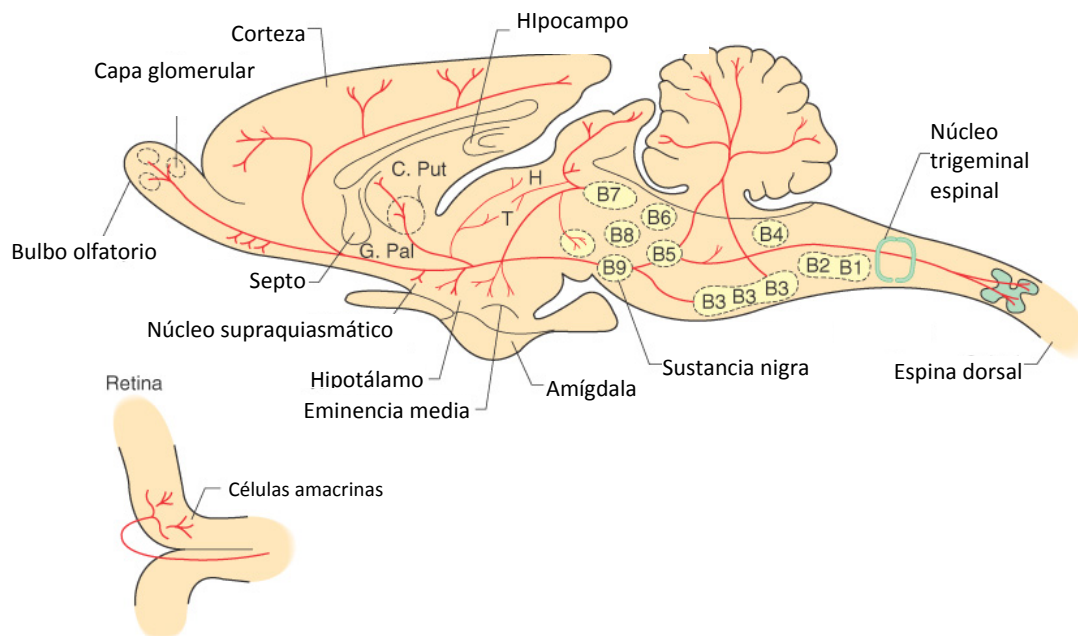


Fig. 12: Representación esquemática de las principales vías serotoninérgicas. Siegel G. J., 2006

La serotonina puede unirse a receptores ionotrópicos y metabotrópicos (*Herlenius E., 2004*).

Los receptores ionotrópicos son los 5HT3 y regulan la apertura de canales de cationes monovalentes induciendo una rápida despolarización de la membrana (*Van Hooft J. A., 2003*). Se localizan en el hipocampo, corteza entorrinal, amígdala y en el núcleo del tracto solitario.

Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y pueden ser inhibidores (5HT1 y 5HT5) o activadores (5HT2, 5HT4, 5HT6, 5HT7). Todos se distribuyen ampliamente por el sistema nervioso central y se encuentran principalmente en la corteza cerebral, estriado, hipotálamo, hipocampo, amígdala, septo, tubérculos olfatorios y núcleos del rafe. A través de la activación de estos distintos tipos de receptores, la serotonina regula el sistema dopaminérgico (*Alex K. D., 2007; di Matteo V., 2002*).

Hay diferentes receptores de serotonina implicados en la respuesta al estrés, y de hecho, la expresión de los receptores de serotonina 5HT1 y 5HT6 en el hipocampo está regulada por la concentración de glucocorticoides, por lo que su variación también altera la expresión de estos receptores (*Lee J. H., 2007*). La activación del receptor 5-HT1A produce un incremento de los niveles de ACTH. Los receptores 5-HT2C, localizados por ejemplo en interneuronas GABAérgicas en el núcleo del rafe y el ATV (*Liu R., 2000*), podrían formar parte de un mecanismo de retroalimentación negativa indirecta que regula la actividad de los sistemas monoaminérgicos durante el estrés, de forma que su activación produce una disminución de la tasa de disparo de serotonina y dopamina (*Lanfumey L., 2008*).

### 2.3.3 ONTOGENIA DE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS

Las neuronas dopaminérgicas comienzan a diferenciarse y ser funcionales en el periodo embrionario, a partir del día embrionario 14 (E14) (*Herlenius E., 2004*), y la enzima TH, que se localiza junto con la DA en los conos de crecimiento de las neuronas, comienza a expresarse también en este periodo, desde E12 (*Fujita M., 1993*). La DA tiene un importante papel en los procesos neurotróficos y de sinaptogénesis, interviene en el crecimiento y motilidad del cono de crecimiento a través de los receptores D1 (*Sapolsky R., 2003*) y en establecimiento de circuitos funcionales a través de receptores D2 (*Jung A. B., 1996*). La distribución y morfología de las neuronas del sistema dopaminérgico alcanzan la distribución adulta en el momento del nacimiento, aunque las conexiones con los diferentes núcleos no se establecen definitivamente hasta la segunda semana postnatal; durante estas dos primeras semanas de vida el número de neuronas se incrementa (*Herlenius E., 2004*).

Las glucocorticoides intervienen en el desarrollo postnatal de las neuronas serotoninérgicas en el tronco encefálico (*Siegel G. J., 2006*). La ontogenia del sistema serotoninérgico en rata se divide en tres periodos (65): elongación inicial del axón, desarrollo de vías selectivas y desarrollo del campo de terminales. Las proyecciones serotoninérgicas aparecen y se desarrollan en el periodo prenatal desde el día E13 (*Parés-Herbuté N., 1989*) y su crecimiento es un proceso secuencial y continuo. Sin embargo las distintas vías de transmisión se organizan entre los días E16-21 (*Lidov H. G., 1982*) y el desarrollo de la inervación terminal se produce a tiempos y ritmos distintos en cada región cerebral, continúa tras el nacimiento (*Herlenius E., 2004*) y se prolonga hasta la cuarta semana de vida postnatal (*Hedner T., 1980*). Las neuronas serotoninérgicas influyen en el desarrollo de las neuronas sobre las que se proyectan (*Chaouloff F., 1993*). Durante el desarrollo postnatal, la serotonina está implicada en la regulación de la maduración de determinadas áreas cerebrales (*Vicentic A., 2006; Whitaker-Azmitia P. M., 2001*), interviene en procesos de neurogénesis, mielinización y desarrollo sináptico. Además participa en la maduración y autorregulación del desarrollo de sus propias neuronas (*Herlenius E., 2004; Whitaker-Azmitia P. M., 2001*).

## 2.4 ESTEROIDES NEUROACTIVOS

Además de los glucocorticoides, en el periodo perinatal hay otros esteroides que intervienen en el desarrollo cerebral: los esteroides gonadales y neuroesteroides. También son derivados del colesterol, y su biosíntesis comienza con la formación de pregnenolona (figura 13). La pregnenolona puede metabolizarse dando lugar a dehidroepiandrosterona (DHEA), o puede formar progesterona por acción de la  $3\beta$ hidroxiesteroide dehidrogenasa (HSD). La progesterona principalmente se reduce irreversiblemente por la  $5\alpha$ reductasa a  $5\alpha$ dihidroprogesterona, que a su vez se metaboliza por la enzima  $3\alpha$ hidroxiesteroide dehidrogenasa ( $3\alpha$ HSD) en el neuroesteroide alopregnanolona, pero puede seguir una ruta biosintética diferente y transformarse en androstenediona, que a su vez da lugar a la testosterona que tras un proceso de aromatización forma estradiol (Mellon S. H., 2007).

Ambos tipos poseen una acción dual en el cerebro a través de la modulación de los diversos sistemas de neurotransmisión (Mendez-López M., 2009); durante el desarrollo intervienen en el proceso de maduración, y en la edad adulta modulan la actividad neuronal (Mendez-López M., 2009).

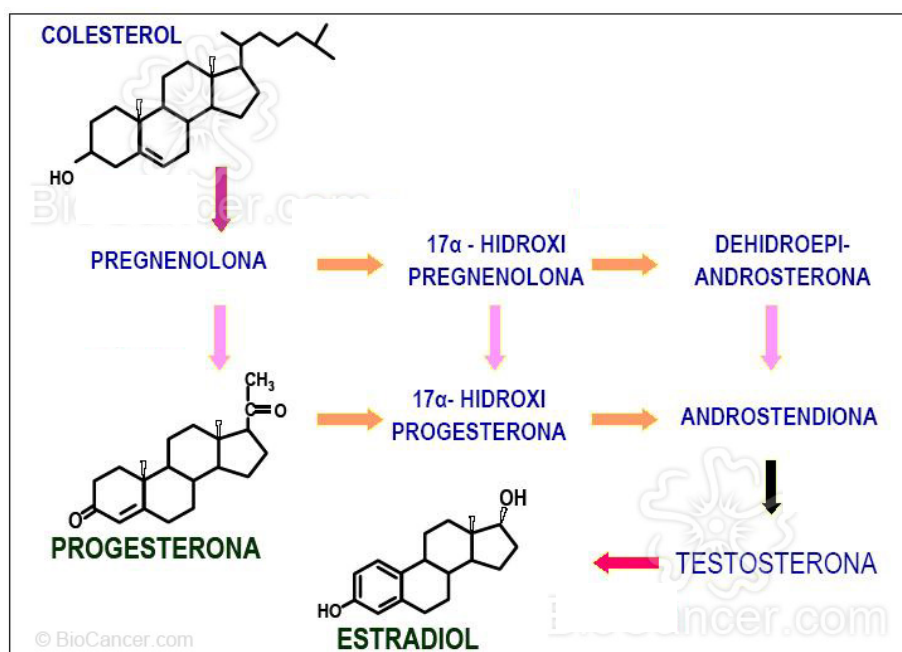


Fig. 13: Representación esquemática de la síntesis de los distintos esteroides a partir de colesterol. ©BioCancer.com.

En el proceso de maduración, tienen lugar la organización y la diferenciación sexual del cerebro, que suponen cambios anatómicos y funcionales en los sistemas de neurotransmisión que implican la diferenciación de diversas respuestas neuroendocrinas y comportamentales relacionadas con las conductas sexuales y reproductoras (Palanza P., 2001). La diferenciación sexual comienza poco antes del nacimiento, el día E18, y continúa hasta el día PN 7-10 (Davis A. M., 2000; Lenz K. M., 2012). En este proceso intervienen los esteroides sexuales testosterona y estradiol, procedentes de la síntesis adrenal y gonadal (Palanza P., 2001). Los esteroides sexuales poseen sitios de unión no sólo en áreas cerebrales implicadas en el comportamiento sexual, sino también en la corteza, amígdala, adenohipófisis, septo lateral e hipocampo (Sutcliffe J. S., 2007).

La diferenciación sexual ocurre por cambios en la expresión de la enzima aromatasa y en la secreción de testosterona. Esta enzima comienza a expresarse antes del nacimiento y alcanza su concentración máxima los días PN 3-4, a partir de los cuales decrece hasta alcanzar los niveles típicos del adulto (Colciago A., 2005). La aromatasa se expresa, en mayor cantidad en machos que en hembras, en regiones cerebrales directamente implicadas en el comportamiento sexual, como el área preóptica y el hipotálamo mediobasal (Colciago A., 2005), pero también se encuentra en el sistema límbico, la corteza y la hipófisis y en áreas como la amígdala y el hipotálamo, donde presenta una diferencia de actividad dependiente del sexo (Lenz K. M., 2012).

En los últimos días de gestación (E16-18) comienza en los machos una producción elevada de testosterona que continúa en los primeros días de vida, incrementándose la síntesis de estrógenos en la etapa perinatal (Colciago A., 2005; Schwarz J. M., 2008). La testosterona alcanza el cerebro como prohormona y ejerce su efecto tras convertirse en estradiol por acción de la aromatasa. El estradiol es el responsable de la masculinización del cerebro, porque favorece la generación de comportamientos sexuales específicamente masculinos, y de la defeminización del mismo, porque evita la formación de comportamientos femeninos (Colciago A., 2005; Schwarz J. M., 2008; Lenz K. M., 2012). Durante el periodo perinatal, la síntesis de estradiol depende de la secreción de testosterona, y su ausencia induce la feminización por defecto del cerebro. Para evitar la masculinización del cerebro de las hembras, durante el periodo prenatal su cerebro está protegido del estradiol materno por la presencia de la alfa-fetoproteína que secuestra las hormonas gonadales evitando que atraviesen la barrera hematoencefálica (Schwarz J. M., 2008; Lenz K. M., 2012). La concentración de estradiol y testosterona varía entre las diferentes regiones cerebrales y no se relaciona directamente con los niveles de hormonas plasmáticas (Lenz K. M., 2012).

El estradiol reduce la síntesis de catecolaminas por disminución de la expresión de la TH y además inducen la disminución tanto del número de receptores de DA como la sensibilidad de los mismos. La testosterona también tiene un efecto inhibitorio sobre el sistema dopaminérgico, induce la disminución de la concentración de DA y su tasa de recambio. En el hipotálamo, las hormonas sexuales median la diferenciación del sistema serotoninérgico.

La actividad del eje HHA también está afectada por la presencia de esteroides sexuales, así como la afinidad de los receptores de glucocorticoides (Turner B. B., 1992). Los estrógenos potencian la actividad del eje HHA (Catalani A., 2011; Sutcliffe J. S., 2007; Weiser M. J., 2009): aumentan el pico de corticosterona y la liberación de ACTH inducido por estrés, aumentan la actividad neuronal e inhiben la retroalimentación negativa del eje HHA (Weiser M. J., 2009). Los andrógenos, por el contrario, la inhiben (Sutcliffe J. S., 2007).

Además, el estradiol afecta la capacidad de unión de los receptores MR de manera diferente según la dosis y los andrógenos regulan la expresión de MR, GR pero no alteran su capacidad de unión (Catalani A., 2011).

Los esteroides no gonadales, sintetizados en el cerebro, aparecen antes del nacimiento, y en el periodo perinatal su función está relacionada con el desarrollo. Actúan como neuroprotectores, intervienen en el crecimiento neuronal y son neuromoduladores de los sistemas aminoacídicos. Su síntesis, aunque diferente en el cerebro maduro, continúa a lo largo de la vida del animal. Las enzimas esteroideogénicas se distribuyen en el cerebro en áreas como la corteza, amígdala, el hipocampo, tálamo, hipotálamo, estriado y cerebelo (Mellon S. H., 2007).

La pregnanolona, DHEA y sus metabolitos sulfatados fueron los primeros neuroesteroides identificados. La pregnanolona actúa como modulador positivo de los receptores GABA<sub>A</sub>; por el contrario, su metabolito sulfatado, la pregnanolona sulfatada, es un neuroesteroide excitador que actúa como modulador negativo de los receptores GABA<sub>A</sub> inhibiendo la entrada de Cl<sup>-</sup> y disminuyendo la frecuencia de apertura del canal; además regula negativamente el receptor AMPA de glutamato y es modulador positivo del receptor NMDA (Mellon S. H., 2007).

La DHEA interviene en el crecimiento de las neuritas, promueve la neurogénesis y disminuye la apoptosis (*Zhang L., 2002; Mellon S. H., 2007*). Su neuroesteroidogénesis depende de la actividad del receptor NMDA y ejerce un papel neuroprotector frente al glutamato en parte a través de la inhibición de NOS tras la estimulación del receptor NMDA. En células simpatoadrenales activa la liberación de dopamina (*Mellon S. H., 2007*).

La progesterona se une a un receptor nuclear a través del cual estimula la mielinización y la diferenciación de oligodendrocitos (*Mellon S. H., 2007*). Además, la progesterona y sus metabolitos son inhibidores de la actividad del eje (*Sutcliffe J. S., 2007*). En el adulto la progesterona disminuye la afinidad de MR en el hipocampo (*Catalani A., 2011*).

La alopregnanolona actúa a través de los receptores GABA<sub>A</sub> incrementando su frecuencia y duración de apertura (*Kelly S. J., 1999; Mellon 2007*). Tiene efectos neuroprotectores: incrementa la neurogénesis y estabiliza las sinapsis, y específicamente en el hipocampo, aumenta la proliferación de células progenitoras y estimula la neurogénesis de células granulares. Su síntesis se incrementa en el cerebro desde el día PN7 (*Grobin C., 2006*).

La progesterona y alopregnanolona se sintetizan principalmente en neuronas glutamatérgicas piramidales y GABAérgicas estriatales, es decir, en neuronas aferentes, no interneuronas, en la corteza, tálamo, hipocampo, estriado y cerebelo (*Mellon S. H., 2007*).

### 3 PROCESOS COGNITIVOS: MEMORIA DE RECONOCIMIENTO

La memoria se define como *el proceso neural por el que un individuo identifica un estímulo conocido previamente*; está basada en el reconocimiento, que a su vez se define como el resultado comportamental de este proceso. Por esto, las pruebas usadas para estudiar la memoria de reconocimiento se basan en el principio general de coincidencia, donde cada ensayo consta típicamente de tres fases: una de muestra, una de retraso (o intervalo de retención) y una de elección (o fase de comparación). En la primera fase se presenta un estímulo y el individuo almacena información acerca de él, la retiene durante el intervalo de retención, y en la fase de comparación se encuentra con una serie de estímulos que debe elegir y comparar con la información previamente almacenada. Es importante la distinción de dos tipos de memoria: la memoria no espacial o de reconocimiento propiamente dicha y la memoria espacial, que implica una representación espacial de los estímulos reconocidos. En lo referente a la duración de la capacidad de reconocimiento, se puede distinguir entre memoria a corto y largo plazo (*Steckler T., 1998*).

El concepto de reconocimiento espacial surge de la expresión natural de la curiosidad y representa la necesidad de adquisición de información cuando un sujeto se encuentra en un nuevo entorno con nuevos estímulos. Este tipo de reconocimiento cuenta al menos con dos dimensiones: la del espacio corporal (egocéntrica), que incluye la localización de estímulos físicos, de la posición de determinadas partes, etc., y la del espacio (alocéntrica). Por este motivo desde hace más de un siglo los dispositivos más empleados en el estudio de la memoria espacial son los laberintos. Para realizar pruebas en ellos los animales tienen restringido el acceso a agua o comida, que se emplean como refuerzo, de tal manera que la asunción de resolución está basada en el principio comportamental de que éstos deben aprender y recordar la localización de pistas, en términos de señales visuales-espaciales, que les provean de alimento (*Carrillo-Mora P., 2009*).

Puesto que la memoria espacial es la que permite la interacción del individuo con su entorno, es una función cognitiva ampliamente estudiada. La memoria espacial se define como la función cerebral responsable del reconocimiento, codificación, almacenamiento y recuperación de información espacial acerca de la disposición de los objetos en rutas específicas (*Kessels R. P. C., 2001; Carrillo-Mora P., 2009*). Para ello se establecen diferencias entre los procesamientos a corto plazo de la memoria activa (memoria espacial de trabajo) y el almacenamiento a largo plazo de la localización espacial (memoria espacial de referencia). La memoria espacial de trabajo es un

sistema que permite el almacenamiento temporal de una limitada cantidad de información espacial y la mantiene disponible para un acceso inmediato. Alternativamente, esta información puede ser usada para otros procesos cognitivos (*Moscovitch M., 2005; Carrillo-Mora P., 2009*). Por otra parte, el sistema de memoria espacial de referencia, propuesto por primera vez por Olton en 1979, alude al tipo de procesamiento de memoria involucrado en la obtención de información espacial sobre varias pruebas. Por contraste con la memoria espacial de trabajo, la memoria espacial de referencia exhibe mayor capacidad, duración y resistencia a las interferencias (*Carrillo-Mora P., 2009*).

### 3.1 MECANISMOS CELULARES DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

A nivel molecular, el modelo de formación de memoria está constituido por la potenciación a largo plazo (*Long-Time Potentiation, LTP*). El mecanismo celular de LTP consiste en una facilitación de la despolarización de la membrana cuando la activación de receptores AMPA y NMDA es persistente. Cuando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona se mantiene, la activación de receptores NMDA es más rápida porque no hay bloqueo por  $\text{Mg}^{2+}$ , y a largo plazo se activan mecanismos celulares de síntesis de nuevos receptores AMPA que a su vez facilitan la despolarización, prolongándose así la excitación neuronal (*Bliss T., 1996*).

En la inducción de la LTP es fundamental la activación del receptor NMDA. En una primera fase, el calcio que entra a través del receptor NMDA se une a la proteína kinasa calmodulina II (CaMKII), que es el mediador clave en la formación de la memoria (*Wang H., 2006*). Esta proteína produce una activación del receptor NMDA aumentando la conductancia del canal e induciendo la inserción sináptica de receptores AMPA, de manera que es responsable de la potenciación de la sinapsis. Estas modificaciones mediadas por la CaMKII tras la activación de receptores NMDA pueden mantenerse de 1 a 3 horas, periodo de tiempo denominado fase temprana de la LTP (*early-LTP, E-LTP*). Tras este tiempo, es necesario el mantenimiento de la LTP para la consolidación de la memoria (*del Olmo N., 2003*), y para ello tiene lugar una fase tardía (*Late-LTP, L-LTP*) que requiere la síntesis de nuevas proteínas (*Wang H., 2006*). Esta L-LTP fue descrita por primera vez en 1988 (*Frey U., 1998; Wang H., 2006*).

La consolidación de la memoria implica una serie de modificaciones sinápticas mediadas por receptores NMDA para reforzar los cambios celulares en términos de eficacia sináptica (Frey U., 1998; Gruss M., 2008). Durante la L-LTP se requiere la reactivación de receptores NMDA en un proceso conocido como refuerzo sináptico de reentrada (SRR, *synaptic reentry reinforcement*) (Wang H., 2006) que resulta en un intercambio metabólico de receptores sinápticos que permite el establecimiento a largo plazo de la memoria.

En la formación de la memoria cabe destacar el papel de la taurina que interviene a través de un mecanismo de potenciación de larga duración de potenciales sinápticos excitadores conocido como LLP<sub>TAU</sub> (*Long-Lasting Potentiation*) (del Olmo N., 2000a). La taurina está asociada a terminales glutamatérgicos (Torp R., 1992), donde modula los receptores NMDA presinápticos, disminuyendo los potenciales de acción facilitando la excitabilidad axónica en el hipocampo, de modo que induce cambios de larga duración en la eficacia sináptica (del Olmo N., 2000a). La taurina actúa marcando las sinapsis de los terminales a los que se asocia, de manera que si se activan receptores NMDA, activa una vía de señalización durante un periodo de tiempo en el que tiene lugar la LLP<sub>TAU</sub> (del Olmo N., 2003). Esta LLP<sub>TAU</sub> es similar al mecanismo implicado en la SRR inducida por estimulación sináptica, es dependiente de calcio y requiere la síntesis de proteínas (del Olmo N., 2000a), por lo que la taurina induce también la conversión de E-LTP en L-LTP favoreciendo la consolidación de la memoria (del Olmo N., 2000a, 2003; Suárez L. M., 2013). Este tipo de potenciación requiere un proceso de recaptura de taurina (Suárez L. M., 2013) como el observado en las espinas dendríticas del hipocampo (del Olmo N., 2003). La taurina también puede inducir LLP<sub>TAU</sub> de manera independiente de la activación de receptores NMDA (Suárez L. M., 2013).

Otras moléculas neuromoduladoras como el NO, la noradrenalina o el factor neurotrófico derivado del cerebro contribuyen a la coordinación de las diferentes vías de señalización implicadas en el paso de E-LTP a L-LTP (Suarez L. M., 2013). El NO, por su función de mensajero retrógrado estimula los receptores NMDA (Bliss T., 1996; Ignarro L. J., 2000) facilitando el SRR.

Además de la activación de receptores NMDA, los receptores dopaminérgicos también estimulan el proceso de formación de LTP (Jay T. M., 2003); en concreto, la co-activación de receptores D1 de dopamina y NMDA facilitan la consolidación de la memoria. Otros receptores como los  $\beta$ -adrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos también están implicados en la formación y consolidación de la memoria (Suarez L. M., 2013).

El proceso de LTP tiene lugar fundamentalmente en el hipocampo (*Bliss T., 1996; Kosten 2007a*), por lo que esta región cerebral está relacionada directamente con los procesos cognitivos. En esta región tienen lugar los procesos de plasticidad sináptica (*Herlenius E., 2004; Pickering C., 2006*), fundamentales en el aprendizaje y la memoria. Además su anatomía y fisiología se reestructuran en función del entorno: la proliferación de precursores de células granulares, la diferenciación dendrítica, la formación axónica y la sinaptogénesis son diferentes procesos dinámicos que se pueden alterar por las experiencias postnatales (*Gould E., 1999, 2000*).

Pero la memoria es una compleja red de funciones interrelacionadas que trabajan de forma conjunta para administrar información, y de hecho en la memoria de reconocimiento de la rata intervienen varios tipos de información somatosensorial: visual, auditiva y olfativa (*Steckler T., 1998*). Por esto, la memoria no es una entidad única que depende exclusivamente del hipocampo, sino que esta compuesta por múltiples sistemas hipocampales y no-hipocampales (*Schwabe L. 2012*). Las proyecciones que llevan la información de los diferentes estímulos somatosensoriales implicados en la memoria de reconocimiento convergen principalmente en la corteza rinal (perirrinal y entorrinal) y el hipocampo. El hipocampo, subiculum y la corteza entorrinal proyectan directamente a la corteza prefrontal, y ésta a los ganglios basales (*Rossato J. I., 2007; Steckler T., 1998*).

A pesar de estas convergencias, los sistemas neurales que median la memoria espacial y no espacial no son los mismos (*Gallo A., 2002; Steckler 1998*), y pueden establecerse dos redes neurales diferentes implicadas en el procesamiento de la información necesaria para cada una de ellas.

En el caso de la memoria no espacial, la capacidad de responder diferencialmente a la familiaridad o novedad de los objetos no está directamente relacionada con el hipocampo (*Steckler T., 1998*). Es la corteza rinal la estructura de la que depende el reconocimiento durante los primeros minutos que siguen a la presentación de un objeto (*Abe H., 2004; Ennaceur A., 1997; Galani R., 1998*). Además, la corteza prefrontal, aunque no está directamente implicada con el procesamiento de la memoria de reconocimiento, contiene algunas regiones, como la corteza prefrontal medial, cuyas lesiones si afectan a la memoria no espacial (*Ennaceur A., 1997; Steckler T., 1998*).

En el caso del reconocimiento de las relaciones espaciales, el hipocampo es la principal estructura implicada (Aggleton J. P., 2004; Bliss T., 1996; Cassel J. C., 1998; Galani R., 1998; He J., 2002; Kosten T., 2007a) y su papel en el procesamiento de la memoria es la discriminación espacial (Gilbert P. E., 1998; Steckler T., 1998). Esta región cerebral es importante para la integración y organización de aspectos específicos en escenas o referencias espaciales, pero no es el lugar donde se almacena la memoria para estos aspectos. El hipocampo está involucrado en la consolidación de la adquisición y codificación inicial de información así como en la utilización y recuperación de la misma, procesos que requieren una representación espacial, pero no en el almacenamiento y retención de la información que es relevante para el reconocimiento espacial (Steckler T., 1998). Por esto, las lesiones en el hipocampo no afectan a la capacidad de reconocimiento de objetos familiares pero impiden el reconocimiento de un cambio de ubicación de los mismos (Ennaceur, 1997; Steckler 1998). El hipocampo está citoarquitectónicamente dividido en diferentes partes: el giro dentado, CA3, CA1 y el subiculum. Estas regiones están conectadas por proyecciones unidireccionales con la corteza entorrinal, que incluyen una vía que conecta en serie la corteza entorrinal, el giro dentado, CA3 y CA1, y vías que conectan la corteza entorrinal con CA1 y CA3. El giro dentado es importante para la codificación de la información espacial tanto de trabajo como de referencia (Okada K., 2009); CA3 es crítico en los procesos de memoria de trabajo y la consolidación o recuperación de la memoria a largo plazo (Coburn-Litvak P. S., 2003) y CA1 es importante para la consolidación o recuperación de la memoria a medio plazo, aunque entre estas regiones existe una cooperación funcional (Okada, 2009). La formación del giro dentado se inicia durante la gestación y continúa en el periodo postnatal (Kosten T., 2007a). En roedores, alrededor del 85% de la neurogénesis de las células granulares del hipocampo ocurre en la etapa postnatal temprana, aunque el número total de células se incrementa a lo largo del primer año de vida. El pico de producción máxima de estas neuronas ocurre entre los días PN 5-7 y se desarrollan y extienden sus axones, las fibras musgosas, entre los días PN 1-21. Los periodos predominantes de desarrollo dendrítico y sináptico en el giro dentado ocurren entre los días postnatales 4-12 y 11-25 respectivamente (Gould E., 1999); después, la sinaptogénesis sigue incrementando durante los días PN25-60 y a continuación disminuyen hasta alcanzar los niveles del adulto alrededor del día PN100 (Andersen S. L., 2004).

En los procesos de codificación de información espacial hay otras áreas implicadas por su relación con el hipocampo, como la amígdala (Cammarota M., 2008), la corteza prefrontal (Horst N. K., 2009) y los ganglios basales (Schwabe L., 2012; Steckler T., 1998) (figura 14).

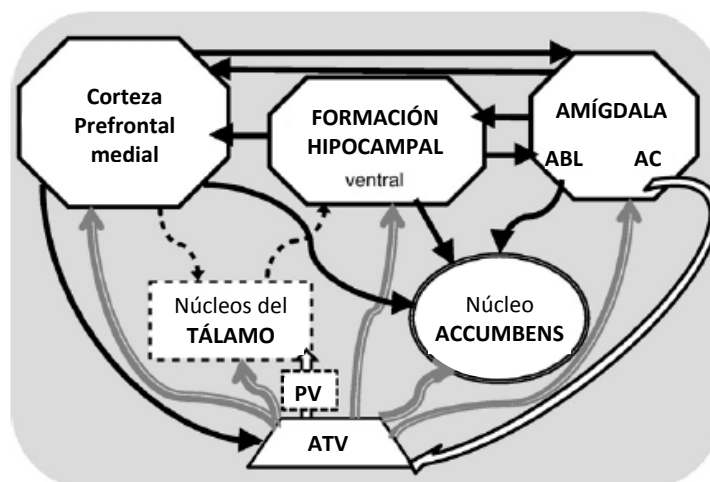


Fig. 14. Representación esquemática de los principales circuitos cerebrales involucrados en el aprendizaje y la memoria. Las flechas grises representan proyecciones dopaminérgicas; las flechas negras representan proyecciones glutamatérgicas; las flechas blancas representan proyecciones GABAérgicas; las flechas de trazo discontinuo representan las vías indirectas desde la corteza prefrontal hacia el hipocampo. ABL: amígdala basolateral; AC: núcleo central de la amígdala; PV: pallidum ventral; ATV: área tegmental ventral. McCormick y Mathews 2010.

A pesar de que la amígdala está involucrada en el almacenamiento de recuerdos condicionados al miedo (Schwabe L., 2012), y que no interviene en la capacidad de responder diferencialmente a la familiaridad o novedad de los objetos ni está directamente implicada en la capacidad de reconocimiento espacial (Steckler T., 1998), en lo concerniente a la memoria espacial actúa como un modulador que modifica procesos de memoria en otras áreas cerebrales (Cammarota M., 2008; Schwabe L., 2012). El complejo amigdalino es responsable de la consolidación y evocación de la memoria emocional (memoria inconsciente relacionada con los estados emocionales) mientras que el hipocampo es responsable de estos procesos en la memoria consciente. A través de procesos dependientes de glucocorticoides, la amígdala basolateral afecta la función hipocámpal (Kim J. J., 2001; Korz V., 2005; Schwabe L., 2012). De manera indirecta, la amígdala también está relacionada con el hipocampo a través de conexiones funcionales con otras áreas cerebrales como la corteza prefrontal (Cammarota M., 2008; Roozendaal B., 2002; Schwabe L., 2012) y el núcleo caudado de los ganglios basales (Cammarota M., 2008).

La corteza prefrontal prelímbica, por su relación con el hipocampo, está implicada en la memoria espacial (Gisquet-Verrier P., 2006), así como la corteza prefrontal medial, que interviene fundamentalmente en la capacidad de respuesta espacial egocéntrica (Steckler T., 1998) y la recuperación de la información temporal (Hannesson D. K., 2004). En el caso de los ganglios basales, además de la función motora que tienen asociada, algunas de sus regiones están implicadas en el reconocimiento espacial (Schwabe L., 2012) y regulan la actividad del hipocampo en el procesamiento de la memoria (Cammarota M., 2008), como el núcleo accumbens del núcleo caudado (Steckler T., 1998), que regula la actividad del hipocampo a través del septo (Beck K. D., 2010).

## 4 EFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA EN LOS PROCESOS NEUROBIOLÓGICOS QUE SUBYACEN A LA MEMORIA

Durante años se han descrito diversas alteraciones de las capacidades cognitivas como consecuencia del estrés (*Schwabe L., 2012*). Los glucocorticoides tienen un efecto bifásico en la modulación de los procesos de aprendizaje y memoria que dependen de su concentración en plasma. Un incremento pasajero de los glucocorticoides circulantes facilita la consolidación de la memoria (*Roozental B., 2000*); sin embargo esta consolidación está dificultada si el aumento es mantenido (*Bodnoff S. R., 1995; Roozental B., 2002*) y resulta en alteraciones en el aprendizaje y la memoria a largo plazo. Estos procesos también se modulan en función del balance de ocupación de los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides. En roedores, la activación de receptores MR está asociada a procesos de integración de la información sensorial y ejecución de respuestas comportamentales adecuadas; los GR, sin embargo, están involucrados en la consolidación de la información aprendida de novo y en la eliminación de respuestas (*Ladd O. C. 2004*) (figura 15). Muchas de las consecuencias del estrés están mediadas por la activación exagerada de receptores GR (*Aisa B., 2007; de Kloet E. R., 1998; Oitzl M. S., 2010*). El incremento de corticosterona resulta en un incremento de aminoácidos excitatorios que puede inducir muerte neuronal (*Lephart E. D., 1999; Moghaddam B., 1994*), por lo que la activación prolongada de receptores de glucocorticoides induce a largo plazo una disminución de la excitabilidad sináptica (*Abrahám I., 1996*).

Como hemos visto anteriormente, la organización del eje HHA se encuentra influenciada por el entorno de corticosteroides en las primeras etapas de la vida y su regulación es extremadamente sensible a las experiencias adversas tempranas. El estrés que produce la separación materna supone un incremento de la secreción de glucocorticoides (Dent G. W., 2000; Huot R. L., 2002). También induce un aumento de la relación entre receptores de mineralocorticoides y de glucocorticoides, por lo que las ratas que han sufrido esta forma de estrés postnatal no sólo disminuyen la retroalimentación negativa del eje HHA y con ella su inhibición reactiva (Aisa B., 2007), sino que presentan potenciada la facilitación, lo que resulta en una exageración de la respuesta endocrina al estrés. Un incremento de la actividad del eje HHA en animales neonatos supone la supresión de la acción protectora del SHRP (Slotten H., 2006); por ello la separación materna provoca una sensibilización del eje HHA que a largo plazo es la causa de una hipersensibilidad al estrés en los animales que la han sufrido (Aisa B., 2007; Daniels W. M. U., 2004; Huot R. L., 2004).

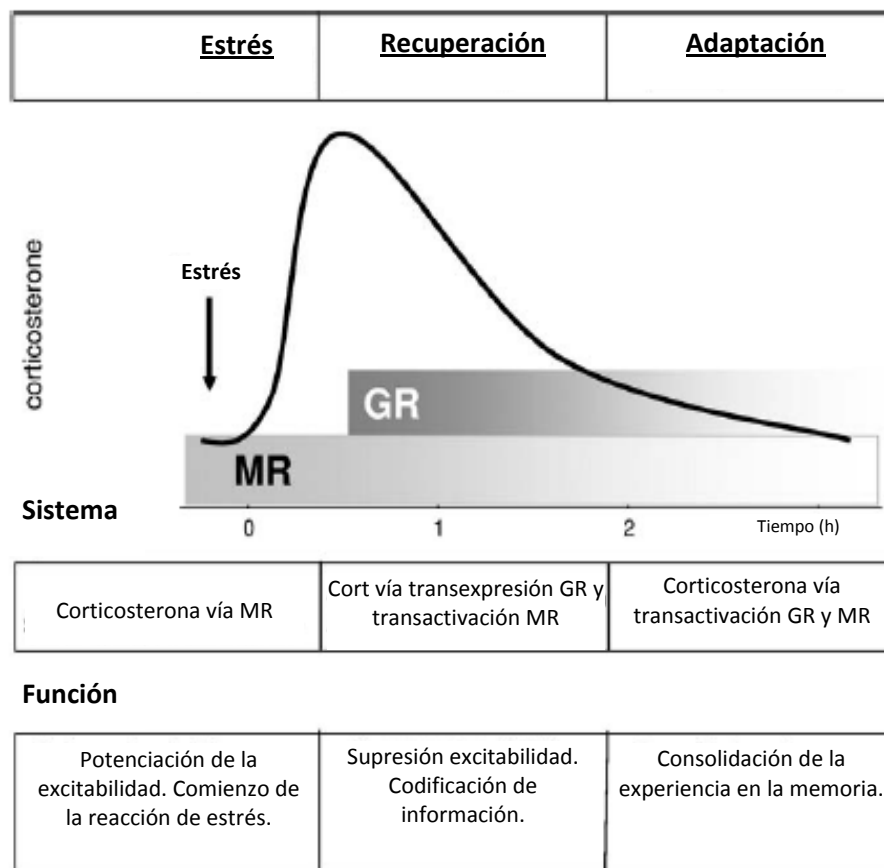


Fig. 15: Representación esquemática de las diferentes fases en la reacción al estrés y adaptación basada en el patrón de secreción de corticosterona y la activación de receptores de mineralocorticoides (MR) y glucocorticoides (GR). Oitzl 2010.

Además de la actividad del eje HHA, la separación materna altera la expresión de proteínas de unión a calcio en áreas cerebrales implicadas en la respuesta al estrés. En las interneuronas GABAérgicas del hipotálamo (*Giachino C., 2007; Lephart E. D., 1999*) y de la corteza prefrontal (*Helmeke C., 2008*) se puede observar una disminución de proteínas enlazantes de calcio, sin embargo, en el hipocampo y la amígdala la separación materna induce un incremento de las mismas (*Giachino C., 2007; Lephart E. D., 1999*). Estas variaciones indican alteraciones en la regulación de la actividad del eje HHA (*Lephart E. D., 1998*).

Puesto que los glucocorticoides intervienen en el desarrollo postnatal del cerebro, el estrés sufrido durante el SHRP interfiere en la ontogenia de los distintos sistemas de neurotransmisión en diversas regiones cerebrales, induciendo cambios en los procesos cognitivos (*Kauffman J., 2000; Marmendal M., 2006*).

Por su elevada densidad de receptores para ellos, el hipocampo es una región especialmente sensible a las variaciones de glucocorticoides (*Andersen S. L., 2004*), y está descrito que esta región cerebral interviene en la regulación del eje HHA (*Bratt A. M., 2001; Kudielka B. M., 2005*). Las ratas que han sufrido separación materna presentan alteraciones estructurales y funcionales en el hipocampo (*Oreland S., 2010; Schwabe L., 2012*) que dificultan tanto el control de la actividad del eje (*Bratt A., M., 2001*) HHA como el mecanismo de LTP (*Dubrovsky B., 1990; Kosten T., 2007a*). El hipocampo es especialmente sensible a las variaciones de glucocorticoides durante la etapa postnatal temprana, porque el periodo de máxima producción de células granulares, expansión de fibras musgosas y desarrollo sináptico en el giro dentado coincide con el SHRP (*Gould E., 1999*). Los glucocorticoides regulan negativamente la proliferación de células en el giro dentado (*Gould E., 1999; McEwen B. S., 1986*), la expansión axónica, la ramificación neuronal, mielinización, desarrollo de espinas dendríticas y la sinaptogénesis (*Andersen S. L., 2004; Bagot R. C., 2009*). La separación materna, además, produce una disminución de la superproducción de sinaptogénesis observada en los animales control entre los días PN25-60 (*Andersen S. L., 2004*). Estas alteraciones se acompañan de varias disfunciones en las tareas dependientes del hipocampo (*Cirulli F., 2003; Oitzl M. S., 2000; Schwabe L., 2012*), de manera que los procesos cognitivos se ven afectados como consecuencia del estrés postnatal temprano (*Gould E., 1999, 2000*).

Pero el estrés no afecta sólo al hipocampo. Otras regiones cerebrales, por estar relacionadas con el eje HHA, como el septo (*de Kloet E. R., 1998; Díaz Luján V. E., 2008*), y directa o indirectamente con el hipocampo, como la corteza prefrontal (*Díaz-Luján V. E., 2008; Jacobson L., 1991; Schwabe L., 2012*) y el estriado (*Díaz-Luján V. E., 2008; Fone K. C. F., 2008; McCormick C. M., 2002*), se alteran como consecuencia de la separación materna e inducen modificaciones en la formación y consolidación de la memoria independiente del hipocampo (*Roozendaal B., 2000; Schwabe L., 2012*). Las variaciones de glucocorticoides regulan también la actividad de la amígdala (*Karst H., 2002*), y sus efectos son especialmente remarcables en la amígdala basolateral, por la interacción de ésta con otras áreas como el hipocampo y la corteza prefrontal (*Camarota M., 2008; Kudielka B. M., 2005*) y el estriado (*Beck K. D., 2010*). Esta región cerebral posee receptores de glucocorticoides e interviene en procesos de refuerzo emocional y memoria (*Schwabe L., 2012*); las variaciones de corticosterona en esta región interfieren en el paso de LTP temprana a tardía (*Korz V., 2005; Gruss M., 2008*), alterando la plasticidad hipocampal y el almacenamiento de la información (*Zoladz P. R., 2013*).

La formación de la memoria depende del sistema glutamatérgico (*Bliss T., 1996; Gould E., 1999*) y de su interacción con otros sistemas de neurotransmisión. El sistema dopaminérgico está directamente implicado en la memoria de trabajo y en la consolidación de la memoria (*Gurden H., 1999; Herlenius E., 2004; Hotte M., 2005; Suárez L. M., 2013*) y además actúa como regulador de cambios sinápticos en distintas regiones cerebrales (*Jay T. M., 2003*). Los sistemas GABAérgico y serotoninérgico están relacionados entre sí e implicados también en los procesos de aprendizaje y memoria (*Kalueff A. V., 2007*). Las alteraciones en estos sistemas de neurotransmisión debidas a las variaciones en los niveles de corticosterona, son las responsables de los cambios en los procesos cognitivos debidos como consecuencia de la separación materna.

#### 4.1 EFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA EN LOS SISTEMAS NEUROTRANSMISIÓN

La separación materna altera el desarrollo de los sistemas de receptores postsinápticos GABA<sub>A</sub> (McCormick C. M., 2002) que durante el periodo postnatal temprano cambian su funcionalidad (Ben-Ari Y., 1997). Por otra parte, el aumento de la activación de receptores de glucocorticoides en el hipocampo potencia las señales excitatorias hipocampo-septales, incrementando el tono inhibitorio GABAérgico en el núcleo paraventricular (Ladd C. O., 2004), de manera que el estrés postnatal altera el funcionamiento del eje HHA y la neurotransmisión inhibitoria durante las primeras semanas de vida, modificando la ontogenia de los sistemas de neurotransmisión.

Además, en la segunda semana de vida postnatal tiene lugar una superproducción neuronal en áreas como la corteza y el hipocampo (Gould E., 1999; Pickering C., 2006), por lo que éste es un periodo de vulnerabilidad, especialmente para el sistema glutamatérgico. Los receptores de glucocorticoides y determinadas subunidades de los receptores AMPA colocalizan en el 90% de las fibras musgosas de las neuronas del hipocampo (Pickering C., 2006), por lo que la liberación de glutamato está estrechamente ligada a la acción de la corticosterona (Abrahám I., 1996). Un estrés crónico induce un incremento de la expresión de receptores AMPA en el hipocampo, haciendo a esta región particularmente vulnerable a neurotoxicidad (Riaza Bermudo-Soriano C., 2012). Este puede resultar en una muerte selectiva de las neuronas con mayores niveles de receptores de glucocorticoides y por tanto su reducción global (Bellinger F. P., 2006). De hecho, en la edad adulta la densidad de fibras musgosas en el hipocampo está disminuida en ratas que han sido sometidas a separación materna (Huot R. L., 2002), y con ella, la densidad de subunidades GluR1, GluR2 y GluR3 del receptor AMPA (Pickering C., 2006). En esta región cerebral también se produce una disminución de la expresión de las subunidades NR1 y NR2B del receptor NMDA (Bellinger F. P., 2006; Pickering C., 2006). Sin embargo en la corteza prefrontal no se observan cambios en la expresión de las subunidades de estos receptores (Pickering C., 2006).

El aumento de glucocorticoides que supone la separación materna induce un aumento de la expresión de NOS no sólo en el NPV del hipotálamo, sino también en áreas del sistema límbico como el hipocampo y la amígdala. Las variaciones en los niveles de esta enzima implican alteraciones en la regulación del sistema glutamatérgico a través de los receptores NMDA, y dado que el NO contribuye a la formación de la fase tardía de la LTP (Ignarro L. J., 2000), interfieren con los procesos de memoria.

La taurina está relacionada con la formación de la memoria (*del Olmo N., 2000a, 2003*) e interviene, con el mecanismo de LLP<sub>TAU</sub> en el proceso de consolidación de la LTP (*del Olmo N., 2003; Suárez L. M., 2013*), y su concentración se incrementa como respuesta al estrés agudo (*Abrahám I., 1996; Wu, 1998*) y también tras la exposición a un estrés crónico (*Lee J. H., 2007*). La taurina está relacionada con los sistemas GABAérgico (*del Olmo N., 2003*), glutamatérgico y serotoninérgico (*Kong W. X., 2006*), por lo que su alteración como consecuencia del estrés postnatal afecta también a estos sistemas de neurotransmisión. Se ha visto también que la separación materna tiene efectos a largo plazo y sexualmente dimórficos en la concentración de taurina cerebral, que se ha encontrado disminuida en hembras adultas sometidas a separación materna durante las dos primeras semanas de vida (*Leret M. L., 2010a*).

La separación materna resulta en alteraciones a largo plazo en las funciones dopaminérgica (*Brake W. G., 2004*) y serotoninérgica (*Arborelius L., 2007*). La activación de receptores de glucocorticoides induce un incremento de la expresión de la enzima MAO, y con ella la degradación monoaminérgica (*Argüelles S., 2010*).

Este procedimiento experimental induce cambios duraderos en el sistema dopaminérgico de manera que en la edad adulta el incremento de la síntesis de dopamina que se produce en el mesencéfalo, la sustancia nigra y el núcleo accumbens tras la exposición a estrés está mitigado en ratas que han sido sometidas a separación materna (*Brake W. G., 2004; Chocyk A., 2011; Jahng J. W., 2010*). La separación materna también induce un incremento de la actividad dopaminérgica en áreas como el hipotálamo, septo y estriado en la adolescencia por una disminución de los receptores D<sub>2</sub>, atenuando su efecto inhibitorio (*McCormick C. M., 2002; Fone K. C. F., 2008*). Por el contrario, en la corteza prefrontal la falta de cuidados maternos induce una disminución de la función dopaminérgica (*Fone K. C. F., 2008*). La alteración de los sistemas dopaminérgico mesolímbico y mesocortical por las experiencias tempranas adversas afecta a su función de modulación de la formación de la memoria (*Gurden H., 1999*). Además, el estrés postnatal temprano induce modificaciones en los receptores de dopamina (*Mizoguchi K., 2008*) y puesto que la activación de estos receptores estimula la formación de LTP (*Jay T. M., 2003*) la formación de memoria también está dificultada por este motivo.

Las variaciones en los niveles de glucocorticoides, que intervienen en su ontogenia, afectan al desarrollo del sistema serotoninérgico (*Siegel G. F., 2006*). En el núcleo dorsal del rafe, la separación materna induce un incremento de la expresión del transportador de serotonina en la edad adulta (*Gardner K. L., 2009*), además de una disminución de la actividad del sistema serotoninérgico y de la modulación que este núcleo ejerce sobre el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala basolateral (*Matthews K., 2003*).

Además, por su relación con la actividad del eje HHA y la secreción de glucocorticoides, en respuesta a diversos estímulos estresantes la síntesis, liberación y turnover de serotonina varía en diferentes áreas cerebrales (*Gardner K. L., 2005; Lanfumey L., 2008*). Como consecuencia de la separación materna, se han observado variaciones en la concentración de serotonina (*Arborelius L., 2007, Matthews K., 2003, Vicentic A., 2006*) y de su metabolito, el ácido indolacético (*Daniels W. M. U., 2004*) en el hipocampo, la corteza prefrontal, así como en el hipotálamo y la amígdala. Por otra parte, el estrés postnatal también disminuye la densidad de axones serotoninérgicos en regiones cerebrales como el hipocampo y la amígdala (*Kuramochi M., 2009*). En el hipocampo, la disminución de la concentración de serotonina induce una disminución de receptores GR y por tanto una disfunción en la actividad del eje HHA (*Lee J. H., 2007*).

Con respecto a los efectos del estrés postnatal temprano en los neuroesteroides, la variación de los niveles de corticosterona modifica la actividad de la aromatasas cerebral, de modo que se altera la síntesis de neuroesteroides y con ella la organización del cerebro durante el periodo postnatal, ya que los esteroides neuroactivos intervienen en la transmisión GABAérgica (*Kelly S. J., 1999*). También están relacionados con los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos (*Mellon S. H., 2007*). La secreción de neuroesteroides se incrementa tras la separación materna, y la variación de sus niveles afecta a los procesos de aprendizaje y memoria (*Korol D. L., 2004; Sutcliffe J. S., 2007*).

En lo concerniente a las alteraciones que induce el estrés postnatal temprano en la respuesta al estrés y en los distintos sistemas de neurotransmisión a largo plazo, los distintos análisis muestran mayoritariamente conclusiones similares. Los resultados de diversos estudios sugieren que son suficientes unas horas de separación materna para alterar el funcionamiento del eje HHA y provocar alteraciones en el desarrollo postnatal de diversos sistemas de neurotransmisión. Asimismo, se ha visto que las modificaciones que induce la falta de cuidados maternos contribuyen a la diferenciación de las respuestas emocionales y cognitivas, que pueden persistir a lo largo de la vida del animal.

Pero a pesar de la aparente claridad de las alteraciones funcionales que produce la separación materna durante periodos de tiempo prolongados, tiene efectos muy dispares en los procesos cognitivos. Por una parte, algunos estudios muestran que esta forma de estrés temprano no afecta a la memoria (*Gujjarro J. Z., 2007; Hsu H. C., 2004*). Por otra, se ha visto que la separación materna afecta a la memoria espacial pero no a la capacidad de reconocimiento de objetos (*Leret M. L., 2010b*). Distintos autores han observado tanto empeoramientos del aprendizaje y la memoria (*Aisa B., 2007; Bagot R. C., 2009; Hui J., 2011; Huot R. L., 2002; Kosten T., 2007a; Roozental B., 2002*), como mejorías de los mismos procesos debidos a la separación materna (*Barha C. K., 2007; Bronzino J. D., 1996; Lehmann J., 2000, 2002, Zhang M., 2008*).

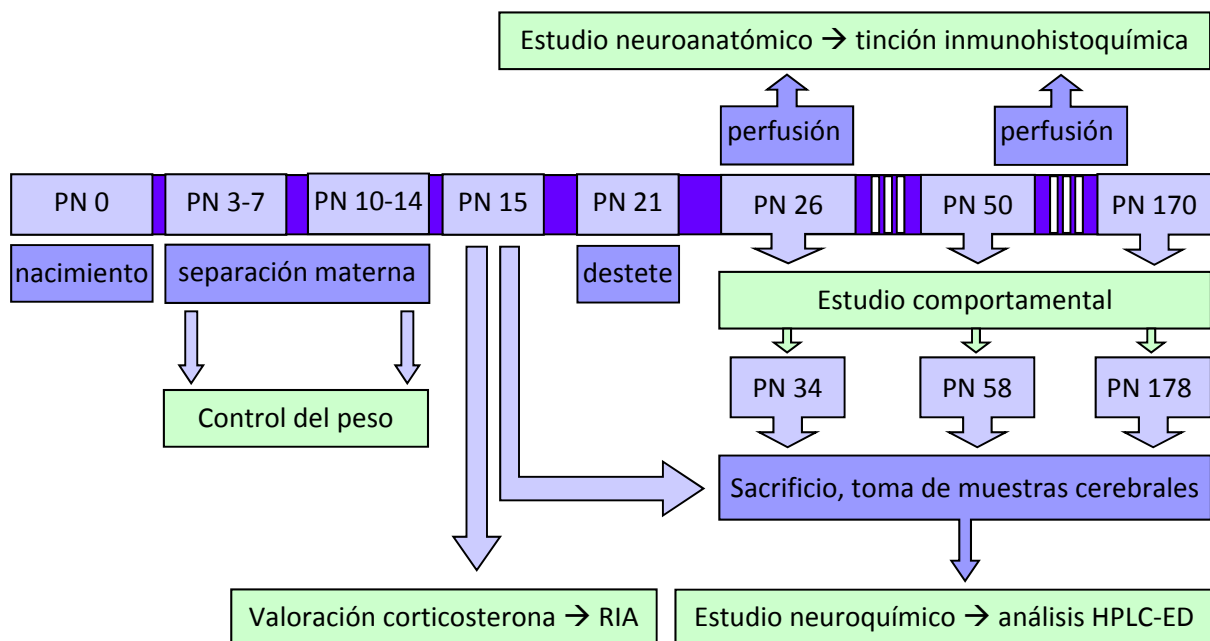
Por lo anteriormente expuesto, a pesar de la bibliografía creciente alrededor de la importancia del estrés sufrido en los primeros días de vida postnatal, no hay resultados concluyentes acerca de sus consecuencias a lo largo del desarrollo, haciéndose necesario el aporte de nuevos datos que contribuyan a clarificar sus efectos en distintos momentos de la vida.

# **OBJETIVOS**

Las consecuencias de la separación materna no están claramente establecidas y los resultados existentes acerca de los efectos comportamentales de este procedimiento experimental son muy heterogéneos. Las modificaciones a nivel neuroquímico que induce esta forma de estrés una vez finalizado, de manera inmediata, no han sido estudiadas, y las alteraciones que produce no han sido comparadas en distintos momentos del desarrollo. Por otra parte, no hay uniformidad en los estudios en machos y hembras, por lo que tampoco está bien establecido si los efectos del estrés postnatal temprano son los mismos en ambos géneros o existen dimorfismos sexuales.

**El objetivo general de este trabajo consiste en el estudio a lo largo del desarrollo de las posibles modificaciones debidas a la separación materna durante el SHRP en los sistemas neurobiológicos que subyacen a los procesos cognitivos de ratas Wistar de ambos sexos.**

Con este fin, se realizó en distintos momentos del desarrollo un análisis morfofuncional en regiones cerebrales extrahipotalámicas no sólo relacionadas con los procesos cognitivos, sino también implicadas en la respuesta al estrés y susceptibles de ser alteradas por procesos estresantes durante el desarrollo postnatal. Asimismo, se estudiaron los procesos cognitivos de los animales sometidos a separación materna y sus controles correspondientes en diferentes momentos de la adolescencia y en la edad adulta.



Para llevar a cabo este estudio, se establecieron una serie de objetivos enfocados a la evaluación de los efectos de la separación materna en distintos momentos del desarrollo, cada uno de los cuales, con su correspondiente planificación experimental, se detalla a continuación:

Para **determinar los posibles efectos del estrés temprano en el peso**, tanto al comienzo (PN 3) como al terminar el periodo de separación materna (PN 15), se realizó un control del peso de los animales de ambos grupos experimentales.

Puesto que los niveles de corticosteroides y los distintos sistemas de neurotransmisión intervienen en la maduración cerebral, las posibles modificaciones debidas por la separación materna pueden alterar el desarrollo postnatal. Con el fin de **definir el impacto de este modelo de estrés postnatal inmediatamente después de su inducción**, el día PN 15 se realizó una valoración de la corticosterona plasmática. Asimismo, se llevó a cabo un análisis neuroquímico para la valoración del contenido aminoacidérgico y monoaminérgico en el hipocampo, septo y estriado, regiones cerebrales implicadas en la respuesta al estrés y los procesos cognitivos.

**En la adolescencia temprana y tardía se realizó un estudio en el campo abierto de la actividad motora, la impulsividad y la memoria de reconocimiento espacial y no espacial.** Asimismo, se estudiaron el aprendizaje, la adquisición y la consolidación de la memoria en el laberinto radial de 8 brazos. A continuación **se realizó un análisis neuroquímico de los sistemas de neurotransmisión aminoacidérgico y monoaminérgico** en el hipocampo, el septo y el estriado. Además, **en la adolescencia temprana se llevó a cabo un estudio neuroanatómico mediante inmunomarcaje del sistema glutamatérgico, así como de la densidad neuronal y de proteínas enlazantes de calcio** en el hipocampo, el septo, el núcleo accumbens, la amígdala y la corteza prefrontal.

Por último se realizó un estudio de los efectos del **estrés postnatal a largo plazo**. Para ello, en la edad adulta se realizaron estudios en el campo abierto de la actividad motora, la impulsividad y la memoria de reconocimiento espacial y no espacial, así como el análisis neuroquímico de aminoácidos y monoaminas en el hipocampo, el septo y el estriado. Asimismo, se realizó un estudio de inmunomarcaje de las proteínas enlazantes de calcio y la enzima nNOS en el hipocampo, el septo, el núcleo accumbens, la amígdala y la corteza prefrontal para **determinar si las modificaciones neuroanatómicas observadas en la adolescencia temprana se mantienen a largo de la vida del animal.**

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

# 1 ANIMALES

Los animales empleados fueron suministrados por el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (ANUC). Durante toda la experimentación, el manejo y el tratamiento de los animales se acogió a lo dispuesto en el Real Decreto 223/1988 sobre la protección de los animales utilizados para la investigación científica, como también a la norma en el Consejo de la Comunidad Europea (86/609 CEE).

Se utilizaron camadas de ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar de la cepa albina (figura 16) de ambos sexos. La adolescencia de las ratas se divide en tres fases: temprana, media y tardía (McCormick 2010a). La adolescencia temprana comienza tras el destete, el día PN 21, y se prolonga hasta el día PN 34; la media es una transición y comprende los días PN 34-46; la tardía se desarrolla entre los días PN 46-59. Durante el periodo de adolescencia tienen lugar cambios neurales y comportamentales típicos de la maduración sexual (figura 17). Por convenio, la madurez sexual se alcanza el día PN 60 (McCormick 2010a), cuando comienza la edad adulta.



Fig. 16. Rata Wistar cepa albina.

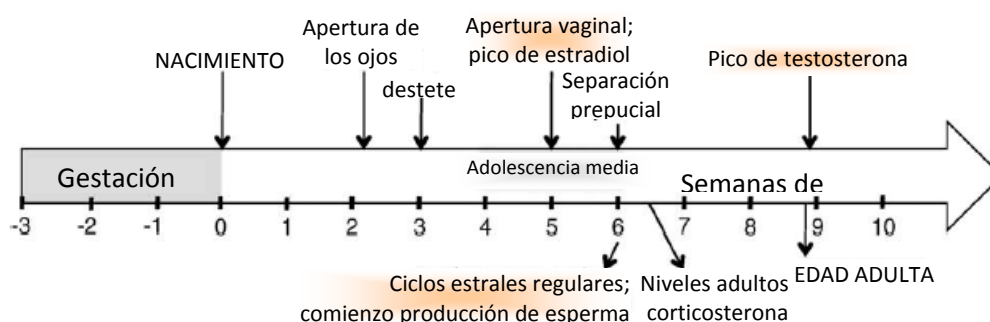


Fig. 17: Representación esquemática a lo largo del tiempo de los principales momentos del desarrollo desde el nacimiento hasta la edad adulta. McCormick y Mathews 2010.

El estudio se realizó en cuatro momentos del desarrollo: en PN15 (Figura 18A), en la adolescencia temprana y tardía y en la edad adulta (Figura 18B). Todo el proceso experimental se realizó en un ciclo de luz invertida de 12-12 horas (periodo de oscuridad o fase activa, de 8:00 a 20:00 horas, en luz roja), y a una temperatura y humedad constantes. A lo largo del procedimiento, tanto las madres como las crías (Figura 18C) de los grupos de experimentación dispusieron de agua y alimento ad libitum, a excepción de los animales destinados a las pruebas de comportamiento en el laberinto radial de 8 brazos durante las cuales fueron sometidos a restricción calórica. Tras el destete el día PN 21, los animales se separaron por sexos y se mantuvieron en jaulas en grupos de hermanos de 4-6 individuos.

Fig. 18: Ratas Wistar en distintos momentos del desarrollo. A: crías PN 15; B: adulto PN 70; C: Madre y camada el día PN 0.



## 2 SEPARACIÓN MATERNA

La separación materna es un modelo de estrés postnatal temprano.

Siguiendo el protocolo de COLORADO (*Colorado R., 2006*), los animales del grupo experimental se sometieron a separación materna (SM) durante 5 horas diarias en la fase activa (de 9:00 a 14:00) desde al día PN 3 hasta el 7 y del día PN 10 al 14 (Figura 19). Durante este tiempo, las madres de estas camadas se introdujeron de forma individualizada en una jaula, con agua y comida *ad libitum*, y se mantuvieron en luz roja en una habitación aparte hasta el momento de retorno con sus crías.

Una vez finalizado el procedimiento de SM, todas las camadas permanecieron con sus respectivas madres hasta el momento del destete, el día PN 21.

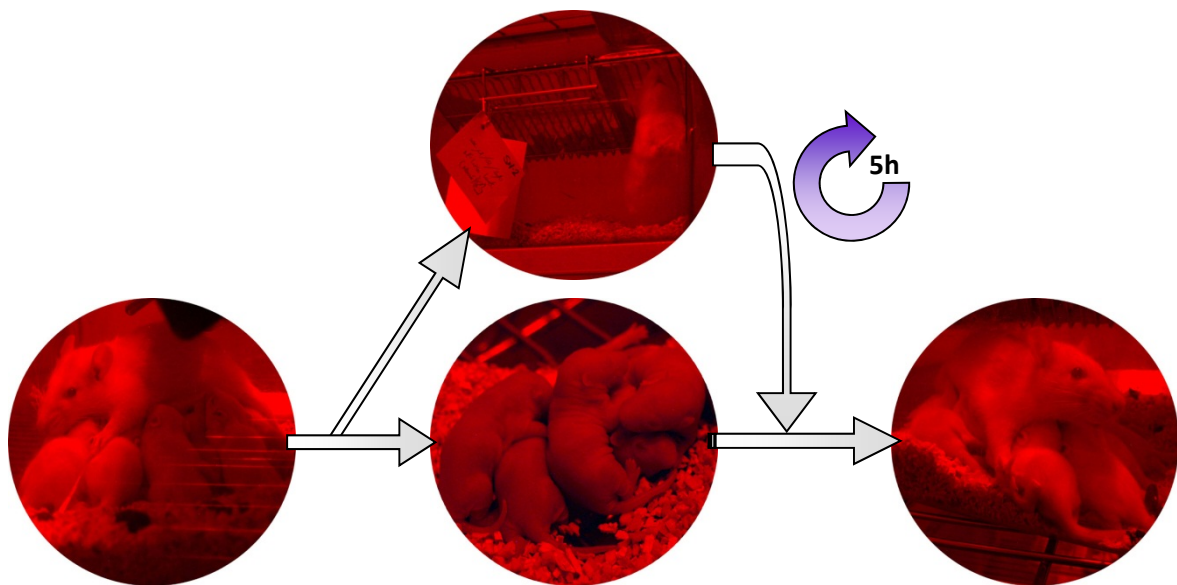


Fig. 19. Representación esquemática del procedimiento de separación materna.

## 3 CONTROL DEL PESO

Los animales de ambos grupos se pesaron el día PN 3 y el día PN15, al comienzo y finalización de la separación materna, con el fin de determinar la posible repercusión de este procedimiento en el peso de los mismos.

## 4 VALORACIÓN DE CORTICOSTERONA POR RADIOINMUNOENSAYO

### 4.1 TOMA DE MUESTRAS PARA VALORACIÓN DE CORTICOSTERONA

Para realizar una valoración de la concentración de corticosterona en plasma después de la separación materna, se tomaron muestras de sangre de crías de ambos grupos experimentales el día PN15, 24 horas después de la finalización de este procedimiento experimental.

La sangre se recogió en el momento del sacrificio, que se llevo a cabo de forma rápida mediante decapitación con guillotina, siempre en un intervalo horario comprendido entre las 11:00 y las 13:00 para controlar las fluctuaciones circadianas de los niveles de corticosterona. Las muestras se centrifugaron a 12000 r. p.m. durante 5 minutos y el plasma así obtenido se congeló a -20°C hasta el momento de la determinación de los valores de corticosterona.

### 4.2 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Las muestras se procesaron utilizando un kit comercial para la valoración de la concentración de corticosterona (Double Antibody Corticosterona <sup>125</sup>I RIA kit, InmuChem™)<sup>1</sup> siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se emplearon 10 µl de cada una de las muestras de suero sanguíneo obtenido y corticosterona marcada radiactivamente como trazador (<sup>125</sup>I-Corticosterona).

El análisis de las muestras se realizó midiendo la radiactividad en un contador de centelleo.

La determinación de las concentraciones de corticosterona se efectuó por extrapolación de los valores de radioactividad obtenidos de cada muestra analizada en una curva de regresión obtenida con los valores de las concentraciones conocidas de las soluciones estándar.

Los datos obtenidos se expresaron en ng de corticosterona / ml de plasma.

---

<sup>1</sup> Kit para valoración de corticosterona mediante radioinmunoensayo (RIA). InmuChem™ Double Antibody Corticosterona <sup>125</sup>I RIA kit.

## 5 ESTUDIO COMPORTAMENTAL

En el periodo de adolescencia y la edad adulta de los animales, se llevaron a cabo pruebas de comportamiento que permitieron el estudio de la respuesta emotiva y de la memoria de los animales. Para ello se realizaron pruebas en el campo abierto y en el laberinto radial de 8 brazos.

En el campo abierto (Figura 20) se evaluaron la respuesta emotiva y la memoria no espacial y espacial mediante las pruebas de reconocimiento y localización de objetos respectivamente. Las pruebas comportamentales en este recinto se llevaron a cabo en la adolescencia temprana y tardía y en la edad adulta.

En el laberinto de 8 brazos (Figura 21) se realizó el estudio de la memoria espacial a corto y largo plazo mediante las pruebas de adquisición y consolidación de memoria respectivamente. Estas pruebas tuvieron lugar durante el periodo de adolescencia tardía.

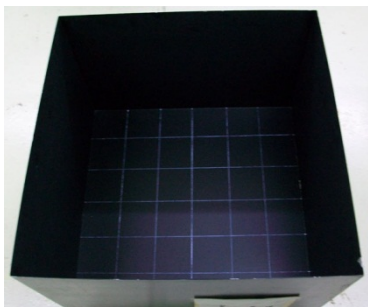


Fig. 20: Imagen del campo abierto

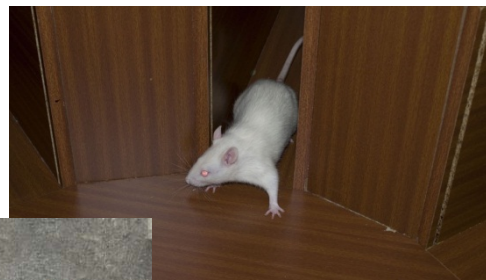


Fig. 21: Imágenes del laberinto radial de 8 brazos y una rata a la salida de uno de los pasillos en una prueba de comportamiento.

## 5.1 PRUEBAS EN EL CAMPO ABIERTO

Las pruebas de comportamiento realizadas en campo abierto se adaptaron del modelo desarrollado por ENNACEUR y DELACOUR (1987) que permiten tanto el estudio de la actividad motora y el comportamiento impulsivo del animal, como el estudio de la memoria de trabajo no espacial y espacial (mediante las pruebas de reconocimiento y localización de objetos respectivamente). Esta prueba está basada en la preferencia natural de los roedores por lo desconocido que les lleva a explorar más lo novedoso que lo familiar (*Ennaceur A., 2005*).

El campo abierto empleado consistía en un recinto cuadrado con las superficies negras formado por una plataforma central cuadrada de 60cm de lado dividida por líneas blancas en 6x6 cuadrados y cuatro paredes de 60cm de altura (Figura 22).

Para la realización de cada una de las pruebas se coloca un único animal en el sector periférico del aparato, orientado hacia el exterior. El orden de los animales en la realización de las pruebas es aleatorio y éstas se llevaron a cabo siempre en un intervalo horario comprendido entre las 9:00 y las 14:00, para evitar fluctuaciones en la respuesta de los animales debidas a su ciclo circadiano.

Después de cada prueba, tanto el recinto como los objetos empleados en la misma se limpiaron con una disolución de etanol en agua al 30% para eliminar los olores, orines y defecaciones.

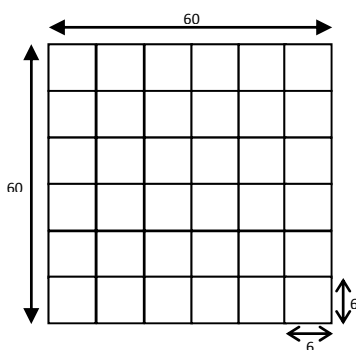


Fig. 22. Representación esquemática del campo abierto. Las medidas del mismo están expresadas en centímetros.

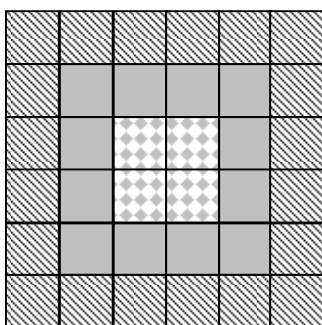


Fig. 23. Representación esquemática de los sectores del campo abierto. Los cuadrados rallados son los correspondientes al sector periférico. Los cuadrados sombreados son los correspondientes al sector interno. Los cuadrados con el entramado de rombos corresponden al sector central.

Como paso previo para las pruebas de memoria, se llevó a cabo una habituación con el fin de que los animales se familiarizaran con el campo abierto. Para esto, se introdujo a cada individuo en el recinto durante 10 minutos cuatro días consecutivos, los días PN 26-29, 50-53, 170-173.

La observación de los parámetros para el estudio de la actividad motora y el comportamiento impulsivo se realizó durante los 5 minutos de la primera sesión de habituación, los días PN 26, 50 y 170. Este estudio comportamental está basado en la actividad exploratoria espontánea que presentan las ratas bajo las condiciones del estrés moderado que les supone la introducción en un entorno novedoso y permiten estudiar su respuesta emotiva y adaptación al estrés.

### **Actividad motora**

La actividad motora de los animales se estudió mediante la deambulación total (DT), que es la medida del número total de cuadrados que el animal cruza por completo a lo largo de los cinco minutos de duración de la prueba. Para poder analizar el comportamiento impulsivo en este tiempo, se registraron de manera individual las deambulaciones externa (DE, número de cuadrados del sector periférico que cruza el animal), interna (DI, número de cuadrados del sector interno que cruza el animal), y central (DC, número de cuadrados del sector central que cruza el animal) (Figura 23).

Como parte de la actividad motora del animal, se observó también su comportamiento orientativo contabilizando el número de posturas erguidas (PE), consideradas como aquellas en las que el animal se sostenía únicamente sobre las extremidades posteriores, apoyando o no las superiores en la pared, y manteniendo el cuerpo en posición vertical independientemente del tiempo.

### **Comportamiento impulsivo**

El estrés que les produce a los animales la introducción en un nuevo entorno se evaluó mediante el comportamiento impulsivo, en relación a su tendencia a adentrarse a la zona central del campo abierto o permanecer en la periferia. La impulsividad se midió a través de los ratios con respecto a la DT de la deambulación interna (DI/DT) y central (DC/DT).

### **Prueba de reconocimiento de objetos**

Se llevó a cabo para evaluar la memoria no espacial de los animales a través de su capacidad de reconocimiento de un objeto previamente conocido frente a otro nuevo teniendo en cuenta la actividad exploratoria asociada al interés por estos.

Se realizó los días PN 30, 54 y 174, después de la última sesión de habituación. Consiste en dos sesiones de 3 minutos cada una con un periodo de descanso entre ambas de 15 minutos.

En la primera sesión se introdujeron en el campo abierto dos objetos idénticos (botellas de plástico de 7cm de diámetro y 28cm de altura, llenas de arena y pegadas a la superficie para evitar su desplazamiento durante la prueba) dispuestos en esquinas adyacentes, suficientemente separados de las paredes para que los animales pudieran rodearlos (Figura 24). Cada animal se colocó en el sector periférico del aparato, orientado hacia el exterior. Se contabilizó el número de veces que los animales se aproximaron a cada objeto para explorarlo y el tiempo que pasaron explorando activamente cada uno (aproximando las vibrisas a menos de tres centímetros o incluso apoyándose en los objetos).

En la segunda sesión uno de los objetos anteriormente expuestos se cambia por otro distinto (un bote de refresco de 6cm de diámetro y 11cm de altura, lleno y pegado a la superficie para evitar su desplazamiento durante la prueba) (Figura 25). Se contabilizó de nuevo el número de acercamientos a cada objeto y el tiempo de exploración activa de cada uno.

Los parámetros analizados en esta prueba fueron el número de acercamientos al objeto nuevo con respecto al total de acercamientos a ambos objetos en la segunda sesión y el porcentaje de tiempo que el animal pasa explorando el objeto nuevo respecto al tiempo total de exploración de los dos objetos en la segunda sesión.

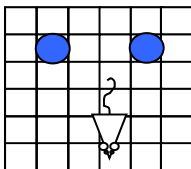


Fig. 24. Representación esquemática de la disposición de los dos objetos idénticos en la primera fase de la prueba de reconocimiento de objetos.

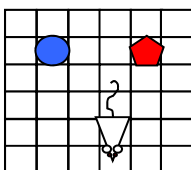


Fig. 25. Representación esquemática de la disposición de los objetos antiguo y nuevo en la segunda fase de la prueba de reconocimiento de objetos.

### **Prueba de localización de objetos**

Se realizó para estudiar la memoria espacial de los animales mediante su capacidad de identificar el cambio de ubicación de un objeto previamente identificado.

La prueba de localización de objetos se realizó tres días después de la prueba de reconocimiento de objetos, los días PN 33, 57 y 177. Consiste en dos sesiones de 3 minutos cada una con un periodo de descanso entre ambas de 15 minutos.

La primera sesión es idéntica a la de la prueba de reconocimiento de objetos (Figura 26). Se introdujeron en el campo abierto dos objetos idénticos (botellas de plástico de 7cm de diámetro y 28cm de altura, llenas de arena y pegadas a la superficie para evitar su desplazamiento durante la prueba) dispuestos en esquinas adyacentes, suficientemente separados de las paredes para que los animales pudieran rodearlos. Cada animal se colocó en el sector periférico del aparato, orientado hacia el exterior. Se contabilizó el número de veces que los animales se aproximaron a cada objeto para explorarlo y el tiempo que pasaron explorando activamente cada uno (aproximando las vibrisas a menos de tres centímetros o incluso apoyándose en los objetos).

En la segunda sesión uno de los objetos expuestos en la sesión anterior se cambió de sitio y se colocó en la esquina enfrente (Figura 26). Se contabilizó de nuevo el número de acercamientos a cada objeto y el tiempo de exploración activa de cada uno.

Los parámetros analizados en esta prueba fueron el número de acercamientos al objeto cambiado respecto al total de acercamientos a ambos objetos en la segunda sesión y el porcentaje de tiempo que el animal pasa explorando el objeto cambiado respecto al tiempo total de exploración de ambos objetos en la segunda sesión.

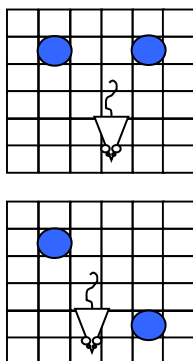


Fig. 26. Representación esquemática de la disposición de los dos objetos idénticos en la primera fase de la prueba de localización de objetos (arriba) y de la disposición cambiada de estos dos objetos en la segunda fase (abajo) de la prueba.

## 5.2 PRUEBAS EN EL LABERINTO RADIAL DE 8 BRAZOS

Por su mayor complejidad y duración respecto a las realizadas en el campo abierto, las pruebas llevadas a cabo en este aparato nos permiten un estudio más completo de la memoria espacial de los animales. El laberinto radial de 8 brazos, desarrollado por OLTON y SAMUELSON (1976), se emplea para valorar de forma conjunta las memorias de trabajo y referencia, componentes del aprendizaje y la memoria espacial que permiten el almacenamiento y la búsqueda de la información necesaria para la resolución de estas pruebas (Carrillo-Mora P., 2009).

La capacidad de aprendizaje en este aparato está basada en la motivación alimenticia, y permite el estudio de la memoria espacial a corto y largo plazo (mediante las pruebas de adquisición y consolidación de la memoria respectivamente).

Desde el día PN 34, los animales de ambos grupos de experimentación se sometieron a una restricción calórica para mantener su peso corporal en un 85% de su peso normal hasta el final del estudio comportamental. Se colocó al fondo de cada uno de los pasillos del laberinto un pellet (cereal azucarado) que una vez comido no se repone, de tal manera que la resolución del laberinto consiste en la entrada en el mayor número posible de brazos distintos.

El recinto utilizado es de madera y está formado por una plataforma central decahexagonal de 58cm de diámetro, de la que salen de forma alterna 8 brazos de 60x8cm con paredes de 25cm de altura (Figura 27). En la entrada de cada brazo se puede colocar una compuerta que abre o cierra el paso con un mecanismo de guillotina.

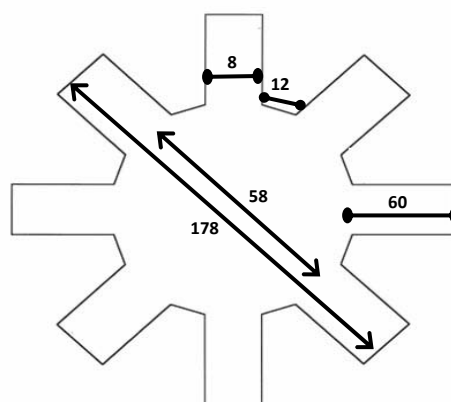


Fig. 27. Representación esquemática del laberinto radial de 8 brazos. Las medidas del mismo se expresan en centímetros.

Para la realización de cada una de las pruebas, se colocó un único animal en el centro del laberinto, siempre en la misma orientación. Se realizó una única sesión diaria con cada animal. El orden de los animales en la realización de las pruebas fue aleatorio y se llevaron a cabo siempre en un intervalo horario comprendido entre las 9:00 y las 14:00, para evitar fluctuaciones en la respuesta de los animales debidas a su ciclo circadiano.

Después de cada prueba, el laberinto se limpió con una disolución de etanol en agua al 30% para eliminar los orines y defecaciones.

### **Aprendizaje**

Previamente al comienzo del aprendizaje, se realizó un preentrenamiento con el fin de que los animales se familiarizaran con el circuito. Consistió en una única sesión en la que se introdujeron en el laberinto al conjunto de los individuos de cada jaula durante 10 minutos.

Las sesiones de aprendizaje comenzaron el día PN 41. En cada una se observó la resolución del laberinto y se anotaron como errores de memoria de trabajo (EMT) las reentradas en un brazo ya visitado (Figura 28). Las sesiones concluían tras comerse el animal todos los pellets o después de 5 minutos establecidos como máximo. La prueba finalizaba después de tres sesiones consecutivas cometiendo cada animal 3 o menos EMT o tras 14 sesiones establecidas como máximo.

Se contabilizó el número de sesiones de entrenamiento requeridas por cada animal.

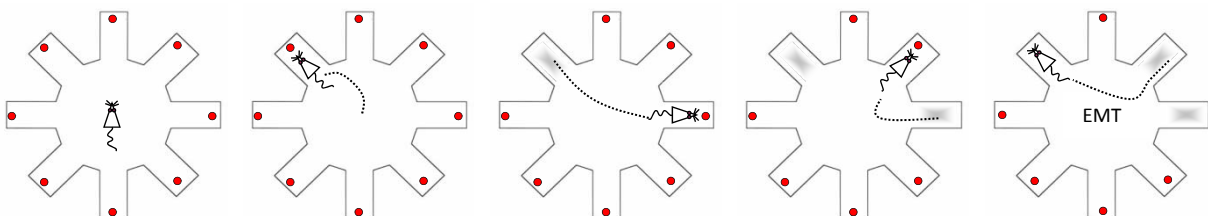


Fig. 28. Representación esquemática de un error de memoria de trabajo (EMT) cometido en la resolución del laberinto en la prueba de aprendizaje. El círculo rojo representa el pellet de comida; los pasillos sombreados en gris representan aquellos pasillos que ya han sido visitados.

***Pruebas de adquisición y consolidación de memoria***

Las pruebas de adquisición y consolidación de memoria se realizaron para estudiar la memoria espacial de los animales a corto y largo plazo respectivamente mediante la observación de los errores de trabajo y referencia cometidos en la resolución del laberinto. Se realizaron de manera consecutiva en la adolescencia tardía, una vez los animales terminaron las sesiones de aprendizaje.

La adquisición de memoria se evaluó entre los días PN 48-64. La prueba consta de dos fases consecutivas: la primera con 4 brazos del laberinto cerrados por compuertas y la segunda con todos los brazos abiertos. Se separan por un intervalo de 10 segundos necesarios para retirar las compuertas de los brazos, que son alternos y siempre los mismos. En la primera fase se contabilizaron los EMT (Figura 29); en la segunda, los EMT (Figura 30) y los errores de memoria de referencia (EMR) como las reentradas en los brazos visitados durante la primera fase (Figura 31). La suma de los EMT y EMR fueron los errores totales (ET). Ambas fases terminan una vez el animal se come todos los pellets o tras 5 minutos establecidos como máximo. La prueba se dio por concluida después de tres sesiones consecutivas cometiendo cada animal 3 o menos ET o tras 5 sesiones establecidas como máximo.

La consolidación de memoria se llevo a cabo entre los días PN 59-75, transcurridos 11 días en los que éstos no habían realizado ninguna otra prueba. Consistió en una única sesión idéntica a la prueba de adquisición de memoria, en la que también se contabilizaron los EMT, EMR y ET.



## 6 ESTUDIO NEUROQUÍMICO

### 6.1 SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO NEUROQUÍMICO

El sacrificio de los animales para el estudio neuroquímico se realizó en cuatro momentos del desarrollo: el día PN 15, 24 horas después de la finalización del procedimiento de separación materna, y los días PN 34, 58, 178, 24 horas después de la finalización de las pruebas comportamentales.

Los animales fueron sacrificados de forma rápida mediante decapitación con guillotina (Figura 32), en un intervalo horario comprendido entre las 11:00 y las 13:00 para controlar las fluctuaciones circadianas de los niveles de neurotransmisores. Se extrajeron los encéfalos (Figura 33) y se congelaron y mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las áreas cerebrales diseccionadas para realizar el estudio fueron el hipocampo dorsal y ventral, el septo y el cuerpo estriado. Se localizaron en cortes coronales siguiendo el atlas estereotáxico de PAXINOS Y WATSON (Figura 34) y se pesaron (Paxinos G., 1998). La extracción se realizó en frío.



Fig. 32: Imagen de la guillotina empleada en la decapitación

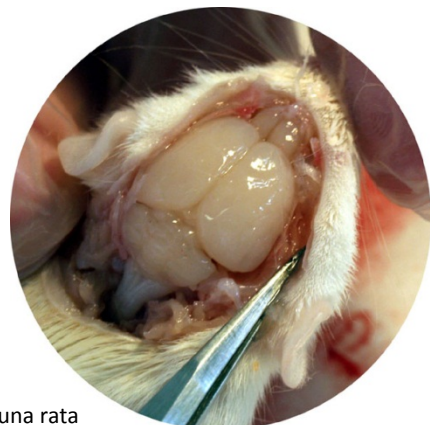


Fig. 33: Imagen de la extracción del encéfalo de una rata

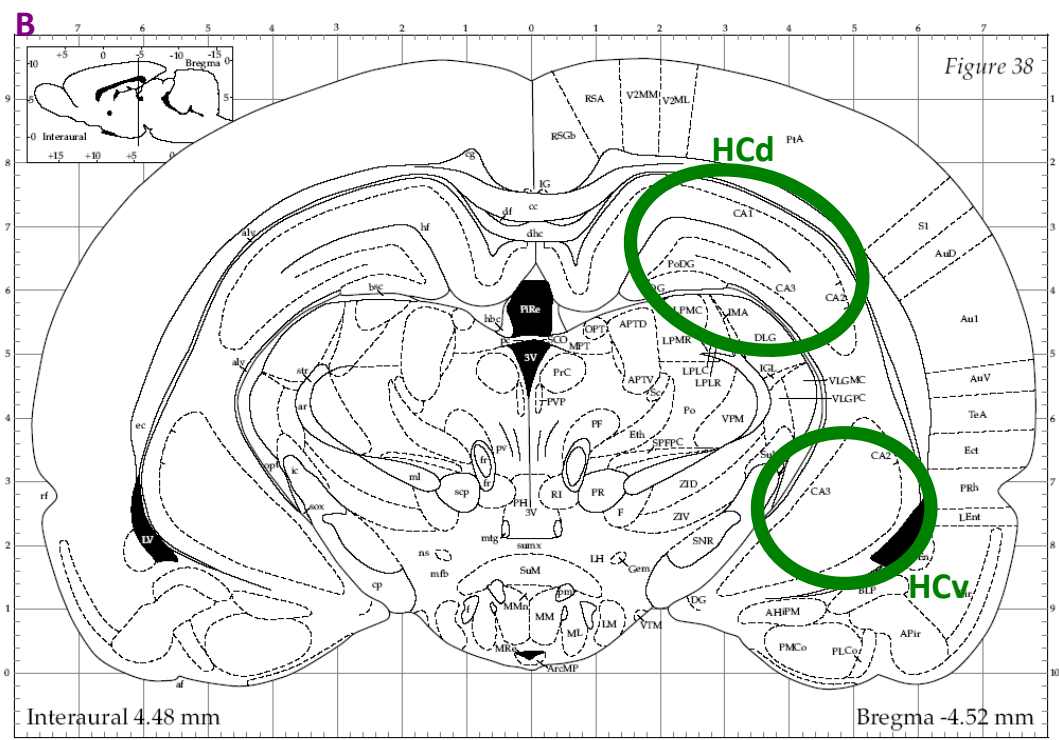
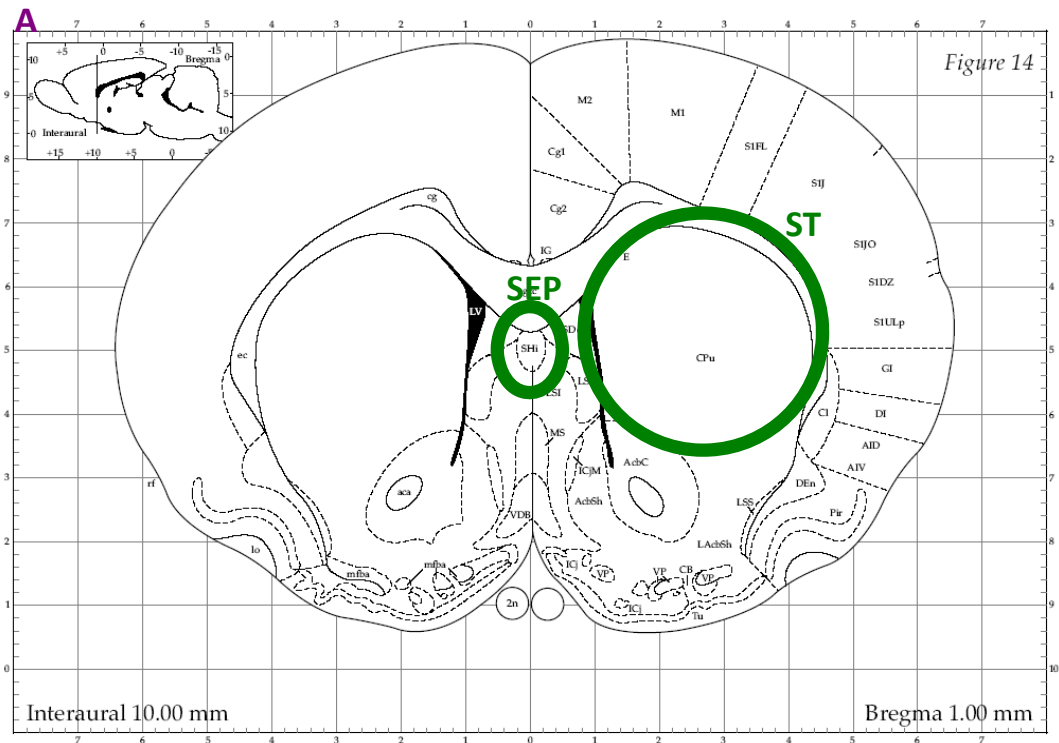


Fig. 34. Vista de dos secciones coronales del encéfalo de rata. Extraído de Paxinos y Watson (1998).

A: nivel de corte para la obtención del septo (SEP en la imagen) y del cuerpo estriado (ST en la imagen).

B: nivel de corte para la obtención del hipocampo dorsal (HCd en la imagen) y ventral (HCv en la imagen).

## 6.2 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Las muestras extraídas fueron homogeneizadas en 250  $\mu$ l de tampón fosfato potásico 150 mM pH 6.8<sup>1</sup> y 250  $\mu$ l de ácido perclórico (PCA) 0.2 N<sup>2</sup> a 4<sup>o</sup>C conteniendo disulfito sódico 0.4 mM<sup>3</sup> y EDTA 0.4 mM.

El homogeneizado se centrifugó en una biofuga refrigerada a 12000 r. p.m. durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se separó para el análisis de los neurotransmisores monoaminérgicos y de aminoacidérgicos. Las muestras se conservaron a -80<sup>o</sup>C hasta el momento del análisis.

Para la separación y cuantificación de las monoaminas y aminoácidos de las muestras se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector electroquímico Metrohm<sup>®</sup> con una sensibilidad de 10 nA (Figura 35). Las muestras se inyectaron en un volumen de 100  $\mu$ l.

El detector está acoplado a un soporte informático que mediante el programa ChromaNec<sup>®</sup> nos permite la obtención de cromatogramas para el análisis de los datos.

La fase estacionaria del HPLC la constituyó una columna MEDITERRANEA SEA18<sup>®</sup>, con un tamaño de poro de 5  $\mu$ m y unas medidas de 20x0.46 cm.

La fase móvil empleada es específica para el análisis de monoaminas<sup>4</sup> y aminoácidos<sup>5</sup>.



Fig. 35. HPLC acoplado al detector electroquímico

<sup>1</sup> Tampón fosfato potásico 150 mM pH 6.8. Se prepara en agua MiliQ. Se ajusta el pH con NaOH 1 N (se prepara con agua MiliQ) a 6.8.

<sup>2</sup> Ácido perclórico (PCA) 0.2 N (conteniendo disulfito sódico 0.4 mM y EDTA 0.4 mM). Se prepara en agua MiliQ a partir de ácido perclórico (70%) y se añade EDTA sódico y disulfito sódico 1 M.

<sup>3</sup> Disulfito sódico 1M. Se prepara en agua MiliQ.

<sup>4</sup> Fase móvil para monoaminas. Se prepara en agua MiliQ y contiene: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05M, EDTA sódico 0.1mM, heptano sulfonato sódico 1mM. Se añade un 20% de metanol y se ajusta el pH con ácido acético glacial a 3.66. La fase móvil se filtra por un filtro de celulosa de 0.45  $\mu$ m de poro y se desgasifica con helio antes de comenzar a usarla.

<sup>5</sup> Fase móvil para aminoácidos. Se prepara en agua MiliQ y contiene: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05M, EDTA sódico 0.1mM. Se añade un 27% de metanol y se ajusta el pH con ácido clorhídrico a 4.42. La fase móvil se filtra por un filtro de celulosa de 0.45  $\mu$ m de poro y se desgasifica con helio antes de comenzar a usarla.

### **Condiciones específicas para el análisis de monoaminas**

El voltaje del detector acoplado al HPLC fue de 80 mV y el flujo de la bomba de 1 ml/min.

La inyección de las muestras en el loop se realizó a partir del sobrenadante recogido para el análisis en el procesamiento, que se descongeló en el momento previo al análisis.

### **Condiciones específicas para el análisis de aminoácidos**

El voltaje del detector acoplado al HPLC fue de 85 mV y el flujo de la bomba de 0.9 ml/min.

La inyección para el análisis de aminoácidos se realizó a partir de las muestras derivatizadas.

Para la derivatización de los aminoácidos de las muestras, se añadieron a un cono *ependorf* 15 µl del sobrenadante obtenido en la centrifugación del homogeneizado descongelado, 60 µl de tampón fosfato potásico 150 mM pH 6.8<sup>1</sup> y 60 µl de PCA 0.2 N<sup>2</sup> conteniendo disulfito sódico 0.4 mM<sup>3</sup> y EDTA 0.4 mM y. A continuación se añadieron 100 µl de NaOH 1 N<sup>4</sup> para ajustar cada una de las muestras al pH óptimo para que se produjera la reacción de derivatización (pH 5.5 - 6.5). Las muestras así preparadas se pueden conservar a 4°C antes del análisis.

Una vez ajustado el pH de cada una de las muestras se añadieron 23.5 µl de reactivo de derivatización OPA-sulfito<sup>5</sup> (siempre en una proporción 1:10 al volumen de muestra previamente preparado) que se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Es importante que al añadir el OPA-sulfito el cono *ependorf* esté bien protegido de la luz ya que este reactivo es fotosensible.

---

<sup>1</sup> Tampón fosfato potásico 150 mM pH 6.8. Se prepara en agua MiliQ. Se ajusta el pH con NaOH 1 N<sup>4</sup> a 6.8.

<sup>2</sup> Ácido perclórico (PCA) 0.2 N (conteniendo disulfito sódico 0.4 mM y EDTA 0.4 mM). Se prepara en agua MiliQ a partir de ácido perclórico (70%) y se añade EDTA sódico y disulfito sódico 1 M.

<sup>3</sup> Disulfito sódico 1M. Se prepara en agua MiliQ.

<sup>4</sup> NaOH 1 N. Se prepara en agua MiliQ.

<sup>5</sup> Reactivo de derivatización OPA-sulfito. Se prepara en un cono *ependorf* oscuro forrado con papel de aluminio ya que el OPA es fotosensible. Se añaden por orden: 2.2 mg de OPA (si no se pesa esta cantidad exacta, se modifican las cantidades del resto de reactivos a añadir posteriormente proporcionalmente), 50 µl de sulfito sódico 1 M<sup>6</sup> (se agita), 50 µl de etanol puro (se agita), 0.9 ml de tampón borato sódico 0.4 M pH 10.4<sup>7</sup>. Se agita hasta que se disuelve completamente y se puede conservar a 4°C durante una semana.

<sup>6</sup> Sulfito sódico 1 M. Con agua MiliQ, se prepara en un cono *ependorf* oscuro y forrado con papel de aluminio (ya que este reactivo es fotosensible) y se mantiene a 4°C.

<sup>7</sup> Tampón borato sódico 0.4 M pH 10.4. Se prepara en agua MiliQ a partir de ácido bórico. Se ajusta el pH con NaOH 1 N<sup>4</sup> a 10.4. Se desoxigena con nitrógeno durante 30 minutos.

En el análisis neuroquímico se determinaron las concentraciones de las monoaminas dopamina (DA) y serotonina (5-HT) y de sus metabolitos (DOPAC y 5-HIAA respectivamente) y las de los aminoácidos GABA, glutamato y taurina.

La actividad dopaminérgica y serotoninérgica se determinó a través del turnover de dopamina y serotonina, calculado como la relación de la concentración de los metabolitos respecto a la de sus correspondientes monoaminas (DOPAC/DA y 5-HIAA/5-HT).

La determinación de las concentraciones de los neurotransmisores se efectuó a partir de las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos (Figura 36) en el registro de cada una de las muestras y de los patrones de monoaminas<sup>1</sup> y aminoácidos<sup>2</sup>.

Los datos obtenidos en el análisis neuroquímico se expresaron en ng de neurotransmisor / gr de tejido en el caso de las monoaminas y en  $\mu\text{g}$  de neurotransmisor / gr de tejido en el caso de los aminoácidos.

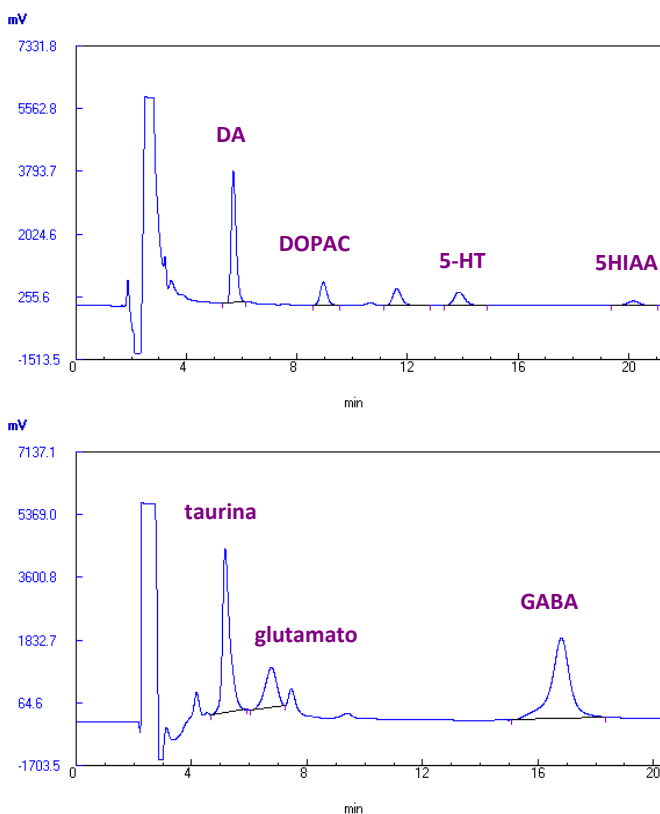


Fig. 36. Cromatogramas del análisis de monoaminas y aminoácidos.

<sup>1</sup> Patrones de monoaminas para HPLC: DA, DOPAC, 5HT, 5HIAA. Se preparan en agua MilliQ a una concentración de 50 y 100 ng/ml. Se hacen alícuotas y se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

<sup>2</sup> Patrones de aminoácidos para HPLC: GABA, glutamato y taurina. Se preparan en agua MilliQ a una concentración de 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el caso del GABA y de 100 y 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el caso del glutamato y la taurina. Se hacen alícuotas y se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 7 ESTUDIO NEUROANATÓMICO

### 7.1 PERFUSIÓN Y TOMA DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO NEUROANATÓMICO

Los animales destinados al estudio neuroanatómico se recogieron al azar de los diferentes grupos que iban a ser sometidos a las pruebas de comportamiento en campo abierto el día PN 26. Previamente a la perfusión, fueron anestesiados utilizando una mezcla de ketamina-xilacina<sup>1</sup> inyectada vía intravenosa.

Para el estudio neuroanatómico, el tejido cerebral se sometió a un proceso de fijación para preservar la integridad celular mediante una técnica de perfusión intraventricular (Figura 37) inyectando una solución fijadora<sup>2</sup> con una bomba peristáltica Gibson Miniplus 2<sup>®</sup> (Figura 38).

Una vez extraído el encéfalo, se le sometió a una postfijación y a un tratamiento de crioprotección. Para esto se introdujo primero 3-4 días en una solución fijadora a 4°C y a continuación 24-48 horas en una solución crioprotectora<sup>3</sup> a 4°C. Por último se incluyeron en bloques de TissueTek<sup>®</sup> que se congelaron y conservaron a -80°C.

Figura 37: perfusión de rata



Figura 38: Bomba peristáltica Gibson Miniplus empleada para la perfusión

<sup>1</sup> Ketamina-Xilacina: 80 mg / 12 mg / Kg peso del animal

<sup>2</sup> Solución fijadora para perfusión. Se prepara en una campana de extracción. Contiene paraformaldehído al 4% en tampón PB 0.1M<sup>4</sup> a 65°C. Una vez preparada, se enfría y se mantiene a 4°C.

<sup>3</sup> Solución crioprotectora. Se prepara en agua MilliQ y contiene sacarosa al 30%. Se mantiene a 4°C.

<sup>4</sup> Tampón PB (fosfato monosódico-disódico) 0.1M pH 7.3-7.4. Se prepara en agua MilliQ y contiene: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.08M. Se ajusta el pH con ácido clorhídrico a 7.3-7.4.

## 7.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los bloques obtenidos, se cortaron en un Criostato American Optical® a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El grosor de cada corte osciló entre los 30-40  $\mu\text{m}$ . Los cortes se recogieron de forma seriada en unos pocillos que contenían tampón PB 0.1 M<sup>1</sup>.

Para el análisis neuroanatómico se realizaron dos técnicas de tinción inmunohistoquímica diferente: una con anticuerpos biotinilados (técnica ABC) y otra con anticuerpos fluorescentes (técnica de inmunofluorescencia). En ambos casos, todos los pasos se llevaron a cabo en flotación y agitación lenta. Los anticuerpos empleados están detallados en la tabla 1.

### ***Controles y especificidad de los anticuerpos***

Para asegurar que no aparece inmunomarcaje inespecífico, se realizaron controles negativos en el estudio inmunohistoquímico. Los controles incluyeron incubaciones en paralelo de secciones alternas con suero normal u omitiendo el antisuero primario. La especificidad de los anticuerpos usados ha sido asegurada por las compañías comerciales.

#### 7.2.1 MÉTODO AVIDITA-BIOTINA PEROXIDASA (ABC)

El método ABC está representado en la figura 39. Antes de cada uno de los pasos detallados a continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón PB 0.1 M<sup>1</sup>.

El primer paso de esta técnica es la inhibición de la peroxidasa endógena, que se realizó en una incubación de 20 minutos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%<sup>2</sup>. Seguidamente se realizó una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución con suero<sup>3</sup> de burro.

A continuación, se realizó un bloqueo con solución avidita-biotina<sup>1</sup>. Este paso consiste en la incubación con avidina durante 15 minutos y posterior incubación con biotina durante 15 minutos. Entre las incubaciones se realizó un lavado de 2-3 minutos con tampón PB 0.1M<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Tampón PB (fosfato monosódico-disódico) 0.1M pH 7.3-7.4. Se prepara en agua MilliQ y contiene:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.02M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.08M. Se ajusta el pH con ácido clorhídrico a 7.3-7.4.

<sup>2</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%. Se prepara en tampón PB 0.1 M<sup>1</sup>.

<sup>3</sup> Solución de suero. Se prepara en tampón PB 0.1M<sup>1</sup> pH 7.3-7.4 a una dilución de 1/50. Contiene BSA (Bovine Serum Albumine) 0.25%,  $\gamma\text{NaN}_3$  0.1%. Se mantiene a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Tras el bloqueo, se realizó una incubación en una solución con el anticuerpo<sup>2</sup> específico al epítipo que se quiere estudiar (anticuerpo primario) durante 24 horas a 4°C y a continuación la incubación con el anticuerpo secundario biotilado durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Por último se realizó una incubación de amplificación del marcaje con solución ABC<sup>3</sup> durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esta última incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con tampón TrisHCl 0.1 M<sup>4</sup>.

La inmunotinción realizada con esta técnica requiere un revelado con la solución de revelado DAB<sup>5</sup>. Esta solución se añadió a cada pocillo durante 8-10 minutos y tras su eliminación se realizaron 3-4 lavados con tampón TrisHCl 0.1M<sup>3</sup>. En las muestras en las que esta solución resulta en un revelado tenue, realizamos una intensificación con níquel. Tras el revelado, las muestras en los pocillos se pueden mantener en tampón TrisHCl<sup>3</sup> a 4°C 24-48 horas.

El paso final consiste en el montaje de las muestras, que se realizó en flotación en gelatina de montaje<sup>6</sup> colocando los cortes sobre portaobjetos con la ayuda de un pincel. Las muestras así montadas se dejan secar durante 24 horas a temperatura ambiente.

Tras el montaje, hay que llevar a cabo la deshidratación de los cortes para evitar su degradación. Es un proceso seriado que se realizó sumergiendo los portaobjetos en tres cubetas con diferentes alcoholes: primero alcohol 96%, a continuación alcohol 100% y por último xilol. En cada alcohol se realizaron 2 inmersiones de 5 minutos cada una. Tras la última inmersión, cada portaobjetos se dejó secar al aire.

Las muestras se conservaron cubriéndolas con una gota de medio de montaje DePex® y un cubreobjetos.

---

<sup>1</sup> Solución Avidina-Biotina. Se prepara en tampón PB 0.1M<sup>6</sup> con un kit comercial: blocking kit avidin/biotin SP-2001, Vector Labs. Las cantidades a añadir de Avidina y Biotina se especifican en las instrucciones del kit. Se mantiene a 4°C.

<sup>2</sup> Solución de anticuerpo. Se prepara en tampón PB 0.1M<sup>6</sup> pH 7.3-7.4 y contiene BSA (Bovine Serum Albumine) 0.25%, NaN<sub>3</sub> 0.05%, carragenan 0.4% y tritón X-100 0.4%. Se mantiene a 4°C.

<sup>3</sup> Solución ABC, blocking kit avidin/biotin SP-2001, Vector Labs. Se prepara en tampón Tris-HCl<sup>7</sup> 0.1N y contiene: Tritón X-100 0.5%, Solución A (kit comercial) 0.5%, Solución B (kit comercial) 0.5%. Se prepara 1 hora antes de su utilización y se mantiene a 4°C.

<sup>4</sup> Tampón TrisHCl (Tris-clorhídrico) 0.2N pH 7.6. Se prepara en agua MilliQ y contiene Tris 0.2N. Se ajusta el pH con ácido clorhídrico 1N a 7.6.

<sup>5</sup> Solución de revelado con DAB. Se prepara en agua MilliQ con un kit comercial: DAB KIT Vector SK-4100. Las cantidades de cada reactivo a añadir en la solución y el orden se especifican en las instrucciones del kit.

<sup>6</sup> Gelatina de montaje. Se prepara en tampón Tris-HCl 0.1N<sup>8</sup> y contiene gelatina de montaje al 2.5%. Se diluye en calor y se mantiene a 4°C.

<sup>7</sup> Tampón PB (fosfato monosódico-disódico) 0.1M pH 7.3-7.4. Se prepara en agua MilliQ y contiene: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.08M. Se ajusta el pH con ácido clorhídrico a 7.3-7.4.

<sup>8</sup> Tampón TrisHCl 0.1N pH 7.6. Se prepara a partir de tampón Tris-HCl 0.2N<sup>4</sup> en agua MilliQ.



## 7.2.2 TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA SIMPLE Y DOBLE

La técnica de inmunofluorescencia se representa en la figura 40.

El primer paso de esta técnica es una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución con suero<sup>1</sup> de cabra de donde se han obtenido los anticuerpos. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón PB 0.1 M<sup>2</sup>.

### **Inmunofluorescencia simple**

Se realizó la incubación en una solución con el anticuerpo<sup>3</sup> primario durante 48 horas a 4°C. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón PB 0.1 M<sup>2</sup>. Seguidamente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, con una molécula fluorescente, durante 2 horas a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo 2º y todos los pasos posteriores se llevaron a cabo en oscuridad. Después se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno, dos con tampón PB 0.1 M<sup>2</sup> y el último con Tris-HCl 0.1N<sup>4</sup>.

### **Inmunofluorescencia doble**

Para esta técnica empleamos anticuerpos monoclonales y policlonales, que no poseían reactividad cruzada, para poder estudiar simultáneamente ambas poblaciones.

Se realizó la incubación en una solución<sup>3</sup> con una mezcla (cóctel) de dos anticuerpos primarios durante 48 horas a 4°C. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón PB 0.1 M<sup>2</sup>. Después se llevó a cabo una segunda incubación con una mezcla de dos anticuerpos secundarios, cada uno de ellos con una molécula fluorescente de diferente color, durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno, dos con tampón PB 0.1 M<sup>2</sup> y el último con Tris-HCl 0.1N<sup>4</sup> también en oscuridad.

---

<sup>1</sup> Solución de suero. Se prepara en tampón PB 0.1M<sup>2</sup> pH 7.3-7.4 a una dilución 1/50. Contiene BSA (Bovine Serum Albumine) 0.25%, y NaN<sub>3</sub> 0.1%. Se mantiene a 4°C.

<sup>2</sup> Tampón PB (fosfato monosódico-disódico) 0.1M pH 7.3-7.4. Se prepara en agua MilliQ y contiene: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.08M. Se ajusta el pH con ácido clorhídrico a 7.3-7.4.

<sup>3</sup> Solución de anticuerpo. Se prepara en tampón PB 0.1M<sup>1</sup> pH 7.3-7.4 y contiene BSA (Bovine Serum Albumine) 0.25%, NaN<sub>3</sub> 0.05%, carragenan 0.4% y tritón X-100 0.4%. Se mantiene a 4°C.

<sup>4</sup> Tampón TrisHCl (Tris-clorhídrico) 0.1N pH 7.6. Se prepara en agua MilliQ y contiene Tris 0.1N. Se ajusta el pH con ácido clorhídrico 1N a 7.6

Las muestras en los pocillos se pueden mantener en tampón Tris-HCl 0.1N<sup>1</sup> a 4°C un corto periodo de tiempo. El paso final consiste en el montaje de las muestras, que se realizó en flotación en Tris-HCl 0.1N<sup>1</sup> colocando los cortes sobre el portaobjetos con la ayuda de un pincel.

Las muestras se conservaron cubriéndolas con una gota de medio de montaje VectaShield® y un cubreobjetos. Se sellaron con esmalte de uñas y se almacenaron en la nevera a 4°C para prolongar la fluorescencia del marcaje.

TÉCNICA DE ABC			
Ab 1º, anti-:	Referencia	Tipo Ab	Dilución
<b>nR1</b>	Chemicon AB1516	policlonal	1/150
<b>GluR1</b>	Chemicon AB1504	policlonal	1/100
<b>GluR2/3</b>	Chemicon AB1506	policlonal	1/100
<b>CB</b>	Chemicon AB1508	monoclonal	1/1000
<b>PV</b>	Sigma P-3171	monoclonal	1/1000
<b>nNOS</b>	Chemicon AB5380	policlonal	1/500
<b>NeuN</b>	Chemicon MAB377	monoclonal	1/1000
Ab 2º			Dilución
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey anti-rabbit IgG (H+L). Jackson Immunoresearch 715-065-152			1/150
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey anti-mouse IgG (H+L). Jackson Immunoresearch 715-065-151			

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA			
Ab 1º, anti-:	Referencia	Tipo Ab	Dilución
<b>PV</b>	Sigma P-3171	monoclonal	1/1000
<b>nNOS</b>	Chemicon AB5380	policlonal	1/500
Ab 2º			Dilución
Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody. Molecular Probes			1/500
Alexa Fluor®594 goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody. Molecular Probes			

Tabla 1. Detalle de los anticuerpos empleados en las técnicas de tinción inmunohistoquímica para el estudio neuroanatómico.

<sup>1</sup> Tampón TrisHCl (Tris-clorhídrico) 0.1N pH 7.6. Se prepara en agua MilliQ y contiene Tris 0.1N. Se ajusta el pH con ácido clorhídrico 1N a 7.6.

### 7.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Para la observación de las muestras para el estudio neuroanatómico se utilizó un microscopio Zeiss Axioskop® acoplado a un equipo de epifluorescencia, para el análisis de las muestras preparadas mediante la técnica de inmunofluorescencia simple, con los siguientes filtros: filtro EX 510/60, DM 575 para visualizar la emisión del fluoróforo Alexa fluor 594 y filtro EX 450/90, DM 505 para poder observar la emisión del fluoróforo Alexa Fluor 488. Este microscopio está también acoplado a una cámara Olympus DP70® para la obtención de fotografías. La captura de imágenes se realizó con el programa informático Motic Images Advanced 3.2®.

Las muestras preparadas mediante la técnica de fluorescencia doble fueron analizadas con un Microscopio Láser Confocal Leika TCS SP2 AOBS.

El tratamiento de las imágenes para ajustar el brillo y el contraste se llevó a cabo con el programa Adobe Photoshop 7.0®.

Las áreas cerebrales seleccionadas para realizar el estudio fueron el hipocampo dorsal y ventral, la amígdala basolateral, el septo, la corteza prefrontal medial, la corteza parietal, el núcleo accumbens y el cuerpo estriado. Se localizaron en cortes sagitales siguiendo el atlas estereotáxico de PAXINOS Y WATSON (*Paxinos G., 1998*) (Figuras 41, 42).

En cada una de las muestras se determinaron por conteo celular las diferencias en la densidad de marcaje obtenida con los diferentes anticuerpos empleados en cada caso: calbindina, GluR1, GluR2/3, NeuN, nNOS, nR1 y parvalbúmina. Los datos obtenidos en el análisis neuroanatómico se expresaron en nº de células marcadas / mm<sup>2</sup>.



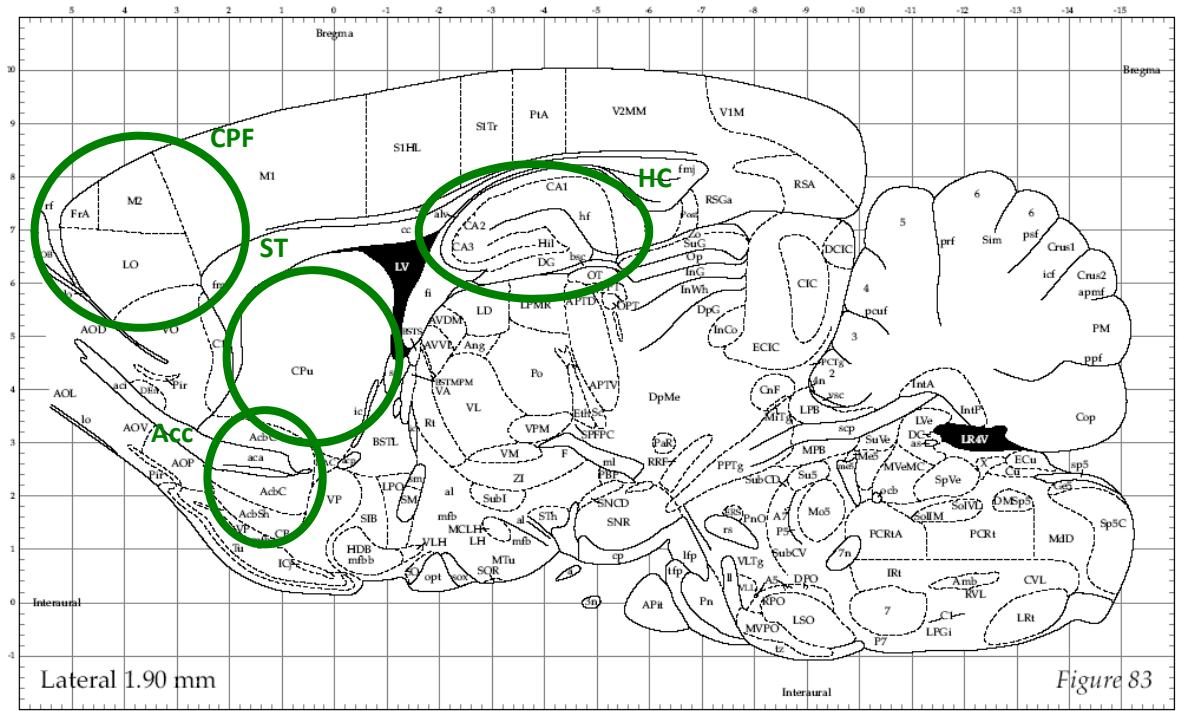
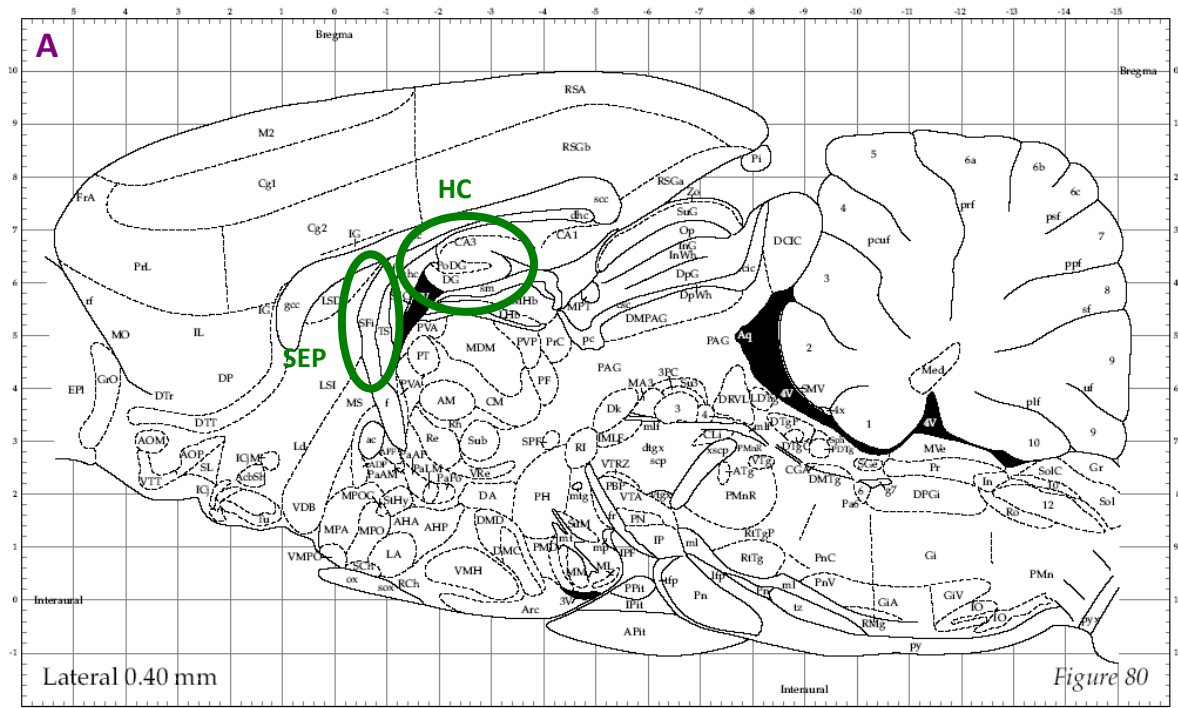


Fig. 42. Vista de secciones sagitales mediales del encéfalo de rata. Extraído de Paxinos y Watson (1998).

A: nivel de corte medial para la observación del septo (SEP en la imagen) y del hipocampo (HC en la imagen).

B: nivel de corte medial para la observación de las corteza prefrontal medial (CPF en la imagen), del hipocampo (HC en la imagen), del núcleo accumbens (Acc en la imagen) y del cuerpo estriado (ST en la imagen).

## 8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0.

Se estudió el efecto de los factores sexo y tratamiento sobre el conjunto de datos obtenidos mediante pruebas no paramétricas y análisis de varianza. Antes de dichas pruebas, todas las variables del estudio se sometieron a un test de normalidad (mediante el estadístico Kolmogorov-Smirnov) y de igualdad de varianza u homocedasticidad (mediante el contraste de Levene).

En todos los casos se realizó un análisis no paramétrico entre dos muestras independientes aplicando el estadístico U de Mann-Whitney.

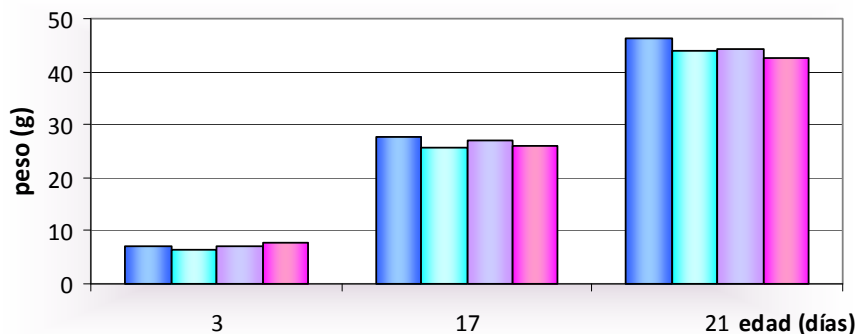
Las variables en las que la distribución de datos era normal y homocedástica fueron sometidas a un estudio paramétrico de análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores. En los casos en los que se observó interacción entre los dos factores estudiados, las diferencias entre grupos experimentales se determinaron mediante un análisis PostHoc. Se empleó el estadístico Bonferroni en los casos de muestras homocedásticas y el estadístico T2 o de Tamhane en el caso de muestras no homocedásticas.

En todos los casos el grado de significación utilizado fue del 95%.

# **RESULTADOS**

# 1 CONTROL DEL PESO

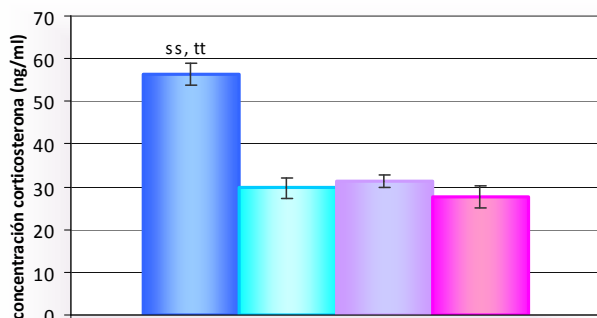
Como se observa en la gráfica 1, no se han encontrado diferencias significativas en el peso de los animales debido a la separación materna realizada entre los días PN 3-14.



Gráfica 1. Peso (g).

# 2 VALORACIÓN DE CORTICOSTERONA

Como muestra la gráfica 2, los machos PN 15 separados de la madre presentan una disminución muy significativa de la concentración de corticosterona. En los animales control esta concentración es mayor en los machos que en las hembras, sin embargo, este dimorfismo sexual no se observa en los animales SM. Los valores de la concentración de corticosterona en plasma están detallados en la tabla 2.



Gráfica 2. Concentración de corticosterona en plasma (ng/ml).

- machos control
- machos SM
- hembras control
- hembras SM

**CONCENTRACIÓN CORTICOSTERONA (ng/ml)**

		control	SM
<b>MACHO</b>	control	56,41 ± 2,54 ss (p=0,003), tt (p=0,002)	29,67 ± 2,35
	SM		
<b>HEMBRA</b>	control	31,46 ± 1,45	27,56 ± 2,49
	SM		

Tabla 2. Concentración de corticosterona en plasma (ng/ml).

“s”, “t” indica diferencias significativas (p<0.05, U<0.05) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas (p<0.01, U<0.01), “sss”, “ttt” altamente significativas (p<0.001, U<0.001).

### 3 ESTUDIO COMPORTAMENTAL

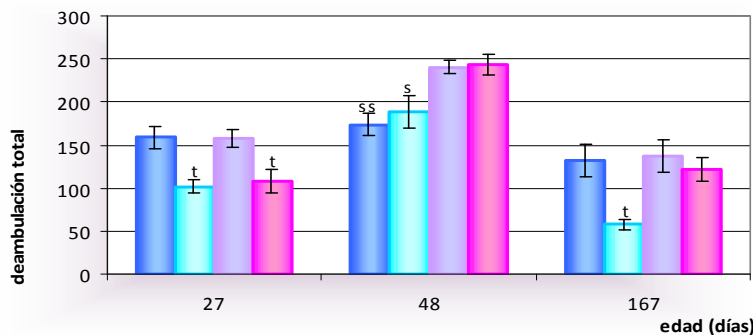
#### 3.1 PROCESOS COGNITIVOS EN EL CAMPO ABIERTO

##### 3.1.1 ACTIVIDAD MOTORA

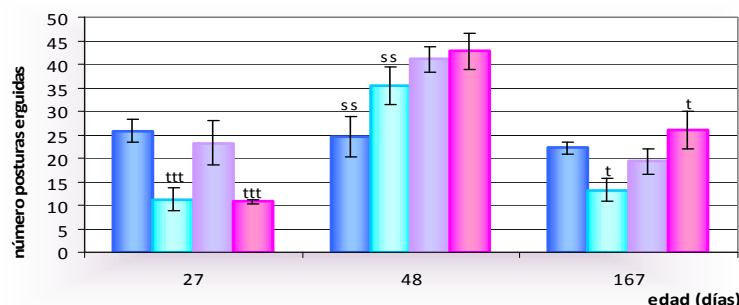
La actividad motora de los animales control a lo largo de la edad varía en función del sexo, de manera que se mantiene estable en los machos pero presenta un pico máximo en las hembras en la adolescencia tardía, cuando aparece un dimorfismo sexual.

La separación materna afecta a la actividad motora de los animales a corto plazo y la modifica de manera dependiente del sexo en la edad adulta (gráficas 3 y 4; tablas 3 y 4 en el ANEXO).

En la adolescencia temprana, tanto la deambulación total como el número de posturas erguidas de los animales SM de ambos sexos están significativamente disminuidas con respecto a los controles. En la edad adulta, los machos SM presentan una disminución de ambos parámetros y las hembras SM, sin embargo, muestran un incremento del número de posturas erguidas.



Gráfica 3.



Gráfica 4.

■ machos control      ■ machos SM  
■ hembras control      ■ hembras SM

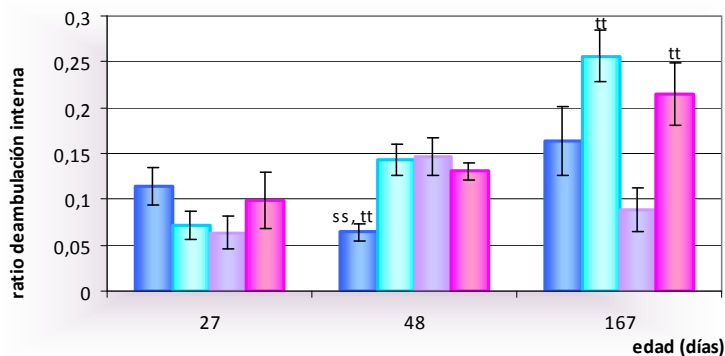
“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

### 3.1.2 COMPORTAMIENTO IMPULSIVO

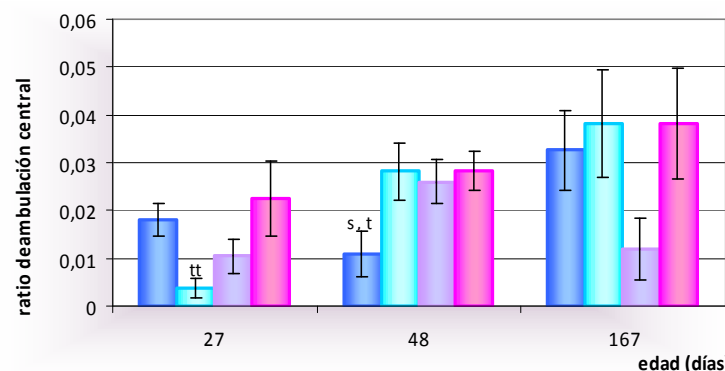
El comportamiento impulsivo de los animales control varía a lo largo del desarrollo de manera diferente en función del sexo: en la adolescencia tardía se observa el pico de impulsividad mínima en los machos y máxima en las hembras, apareciendo en esta edad un dimorfismo sexual.

La separación materna induce alteraciones en el comportamiento impulsivo, más patentes en los machos (gráficas 5 y 6; tablas 5 y 6 en el ANEXO): en el transcurso de la adolescencia se produce un aumento de su impulsividad que se mantiene al alcanzar la edad adulta. En la adolescencia temprana, los machos SM presentan una disminución significativa de su deambulación central. En la adolescencia tardía se observa un incremento significativo de su impulsividad, desapareciendo en los animales separados el dimorfismo sexual que caracteriza a los animales control en esta etapa del desarrollo.

En la edad adulta, en PN 167, la separación materna produce un aumento del ratio de deambulación interna de los animales separados de ambos sexos.



Gráfica 5.



Gráfica 6.

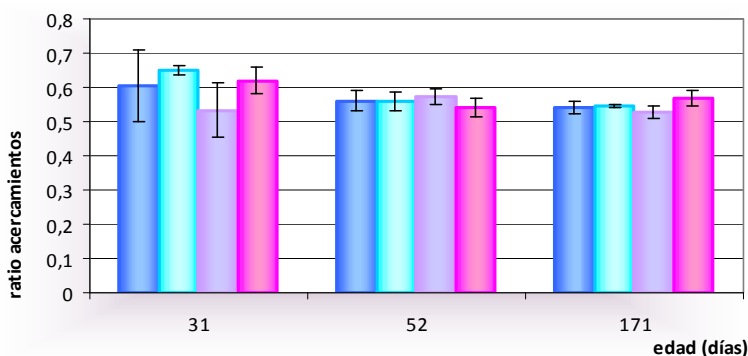
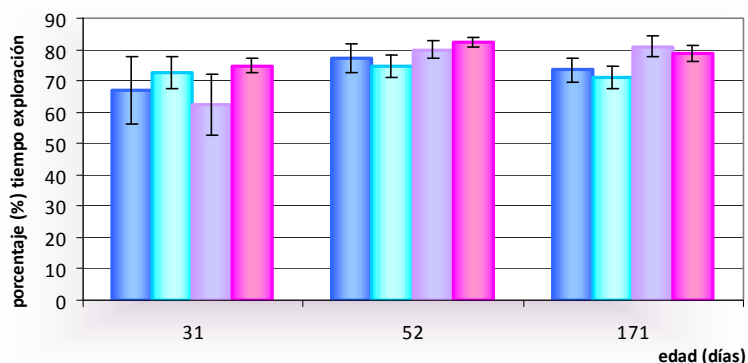
■ machos control                      ■ machos SM  
 ■ hembras control                    ■ hembras SM

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

### 3.1.3 MEMORIA DE RECONOCIMIENTO NO ESPACIAL

Como se muestra en las gráficas 7 y 8, la memoria de reconocimiento de objetos no presenta diferencias significativas debidas a la separación materna en ninguna de las edades estudiadas. No se observan diferencias en esta capacidad cognitiva debidas al sexo de los animales ni a su edad, y en todos los casos el porcentaje de tiempo de exploración está por encima del 60%, lo que indica la capacidad de los animales de discernir entre dos objetos diferentes.

El ratio de acercamientos al objeto nuevo con respecto al total y el porcentaje de tiempo de exploración del mismo durante la segunda fase de la prueba de reconocimiento de objetos están detallados en las tablas 7 y 8 respectivamente en el ANEXO.



Gráficas 7, 8.

Porcentaje de tiempo de exploración y ratio de acercamientos al objeto nuevo en la segunda fase de la prueba de reconocimiento de objetos.

- machos control
- machos SM
- hembras control
- hembras SM

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

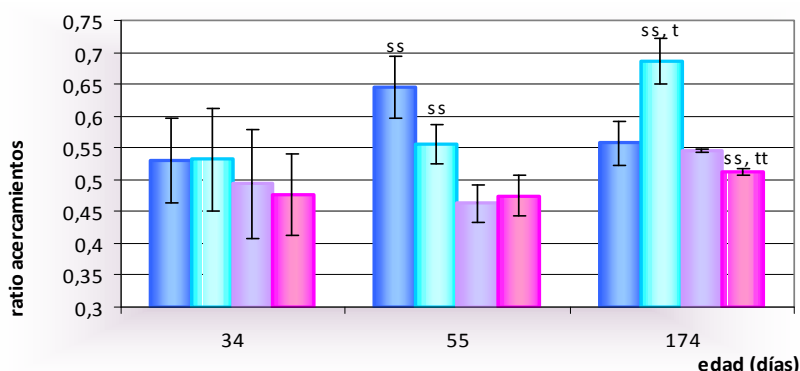
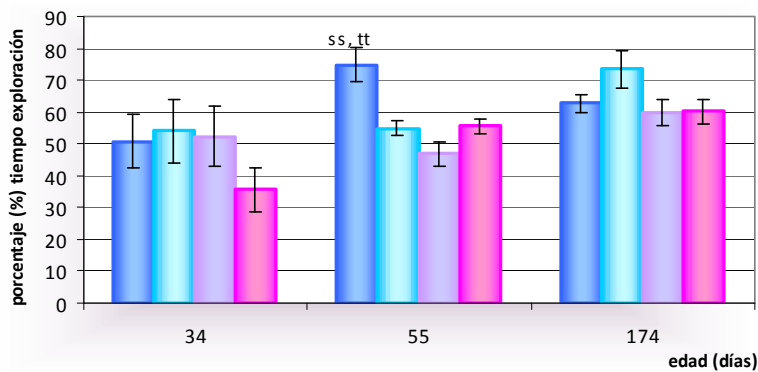
### 3.1.4 MEMORIA DE RECONOCIMIENTO ESPACIAL

En los animales control, la memoria espacial varía a lo largo de la edad de manera distinta según el sexo de los animales. Mientras que en hembras no encontramos cambios significativos, en machos la capacidad de localización de objetos presenta un pico en la adolescencia tardía que marca un dimorfismo sexual en los animales control.

Debido al estrés postnatal, los días PN 55 y 174 hemos observado alteraciones de la memoria espacial diferentes según el sexo de los animales (gráficas 9 y 10; tablas 9 y 10 en el ANEXO).

En machos SM, la capacidad de reconocimiento espacial está disminuida en la adolescencia tardía, y por el contrario, en la edad adulta ésta muestra una mejoría.

En las hembras SM no hay variaciones significativas a lo largo de la adolescencia, pero en la edad adulta se observa una disminución significativa del ratio de acercamientos al objeto cambiado y se hace patente un dimorfismo sexual en los animales separados que no presentan los animales control.



Gráficas 9, 10.

Porcentaje de tiempo de exploración y ratio de acercamientos al objeto cambiado de ubicación en la segunda fase de la prueba de localización de objetos.

- machos control
- machos SM
- hembras control
- hembras SM

"s", "t" indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, "ss", "tt" muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), "sss", "ttt" altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

## 3.2 MEMORIA ESPACIAL EN EL LABERINTO RADIAL DE 8 BRAZOS

### 3.2.1 APRENDIZAJE

El número de sesiones de entrenamiento requeridas por cada animal en el proceso de aprendizaje está detallado en la tabla 11 en el ANEXO.

Como se observa en la gráfica 11, la separación materna no tiene ningún efecto significativo en el aprendizaje de los animales.

### 3.2.2 ADQUISICIÓN DE MEMORIA

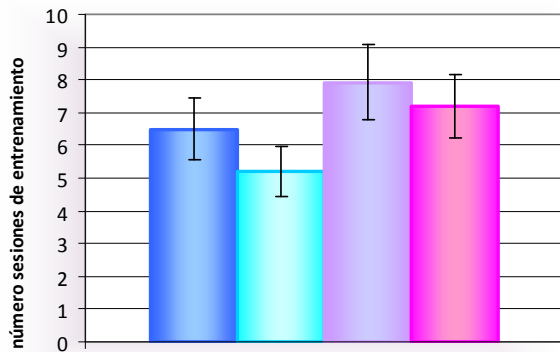
La adquisición de memoria de los machos mejora tras la separación materna. El dimorfismo sexual que establece una mejor capacidad cognitiva por parte de las hembras en los animales control no aparece en los animales SM (gráfica 12; tabla 12 en el ANEXO).

Los machos SM presentan una mejoría en la memoria de referencia que induce la aparición de un dimorfismo sexual en los animales separados maternalmente que no existe en los animales control. La memoria de trabajo sin embargo no presenta ningún cambio.

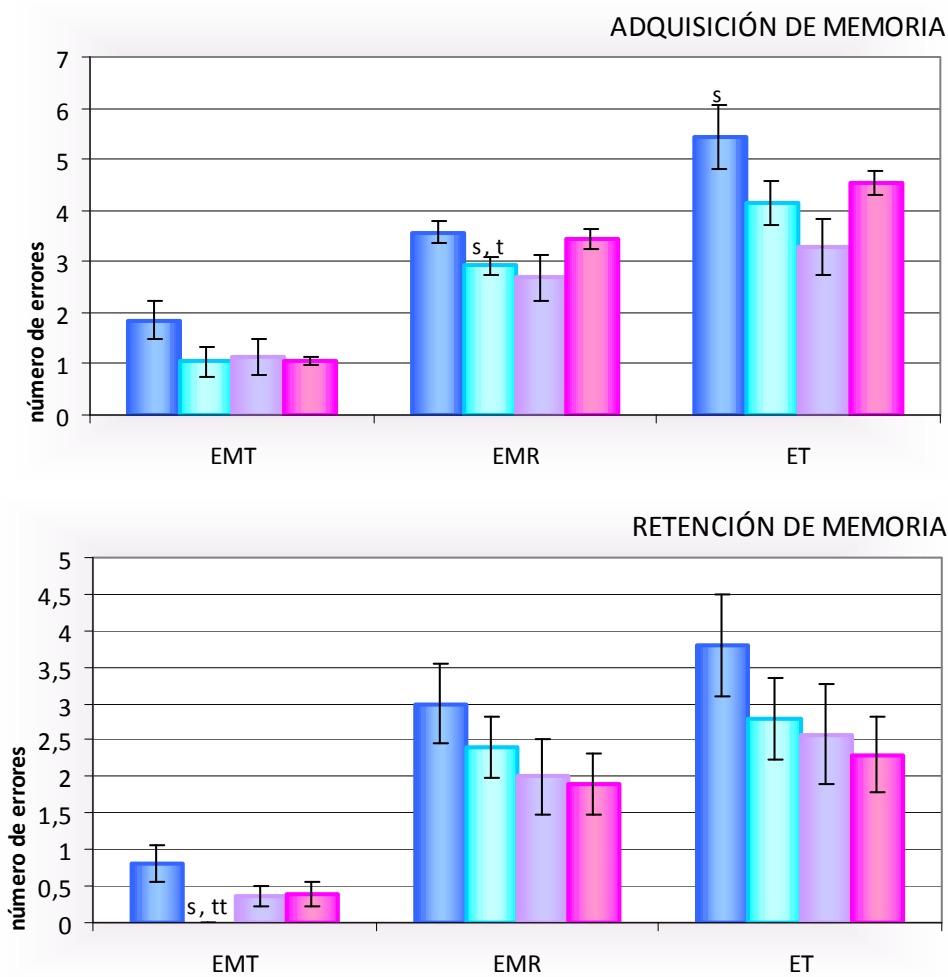
### 3.2.3 CONSOLIDACIÓN DE MEMORIA

Como se puede observar en la gráfica 13, la separación materna no tiene ningún efecto significativo a largo plazo en la memoria espacial de los animales (tabla 13 en el ANEXO).

Sin embargo, la memoria de trabajo de los machos separados mejora significativamente tras el periodo de consolidación de memoria, estableciéndose un dimorfismo sexual en este tipo de memoria que no estaba presente en los animales control.



Gráfica 11. Número de sesiones de entrenamiento realizadas en el laberinto radial de 8 brazos.



Gráficas 12, 13. Número de errores cometidos en las pruebas de adquisición y retención de memoria en el laberinto radial de 8 brazos. EMT: errores de memoria de trabajo. EMR: errores de memoria de referencia. ET: errores totales.

- machos control
- machos SM
- hembras control
- hembras SM

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

## 4 POBLACIÓN NEURONAL. INMUNOMARCAJE CONTRA NEUN

El estudio neuroanatómico en el día postnatal 26 con anticuerpos contra una proteína específica del núcleo neuronal, NeuN, pone de manifiesto alteraciones en la densidad neuronal hipocampal, de la corteza prefrontal y del estriado ventral en las hembras, debidas a la separación materna. En los machos, el estrés temprano no induce modificaciones significativas en el número de neuronas de las distintas regiones cerebrales estudiadas.

En las áreas en las que se observan variaciones, aparece un incremento de este marcador en las hembras SM, haciéndose patente un dimorfismo sexual en los animales sometidos a separación materna que no se observa en los animales control (ver tabla 14 en el ANEXO).

La densidad neuronal de las hembras SM está aumentada en el **hipocampo** (figura 43), principalmente en la capa piramidal del Asta de Amón y en la capa granular del giro dentado. Asimismo, se observa un aumento del número de neuronas en la **corteza prefrontal medial** (figura 44) y en el **núcleo accumbens** (figura 45). En la amígdala, sin embargo, no se observan diferencias entre los cuatro grupos de experimentación.

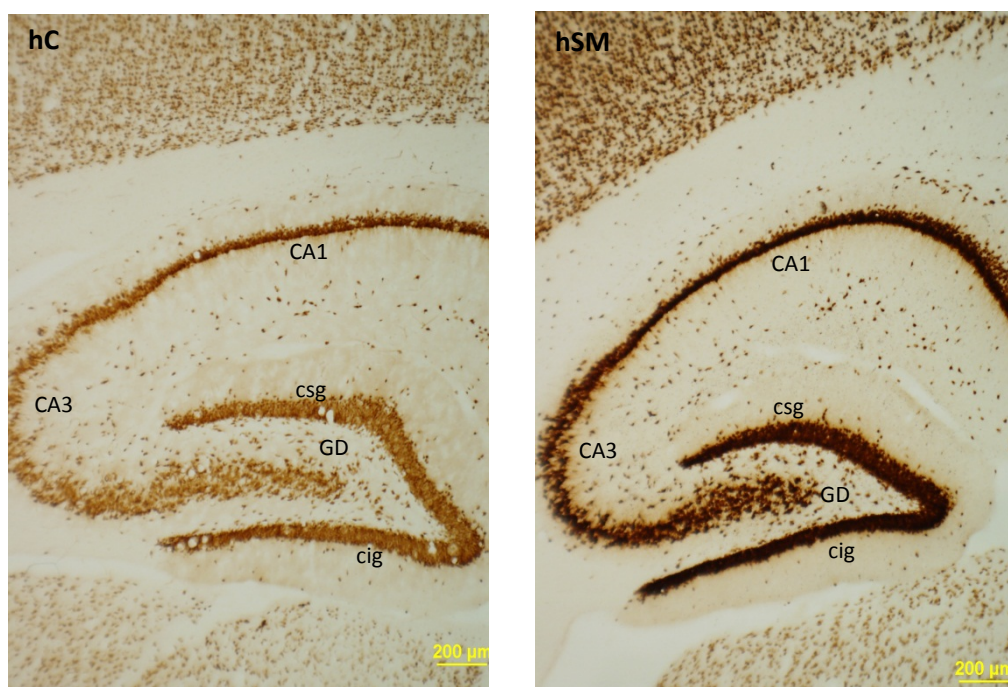


Fig. 43. Microfotografías de inmunotinción con NeuN en cortes sagitales de hipocampo de rata en PN26.

En la imagen hSM se observa un inmunomarcaje más intenso en todas las regiones (CA1-3) y capas del Asta de Amón, así como en la capa granular del giro dentado en comparación con hC.

hC: hembra control; hSM: hembra separada.

GD: giro dentado; csg: capa supra granular del giro dentado; cig: capa infra granular del giro dentado.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

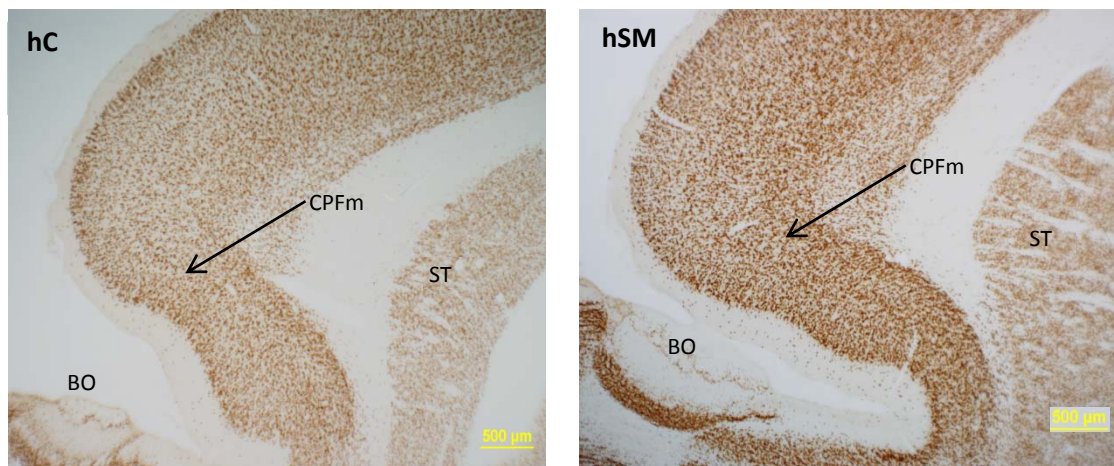


Fig. 44. Microfotografías de inmunotinción con NeuN en cortes sagitales de corteza prefrontal de rata en PN26. Obsérvese la mayor densidad neuronal en hSM respecto a hC.

hC: hembra control; hSM: hembra separada.

BO: bulbo olfatorio; CFPm: corteza prefrontal medial; ST: estriado.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

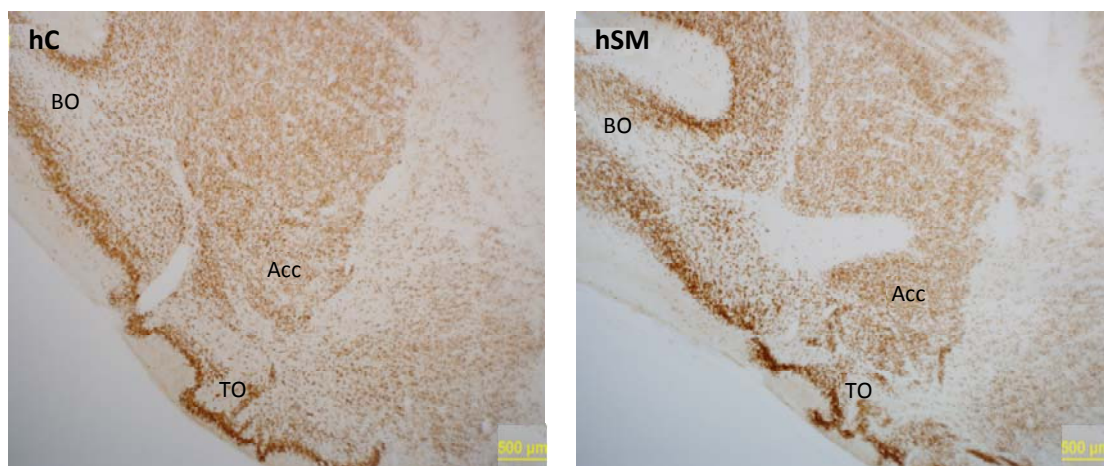


Fig. 45. Microfotografías de inmunotinción con NeuN en cortes sagitales mostrando el núcleo accumbens en el estriado de rata en PN26. Se observa una mayor densidad de marcaje en hSM.

hC: hembra control; hSM: hembra separada.

Acc: núcleo accumbens; BO: bulbo olfativo; TO: tubérculo olfativo.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

## 5 SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN AMINOACIDÉRGICOS

A lo largo del desarrollo, las concentraciones de GABA y glutamato varían siguiendo un mismo patrón en ambos casos, con un marcado dimorfismo sexual.

El estrés postnatal inducido por separación materna provoca cambios, dependientes del sexo, en los niveles de estos neurotransmisores, especialmente patentes en las edades tempranas (PN15 y PN34). De manera general estos cambios no son permanentes y en la edad adulta no se observan diferencias significativas en el contenido de estos aminoácidos, a excepción del contenido de GABA en el hipocampo ventral y de glutamato en el septo de las hembras.

Con respecto a la concentración de taurina, en los machos control se observa el mismo patrón a lo largo del desarrollo que el descrito para los neurotransmisores GABA y glutamato en el hipocampo y en el septo. Sin embargo, su evolución es diferente en las hembras control y el estriado de ambos sexos. La separación materna induce diferentes alteraciones en la concentración de este aminoácido según el sexo de los animales; en machos produce variaciones de los niveles de taurina en la edad postnatal temprana o en la adolescencia tardía, en función de la región cerebral, que revierten a largo plazo, y en las hembras provoca en todas las áreas estudiadas una disminución de su concentración en la edad adulta.

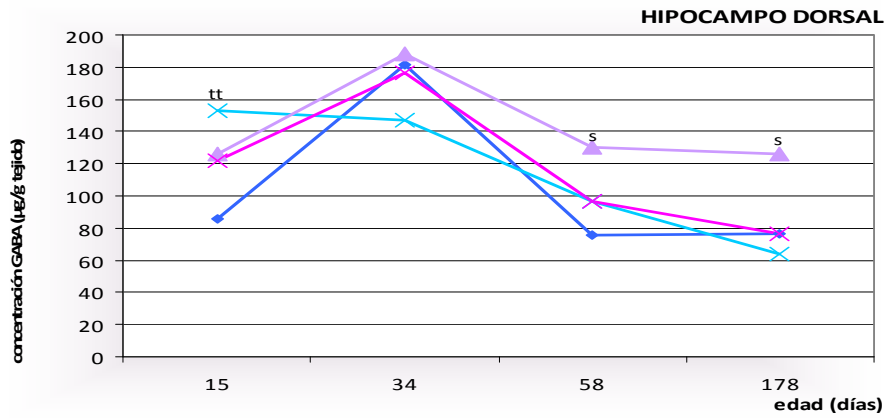
### 5.1 GABA

Las concentraciones de GABA en las ratas controles a lo largo de desarrollo presentan su valor máximo a los 34 días de edad en ambos sexos en todas las áreas cerebrales estudiadas. A partir de esta edad observamos que la evolución en el contenido de este aminoácido es diferente según el sexo de los animales: en los machos los niveles de GABA disminuyen en la adolescencia y en las hembras, salvo en el septo, se mantienen estables. Estas diferencias en el contenido de GABA marcan la existencia de un dimorfismo sexual en la adolescencia tardía en el hipocampo y en el estriado, que en el caso del hipocampo dorsal, se mantiene en la edad adulta. Los valores de concentración de GABA en las regiones cerebrales estudiadas en los distintos momentos del desarrollo están detallados en las tablas 18-21 del ANEXO.

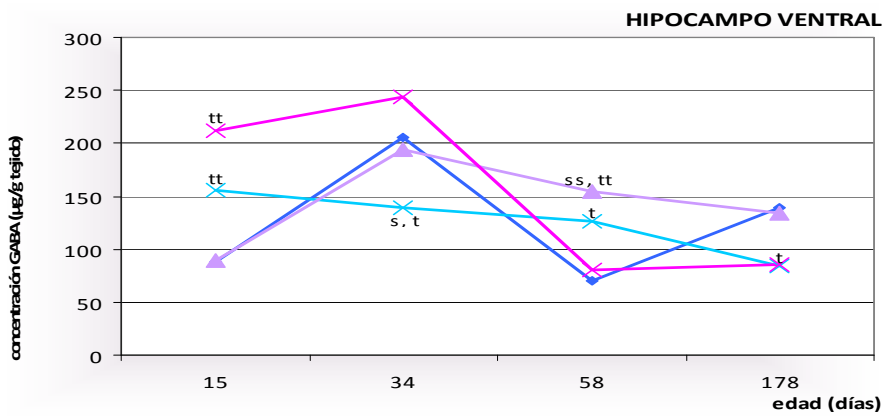
Las ratas que han sufrido el estrés temprano de la separación materna presentan alteraciones en la evolución a lo largo de la edad de los niveles de GABA, con diferencias según la región encefálica y el sexo. Cabe destacar que en el adulto sólo se observan diferencias debidas a la separación en el hipocampo ventral.

Los niveles de GABA en los **machos SM** se mantienen estables a lo largo del desarrollo en las regiones encefálicas estudiadas, y no se observa en la adolescencia temprana el pico de concentración máxima que presentan los machos control. Esta diferencia en el contenido de GABA con respecto a la concentración variable de los machos control se pone de manifiesto de manera patente en el **hipocampo ventral** en todas la edades estudiadas (gráfica 15); en PN15 se observa un incremento de GABA del 75%, en PN34 una disminución del 30%, en PN58 un incremento del 80% y en la edad adulta una disminución del 40%. En la adolescencia temprana los machos sometidos a separación materna presentan una reducción de los niveles de GABA en el **hipocampo dorsal** (gráfica 14) y en el **septo** (gráfica 16).

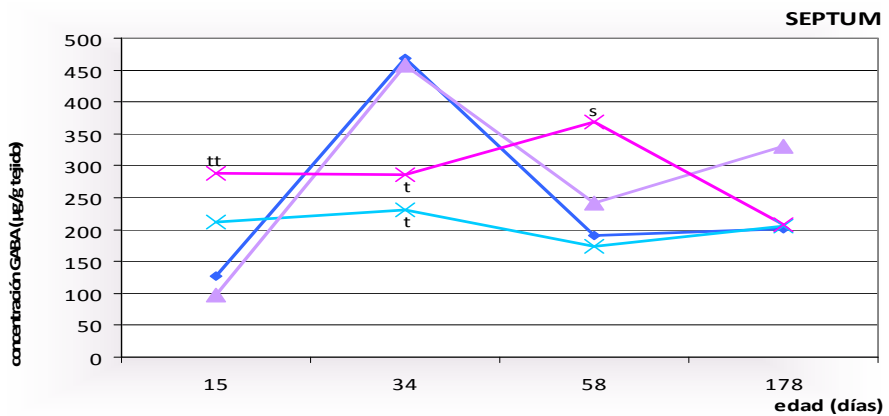
En las **hembras SM**, al contrario que en las hembras control, la concentración de GABA no varía hasta PN34 en las cuatro áreas encefálicas estudiadas. En el hipocampo dorsal y ventral y en el estriado, a lo largo de la adolescencia disminuye hasta alcanzar en PN58 los niveles típicos de adulto (gráficas 14, 15 y 17). Tanto en el **hipocampo ventral** como en el **estriado**, en PN15 la concentración de GABA es el doble que la observada en los controles, y en la adolescencia tardía es la mitad (gráficas 15 y 17). Esta disminución es patente también en las hembras adultas en el hipocampo ventral, pero no se observa en el estriado. En el **septo** el contenido de GABA es estable hasta la adolescencia tardía, cuando se observa un dimorfismo sexual que no presentan los animales control. Desde PN58 hasta la edad adulta se produce una disminución de este neurotransmisor (gráfica 16). Nuestros resultados muestran una concentración de GABA casi triplicada con respecto a la de las hembras control en PN15 y en PN34 una marcada disminución.



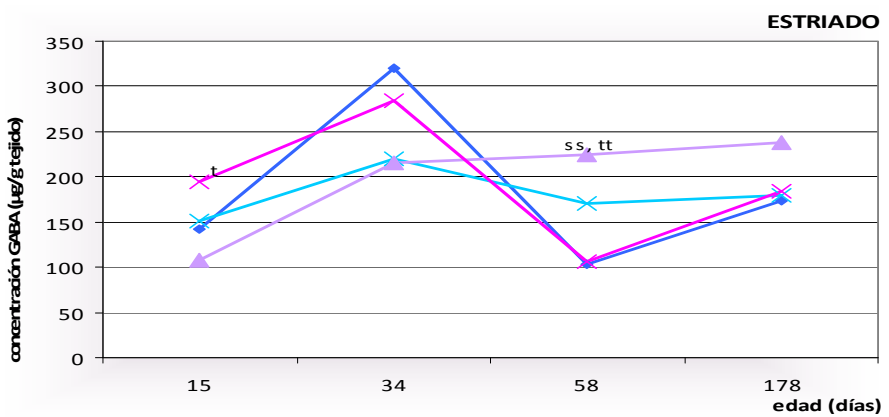
Gráfica 14.



Gráfica 15.



Gráfica 16.



Gráfica 17.

- ◆ machos control                      × machos SM
- ▲ hembras control                    × hembras SM

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

## 5.2 GLUTAMATO

En los animales control, durante las primeras etapas de la vida no existen diferencias sexuales en los niveles de glutamato, y éstos se incrementan desde antes del destete hasta la adolescencia temprana. En este momento del desarrollo, la concentración de glutamato se estabiliza en las hembras control, pero sin embargo en los machos se produce una disminución del glutamato en la adolescencia tardía, cuando se alcanzan los niveles típicos de adulto, y aparece un dimorfismo sexual en el hipocampo y en el estriado.

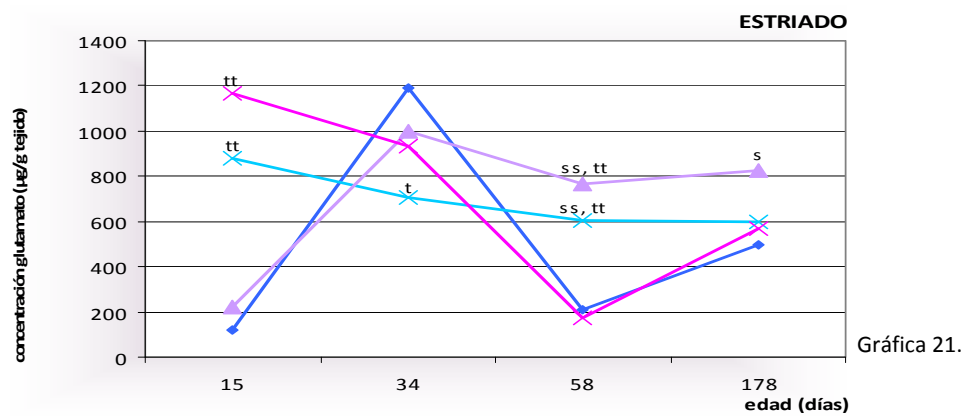
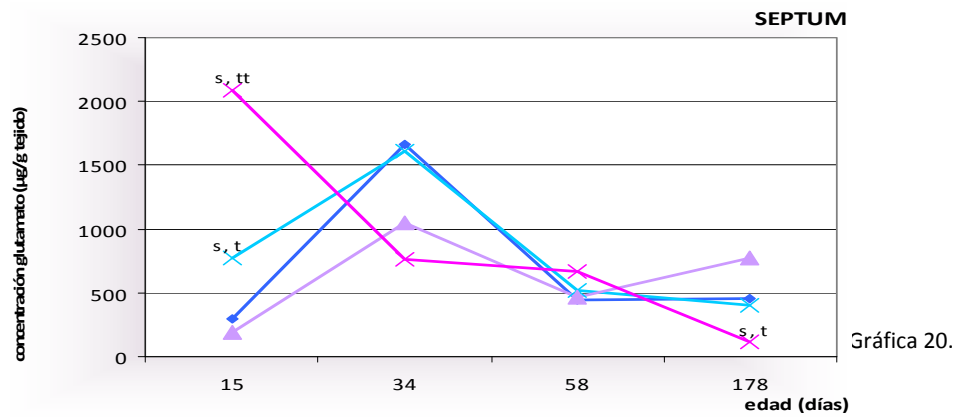
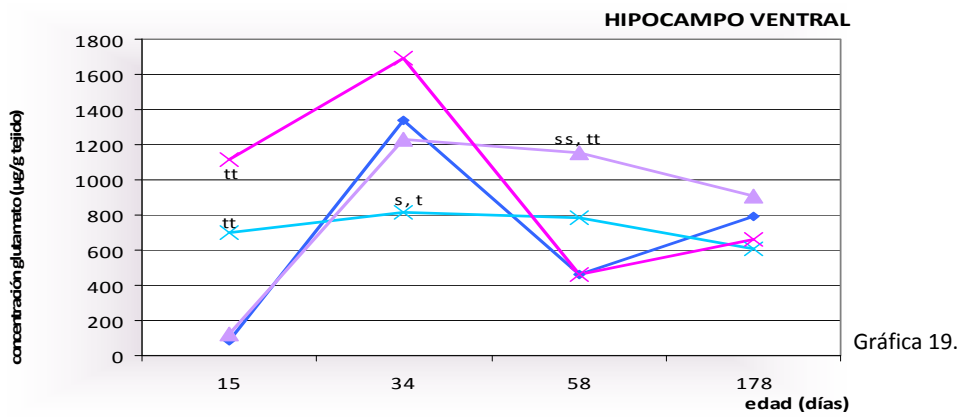
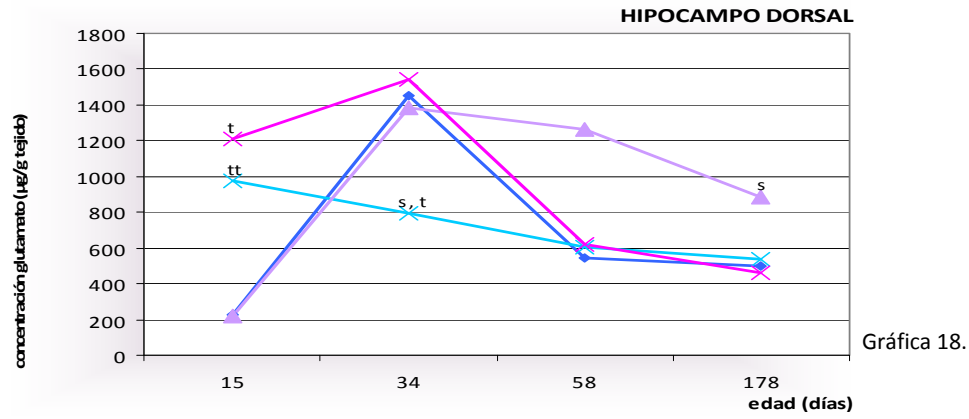
La separación materna produce cambios en la concentración de glutamato a lo largo de la edad siguiendo un patrón diferente según las áreas cerebrales estudiadas y de manera diferente en ambos sexos. En los machos se observa una estabilización de los niveles de glutamato a lo largo de la vida del animal, desapareciendo el pico característico alrededor de la adolescencia de los machos control, y en las hembras se produce una disminución tras la adolescencia temprana, cuando se estabiliza la concentración de este aminoácido.

Nuestros resultados muestran en PN15 un aumento de la concentración de glutamato de los animales SM con respecto a sus controles en ambos sexos en todas las áreas encefálicas estudiadas. Tras la separación, a lo largo del desarrollo las variaciones de los niveles de glutamato presentan diferencias sexuales y, salvo en el caso del septo, en la edad adulta no se observan cambios significativos debidos al estrés postnatal (ver tablas 22-25 en el ANEXO).

Cabe destacar que a pesar de la variabilidad según las áreas, los incrementos observados en PN15 son muy elevados. En el **hipocampo** y el **estriado** oscilan entre el 400-800%; en el **septo** el aumento varía desde un 200% en los machos SM a un 1100% en las hembras SM, haciéndose patente un dimorfismo sexual (gráfica 20).

En los **machos SM**, los niveles de glutamato en el **hipocampo** y el **estriado** están disminuidos alrededor de un 40% en la adolescencia temprana, presentando los animales separados un dimorfismo sexual que no se observa en los animales control (gráficas 18, 19 y 21). En el **estriado** además, en PN58 la concentración de glutamato casi triplica la concentración de los machos control, y se observa un dimorfismo sexual contrario al presente en los animales control.

Las **hembras SM**, sin embargo, presentan una disminución de los niveles de este aminoácido en el **hipocampo ventral** y el **estriado** en PN58 (gráficas 19 y 21). En el **septo**, los niveles de glutamato van disminuyendo a lo largo de la edad alcanzando el nivel mínimo en el adulto, cuando la concentración de este aminoácido está significativamente disminuida con respecto a la de las hembras control y a la de los machos SM, invirtiéndose el dimorfismo sexual existente antes del destete (gráfica 20).



◆ machos control      × machos SM  
 ▲ hembras control      × hembras SM

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

### 5.2.1 RECEPTORES DE GLUTAMATO

El estudio neuroanatómico de inmunomarcaje contra los receptores GluR1, GluR2/3 y NR1 revela que la separación materna tiene efectos sobre la subunidad GluR1 de los receptores AMPA de glutamato en la corteza prefrontal de las hembras. Sin embargo, no se observan variaciones en el marcaje de las subunidades GluR2/3 de los receptores AMPA ni sobre la subunidad NR1 de los receptores NMDA de glutamato.

#### *GluR1*

La distribución de la subunidad GluR1 del receptor AMPA en la **corteza prefrontal** presenta un dimorfismo sexual en los animales control el día PN26. En los machos control hay un mayor marcaje en las capas II y III con respecto a las hembras del mismo grupo. En las hembras SM se observa un aumento del número de células con inmunorreactividad positiva para GluR1, de manera que los animales separados no muestran las diferencias sexuales que presentan los controles (figura 46; tabla 15 en el ANEXO).

En el resto de las áreas estudiadas no se observan diferencias en la distribución de esta subunidad del receptor AMPA.

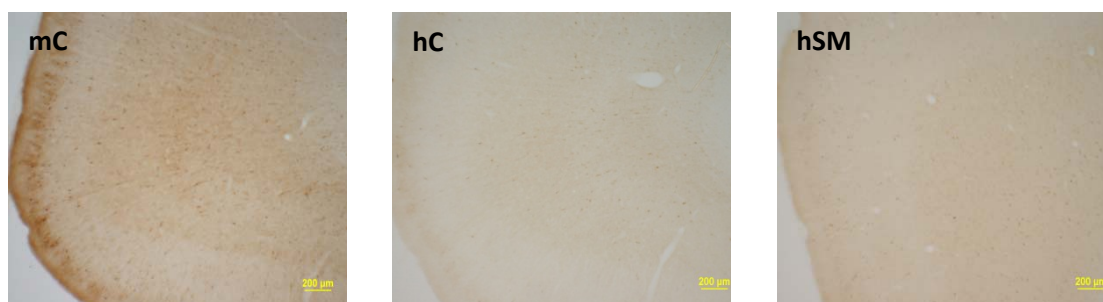


Fig. 46. Microfotografías de inmunotinción de la subunidad GluR1 del receptor AMPA de glutamato en la corteza prefrontal de rata el día PN26 en secciones sagitales. En las imágenes mC y hSM es patente un mayor marcaje con respecto a hC.

hC: hembra control; hSM: hembra separada; mC: macho control.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

*GluR2/3*

La distribución de la subunidad GluR2/3 del receptor AMPA no presenta diferencias debidas al sexo ni a la separación materna en las diferentes áreas cerebrales estudiadas el día PN26.

En la figura 47 se muestra el marcaje de la subunidad GluR2/3 el hipocampo y la corteza prefrontal, donde no se aprecian diferencias significativas.

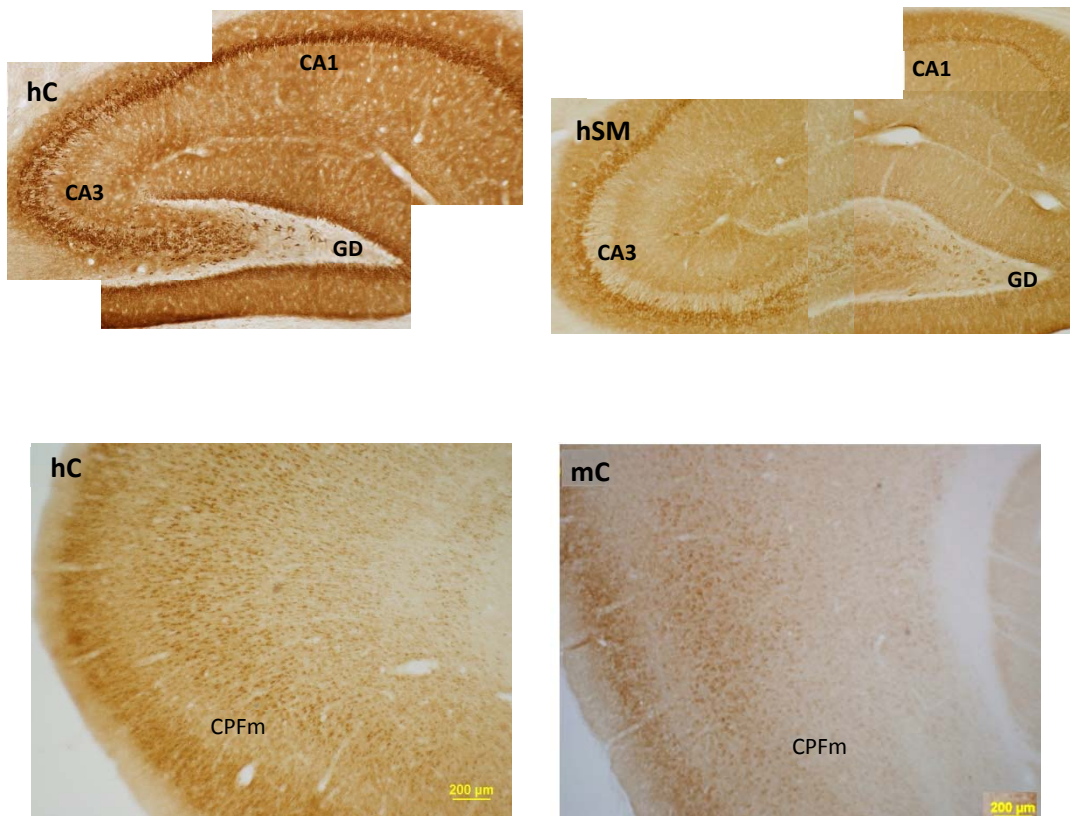


Fig. 47. Microfotografías de inmunotinción de la subunidad GluR2/3 del receptor AMPA de glutamato en secciones sagitales mostrando fotomontajes del hipocampo (imagenes de arriba) y la corteza prefrontal (imagenes de abajo) de rata en PN26. En ninguna de las regiones se observan diferencias de marcaje.

CPFm: corteza prefrontal medial; CA1, CA3: regiones CA1, 3 del Asta de Amón; GD: giro dentado.

hC: hembra control; hSM: hembra SM; mC: macho control.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

**NR1**

La separación materna no altera la distribución de la subunidad NR1 de los receptores NMDA de glutamato el día PN26 en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas. La expresión de esta subunidad tampoco muestra diferencias debido al sexo.

En las figuras 48 y 49 se muestra el marcaje de esta subunidad en el hipocampo y el núcleo accumbens respectivamente.

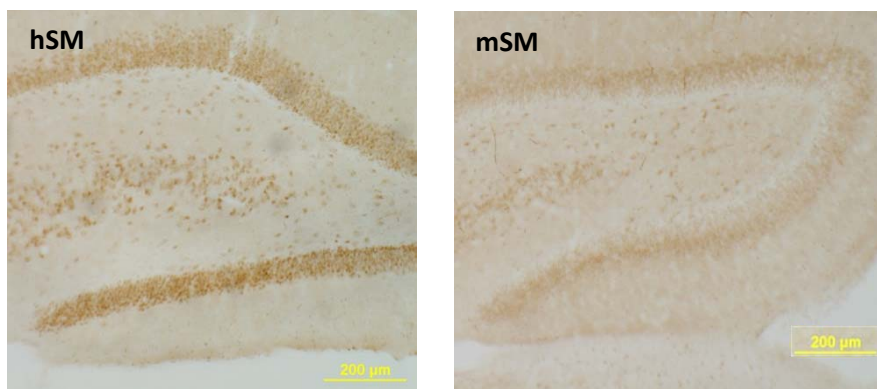


Fig. 48. Microfotografías de inmunotinción de la subunidad NR1 del receptor NMDA de glutamato en el giro dentado hipocampal de rata el día PN26 en cortes sagitales, en los que no hay diferencias de marcaje. hSM: hembra SM; mSM: macho SM.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

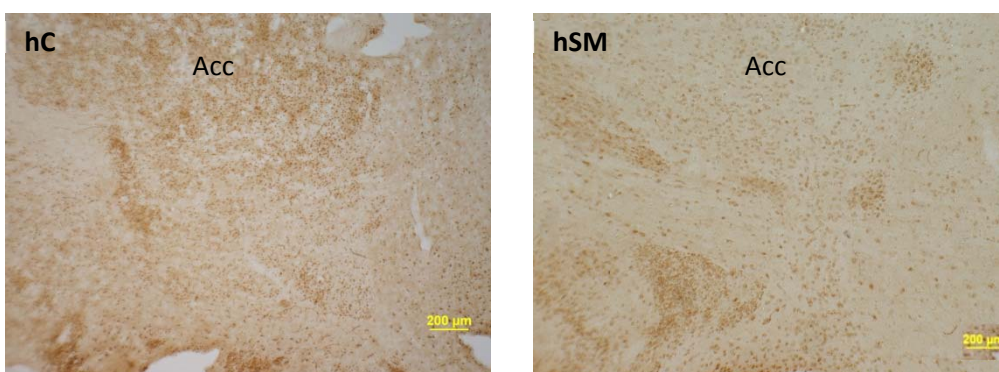


Fig. 49. Microfotografías de inmunotinción de la subunidad NR1 del receptor NMDA de glutamato en secciones sagitales de núcleo accumbens (Acc) de rata en PN26. No se observan diferencias significativas. hC: hembra control; hSM: hembra SM.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

### 5.3 EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA NEURONAL (nNOS)

El estrés postnatal temprano altera la distribución de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) en el hipocampo y en la corteza prefrontal de los machos separados. Sin embargo, el marcaje con nNOS no presenta diferencias en las hembras SM con respecto a sus controles en ninguna de las distintas regiones cerebrales estudiadas (tabla 16 en el ANEXO).

El día PN 26, el **hipocampo** presenta un dimorfismo sexual en la distribución de nNOS. El número de células nNOS+ es menor en los machos control que en las hembras control, y se hace patente en el Asta de Amón, y las capas granular y polimorfa del giro dentado. En los machos SM se observa una disminución significativa del marcaje en el AA y el giro dentado con respecto a los machos control (figura 50).

En el adulto, sin embargo, se observa un incremento del número de células nNOS+ en los machos SM con respecto a sus controles, observándose en los animales separados un dimorfismo sexual que no está presente en los controles a esta edad (figura 51). Estos resultados sugieren que las modificaciones en la expresión de la enzima nNOS en el hipocampo debidas a la separación materna son revertidas a lo largo de la vida del animal.

En la **corteza prefrontal** hay un mayor número de células nNOS+ en los machos control que en las hembras del mismo grupo en PN 26. Los machos SM muestran una disminución del marcaje en las capas II, III y V de esta región cortical, de manera que en los animales separados no se observa el dimorfismo sexual que aparece en los controles (figura 52).

En el resto de las áreas cerebrales estudiadas no se han observado diferencias debidas al sexo o a la separación materna.

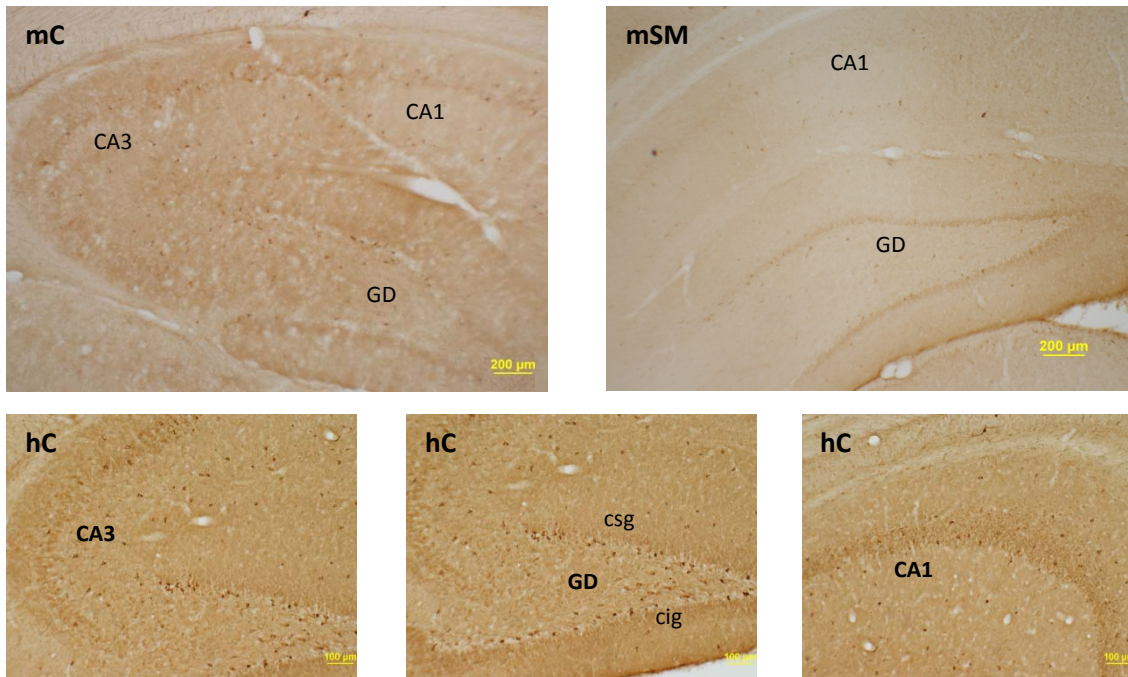


Fig. 50. Microfotografías de inmunomarcaje de la enzima nNOS en secciones sagitales del hipocampo de rata el día PN26. Las imágenes muestran un menor marcaje en mC con respecto a hC y una disminución en mSM con respecto a mC.

hC: hembra control; mC: macho control; mSM: macho separado.

CA1, CA3: regiones CA1, 3 del Asta de Amón; GD: giro dentado; csg: capa supra granular del giro dentado; cig: capa infra granular del giro dentado.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

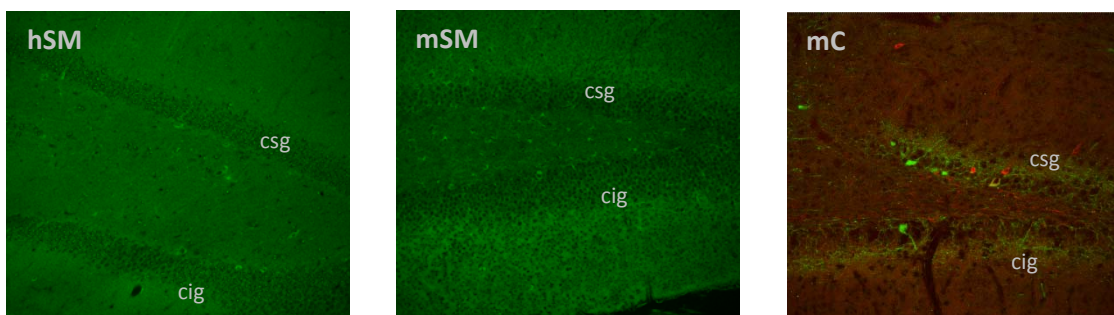


Fig. 51. Microfotografías obtenidas con microscopía confocal de inmunomarcaje con fluorescencia de la enzima nNOS en cortes sagitales mostrando el giro dentado del hipocampo de ratas adultas. Las imágenes SM proceden de una inmunotinción con fluorescencia simple; la imagen mC procede de una inmunotinción con fluorescencia doble, donde se observa el marcaje con anticuerpos frente a la enzima nNOS (fluorescencia rojo) y la proteína parvalbúmina (fluorescencia verde). Obsérvese el incremento del marcaje en mSM con respecto a mC y el dimorfismo sexual entre hSM y mSM.

hC: hembra control; hSM: hembra separada; mC: macho control; mSM: macho separado.

csg: capa supra granular del giro dentado; cig: capa infra granular del giro dentado.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

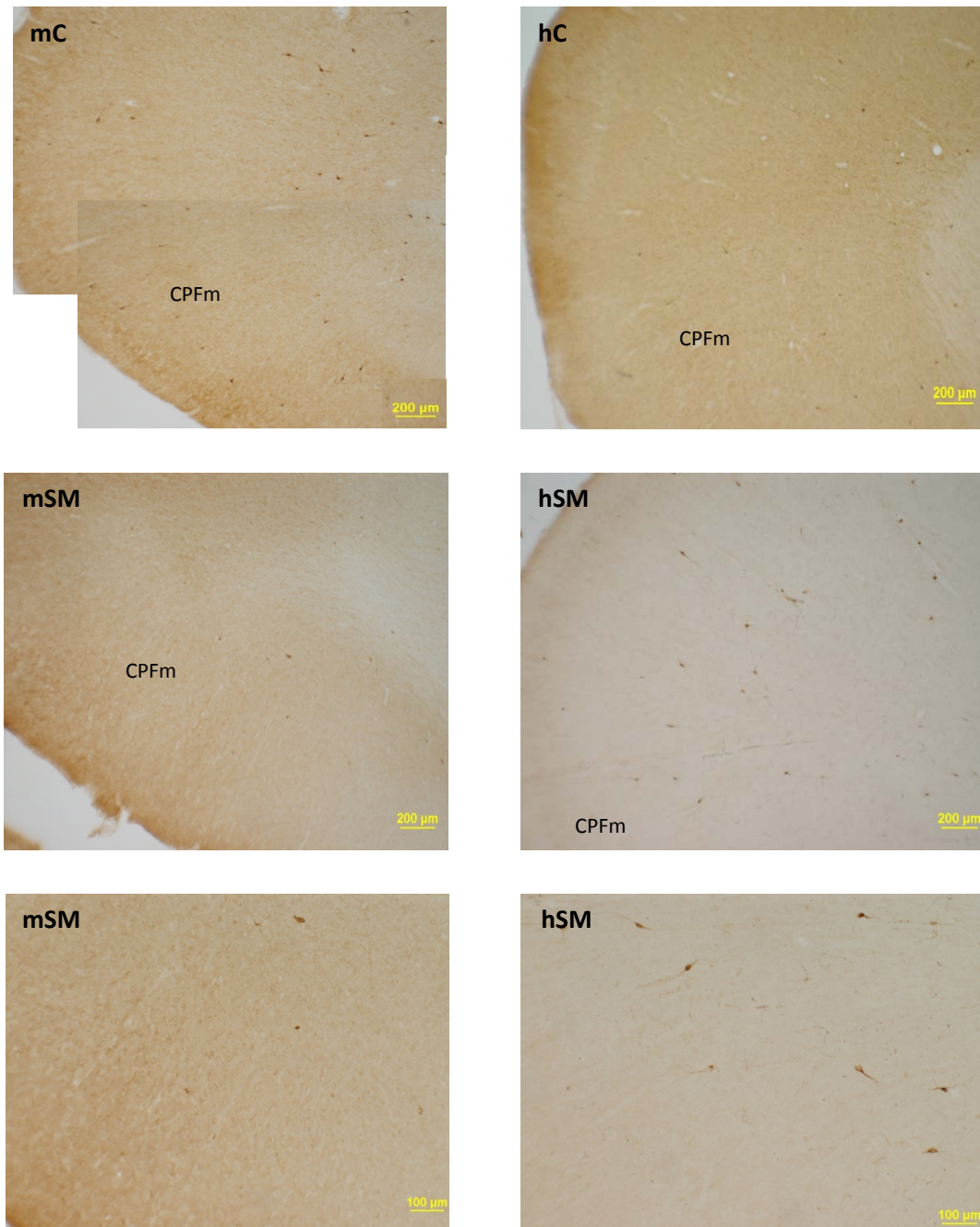


Fig. 52. Microfotografías de inmunotinción de la enzima nNOS en la corteza prefrontal de rata PN26 en cortes sagitales y su detalle a mayor aumento. Se observa el dimorfismo sexual entre mC y hC y la disminución del marcaje en mSM con respecto a mC.

hC: hembra control; hSM: hembra separada; mC: macho control; mSM: macho separado.

CPFm: corteza prefrontal medial.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

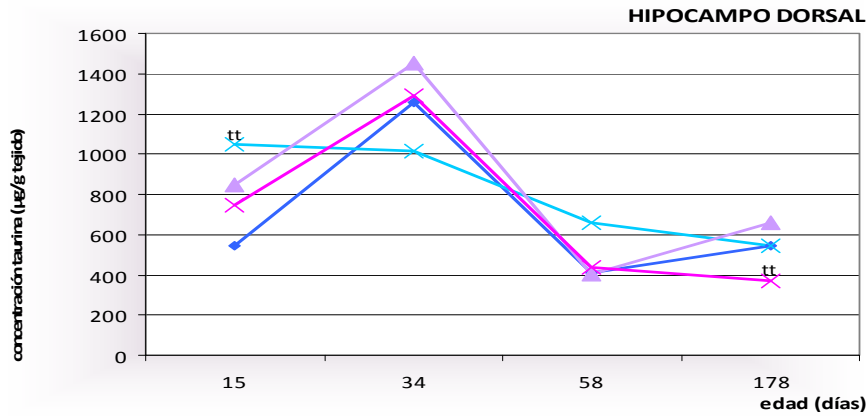
## 5.4 TAURINA

La concentración de taurina a lo largo del desarrollo varía de manera diferente según la región encefálica observada. En el hipocampo y septo de los animales control se incrementa desde PN15, muestra un pico en PN34 y disminuye durante la adolescencia alcanzando en PN58 los niveles típicos de adulto. En el estriado sin embargo, la taurina disminuye desde PN15 hasta PN34, cuando se observa un pico de concentración mínima, y se incrementa a lo largo de la adolescencia hasta la edad adulta. No se observan, en ninguno de los casos, dimorfismos sexuales.

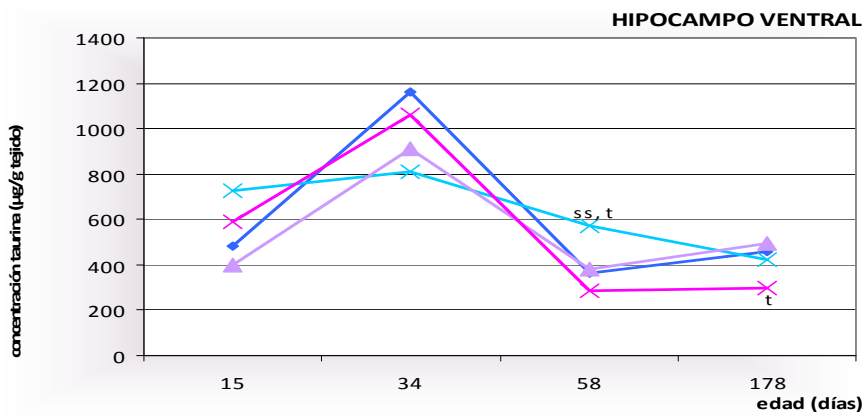
La separación materna altera los niveles de taurina de manera diferente en ambos sexos. En los machos, en función del área cerebral, el estrés postnatal altera la concentración de este aminoácido inmediatamente después de la separación o en la adolescencia tardía. En hembras, los efectos de la separación se hacen patentes a largo plazo, en la edad adulta, cuando se observa una disminución general de su concentración (Tablas 26-29 en el ANEXO).

En machos SM, en el **hipocampo dorsal** y el **septo** los niveles de taurina en PN15 muestran un incremento del 90% con respecto a los machos control (gráficas 22 y 24). Sin embargo, en el **hipocampo ventral** y el **estriado** se produce un aumento de su concentración del 60% en PN58 y se hace patente un dimorfismo sexual (gráficas 23 y 25).

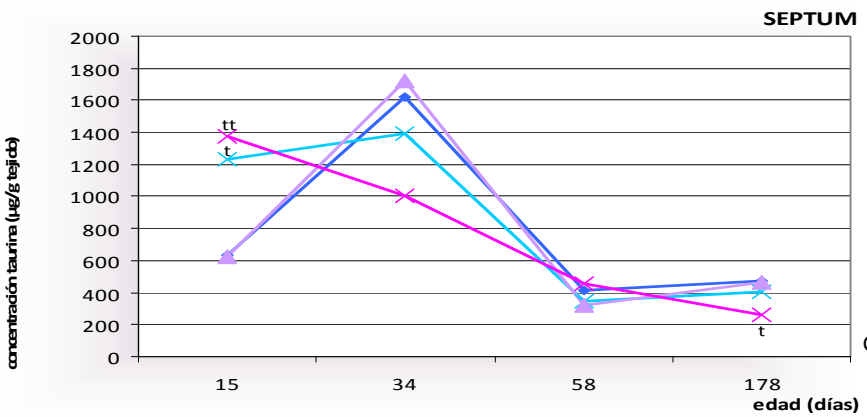
En las hembras SM el cambio más significativo se observa en el **septo** en PN15, por un incremento de más del doble de la concentración de taurina con respecto a las hembras control. Cabe destacar, además, que el estrés postnatal da lugar a una disminución de alrededor del 40% de los niveles de taurina en las hembras adultas en todas las regiones cerebrales estudiadas (gráficas 22-25). En el caso del **estriado** aparece en la edad adulta un dimorfismo sexual en los animales separados.



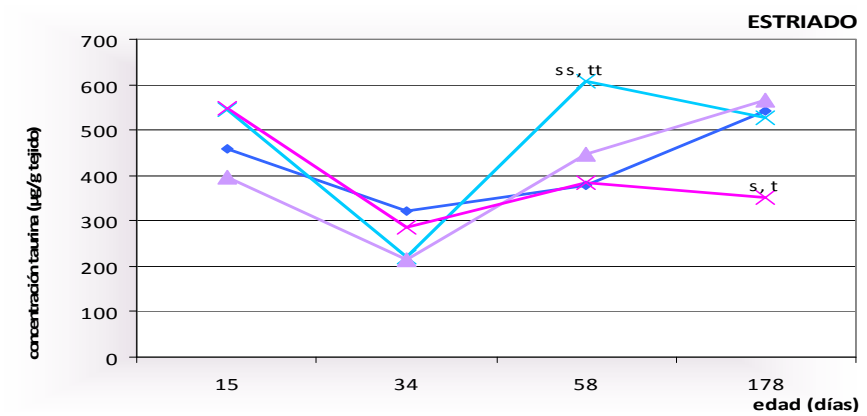
Gráfica 22.



Gráfica 23.



Gráfica 24.



Gráfica 25.

- ◆ machos control                      × machos SM
- ▲ hembras control                    × hembras SM

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

## 5.5 PROTEÍNAS ENLAZANTES DE CALCIO

La separación materna afecta de manera diferente a la distribución de las proteínas enlazantes de calcio calbindina y parvalbumina el día PN 26 en las diferentes regiones cerebrales estudiadas: en la amígdala y la corteza prefrontal se produce un incremento en los animales SM de ambos sexos, sin embargo, en el hipocampo este aumento sólo se observa en las hembras separadas. En el septo y en el estriado no se han observado diferencias significativas debidas a la separación materna en el número de neuronas marcadas positivamente para ninguno de estos dos marcadores.

### *Calbindina*

En el **hipocampo** no se observan diferencias significativas entre los animales de los grupos control y SM, si bien observamos una mayor inmunotinción de las hembras SM con respecto a sus controles. En los animales separados es patente un dimorfismo sexual marcado por un mayor número de células CB+ en las hembras que en los machos (figura 53).

En la **corteza prefrontal** la población de células CB+ se incrementa en los animales SM, principalmente en las capas IV y V, y aparece un dimorfismo sexual en los animales separados que no se observa en los animales control (figura 54).

En la **amígdala basolateral** de los animales SM se hace patente un incremento del número de células CB+ en ambos sexos (Figura 55).

En el **núcleo accumbens** se observa un marcado dimorfismo sexual por una mayor densidad de células CB+ en las hembras que en los machos (figura 56).

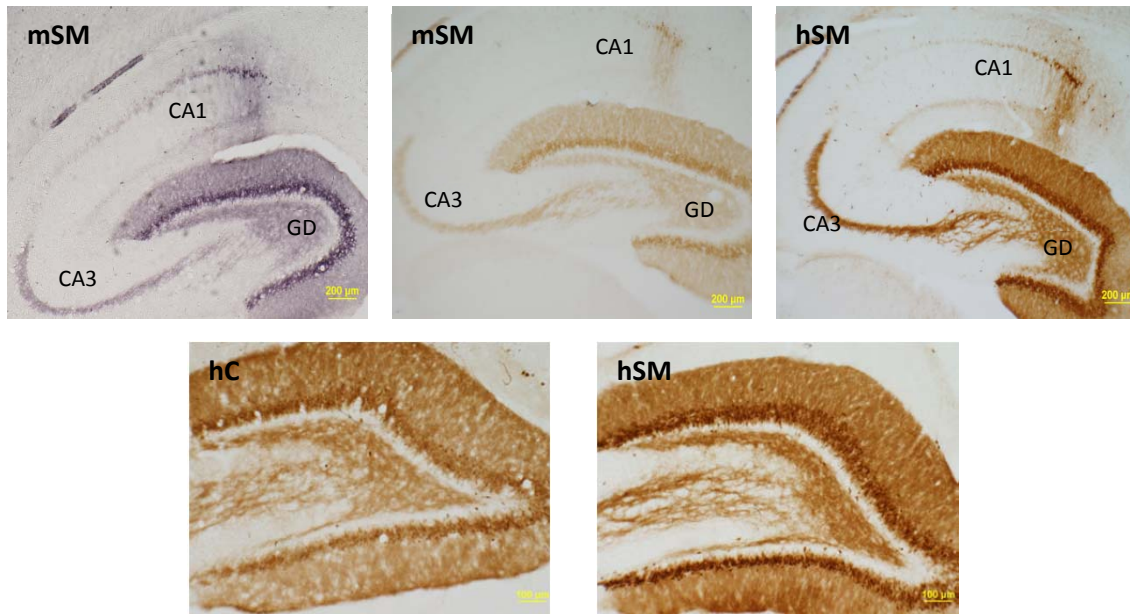


Fig. 53. Microfotografías de inmunotinción con calbindina en el hipocampo de rata el día PN26 en secciones sagitales. Véase un mayor marcaje en hSM con respecto a mSM y a hC.

hC: hembra control; hSM: hembra separada; mSM: macho separado.

CA1, CA3: regiones CA1, 3 del Asta de Amón; GD: giro dentado.

En las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

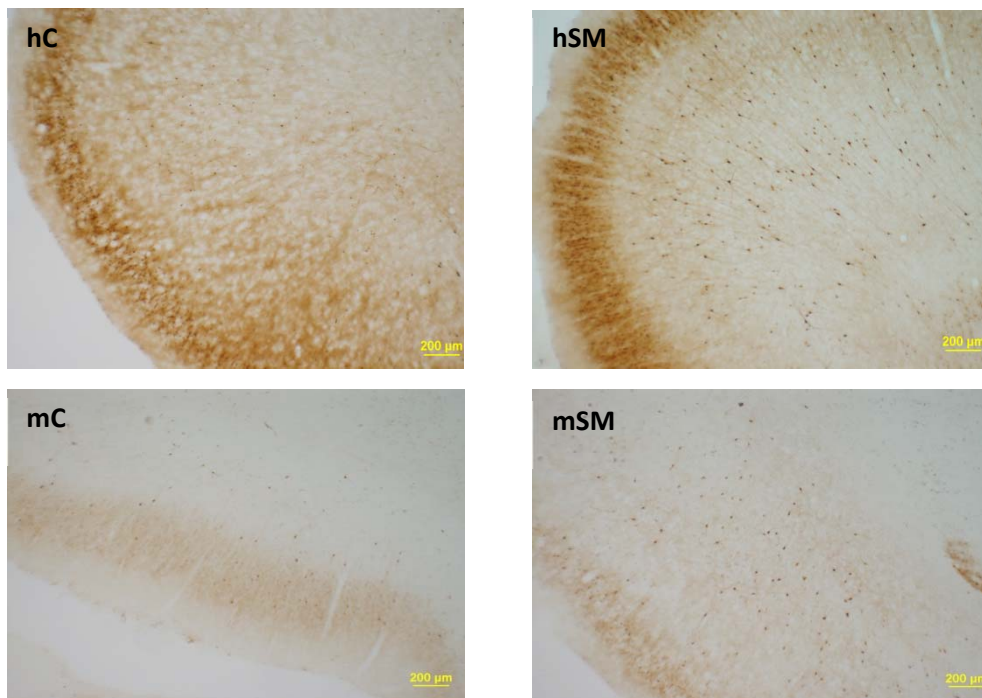


Fig. 54. Microfotografías de inmunotinción con calbindina en cortes sagitales mostrando la corteza prefrontal en PN26. Se observa una mayor densidad neuronal en mSM y hSM con respecto a sus controles y un dimorfismo sexual en SM.

hC: hembra control; hSM: hembra separada; mC: macho control; mSM: macho separado.

En ambas imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

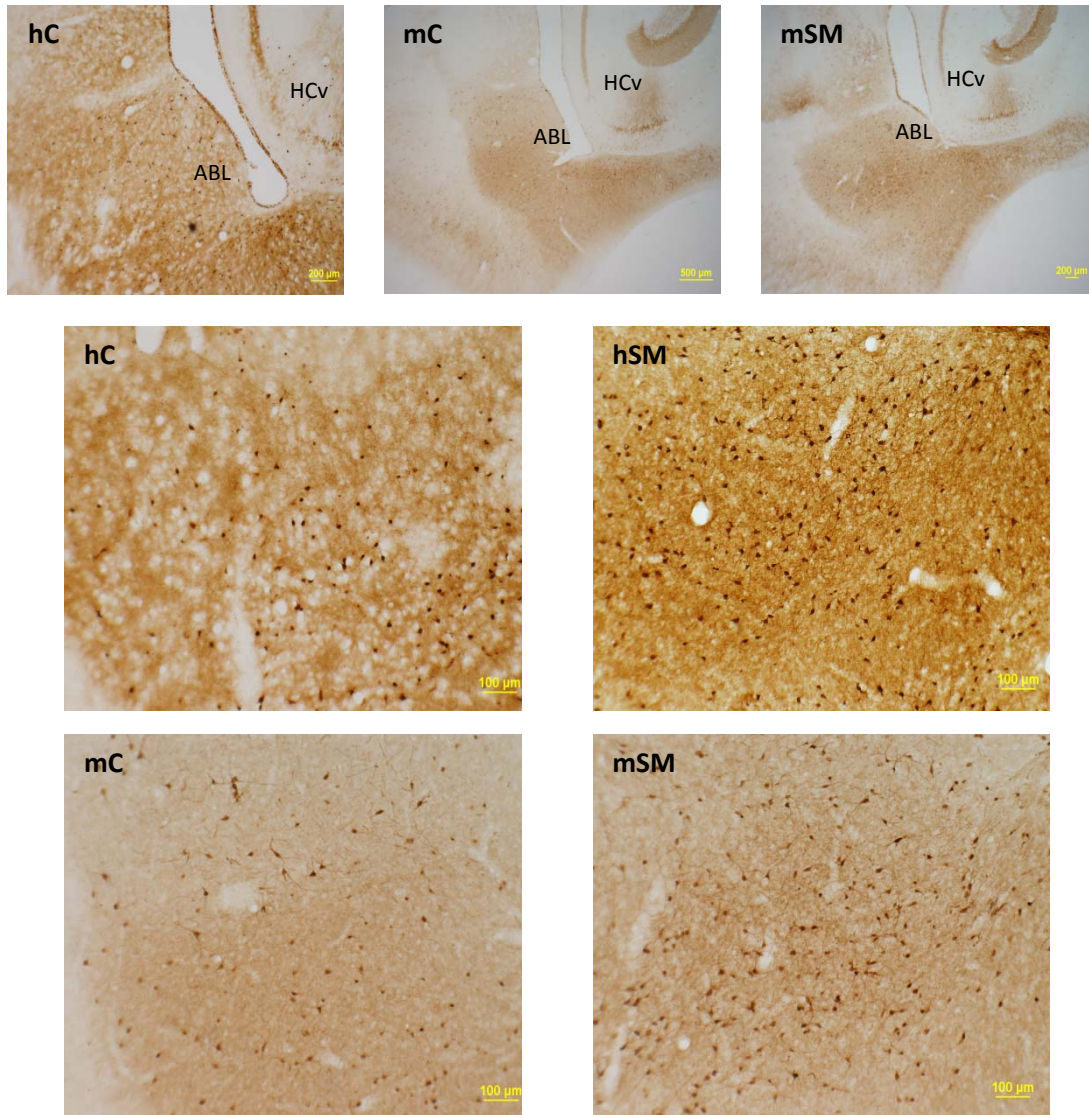
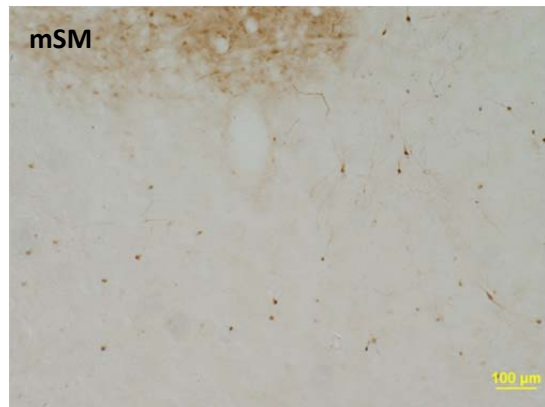
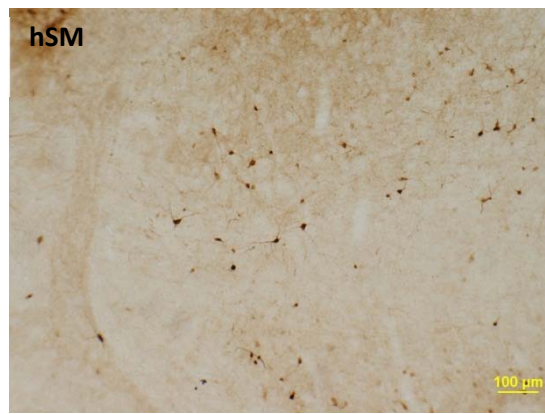
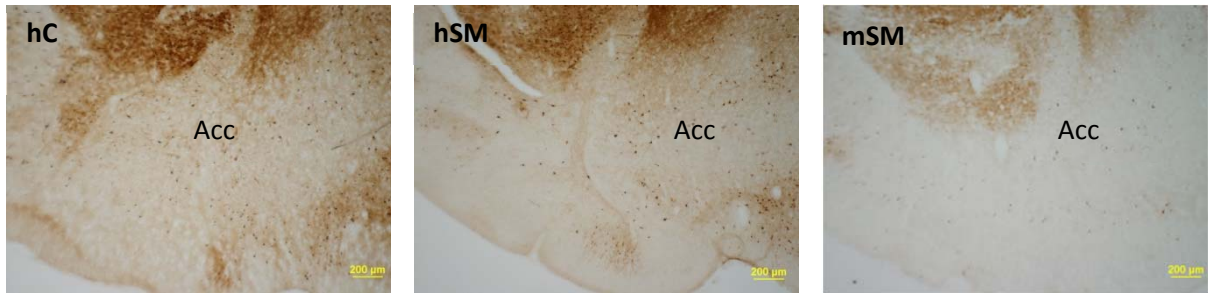


Fig. 55. Microfotografías de inmunotinción con calbindina mostrando la amígdala basolateral de rata el día PN26 y su detalle a mayor aumento en cortes sagitales.

hC: hembra control; hSM: hembra separada; mC: macho control; mSM: macho separado.

ABL: amígdala basolateral; HCv: hipocampo ventral.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.



### Parvalbúmina

Las diferencias en el número de células PV+ está detallado en la tabla 17 en el ANEXO.

En el **hipocampo** de los machos control hay una mayor población de células PV+ que en el de las hembras, observable en el AA y de manera más patente en CA1 (Figura 57). Es en esta región hipocampal, en CA1, donde se observa un aumento del número de células en las hembras SM. En animales adultos, cabe destacar que se mantiene el dimorfismo sexual observado en los animales control en la adolescencia (figura 58). Además, el número de células PV positivas está incrementado en las hembras SM con respecto a sus controles. Estos resultados sugieren que los cambios que aparecen en el hipocampo debido a la separación materna se mantienen a lo largo de la vida del animal (figura 59).

En la **corteza prefrontal** también es notable el incremento del número de células PV+ en hembras y machos SM con respecto a los controles (figura 60).

La **amígdala basolateral** presenta un aumento de marcaje con PV debido a la separación materna en animales de ambos sexos (figura 61).

En el septo y en el estriado ventral no se han observado diferencias significativas en el número de neuronas parvalbúmina positivas debidas a la separación materna ni al sexo.

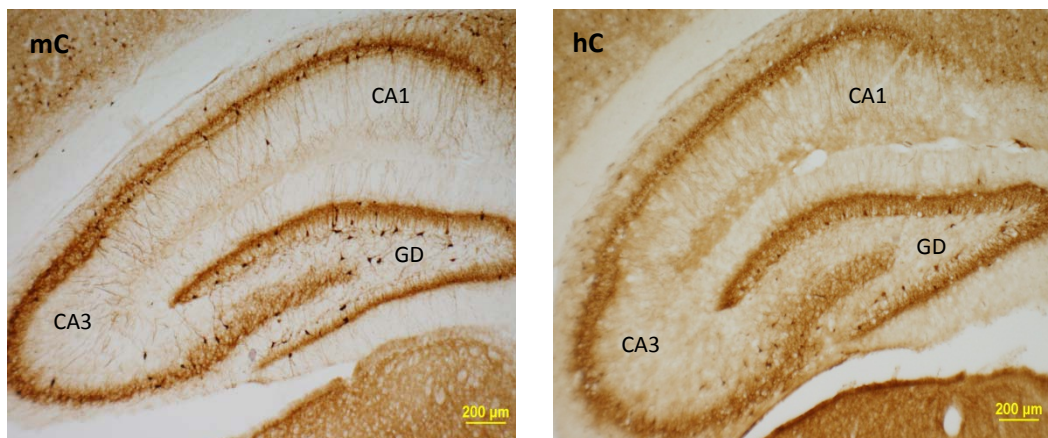


Fig. 57. Microfotografías de inmunotinción parvalbumina positiva en el hipocampo de rata PN26 en cortes sagitales. Obsérvese el mayor marcaje de mC con respecto a hC.

hC: hembra control; mC: macho control.

CA1, CA3: regiones CA1, 3 del Asta de Amón; GD: giro dentado.

En ambas imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

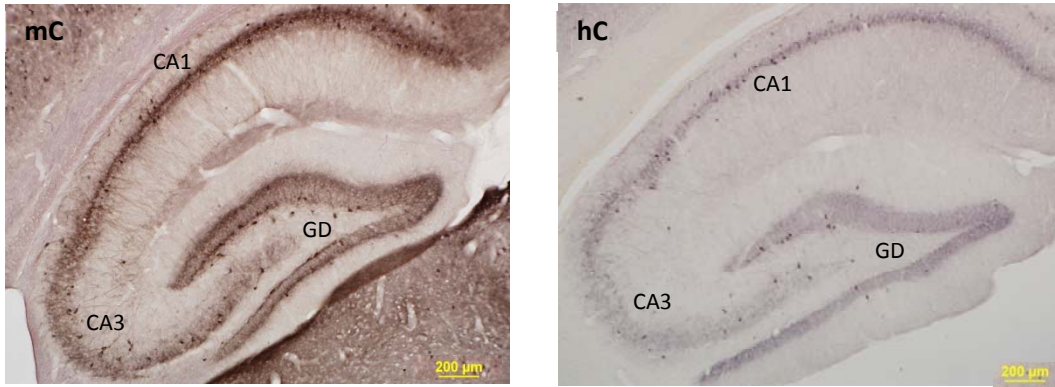


Fig. 58. Microfotografías de inmunotinción con parvalbumina en cortes sagitales mostrando el hipocampo de rata adulta. En las imágenes se observa un mayor marcaje de mC con respecto a hC.

hC: hembra control; mC: macho control.

CA1, CA3: regiones CA1, 3 del Asta de Amón; GD: giro dentado.

En las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

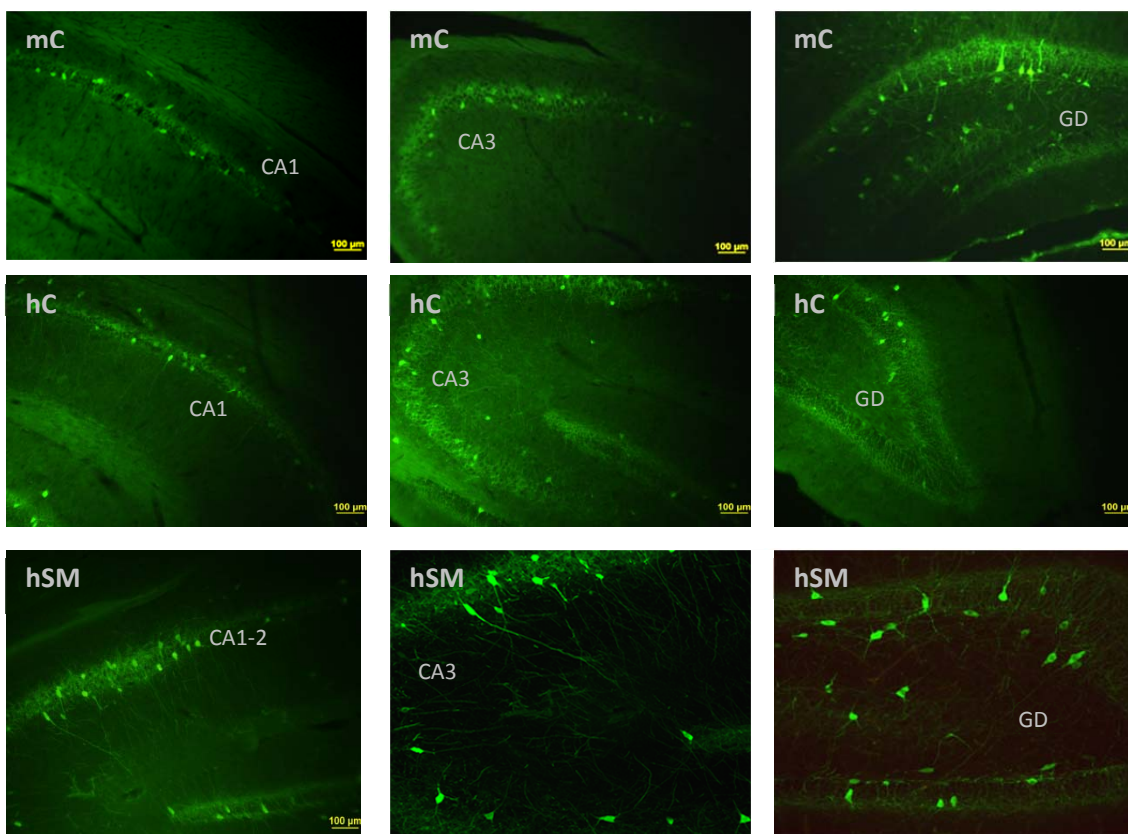


Fig. 59. Microfotografías de inmunofluorescencia simple para parvalbumina mostrando distintas subregiones del hipocampo de ratas adultas en secciones sagitales. Obsérvese un mayor marcaje en mC y hSM con respecto a hC.

hC: hembra control; hSM: hembra separada; mC: macho control.

CA1, CA2, CA3: regiones CA1, 2, 3 del Asta de Amón; GD: giro dentado.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

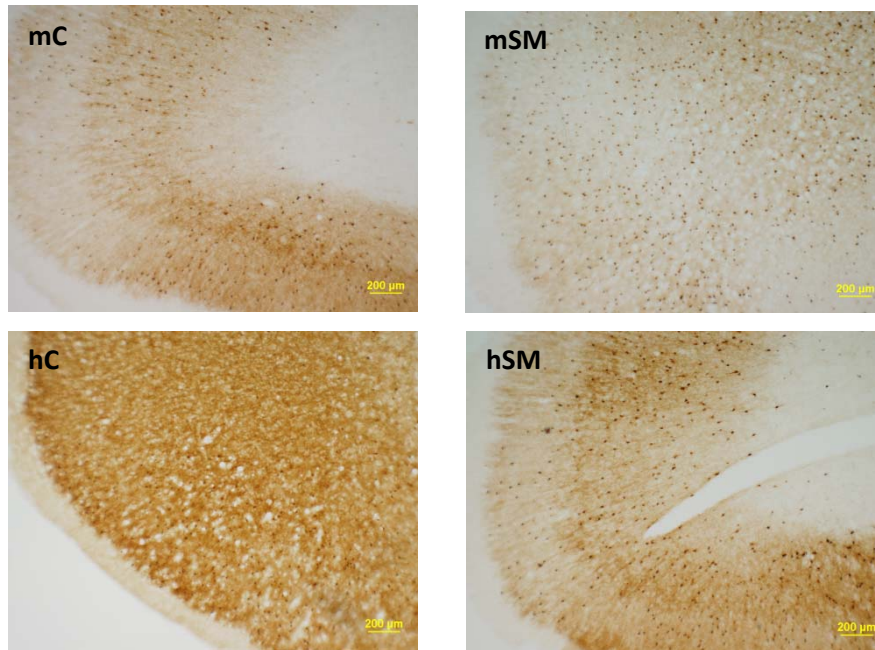


Fig. 60. Microfotografías de inmunotinción parvalbumina positiva en cortes sagitales mostrando la corteza prefrontal de rata PN26. La densidad de neuronas PV+ es mayor en SM comparada con los controles.

hC: hembra control; hSM: hembra separada; mC: macho control; mSM: macho separado.

En ambas imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

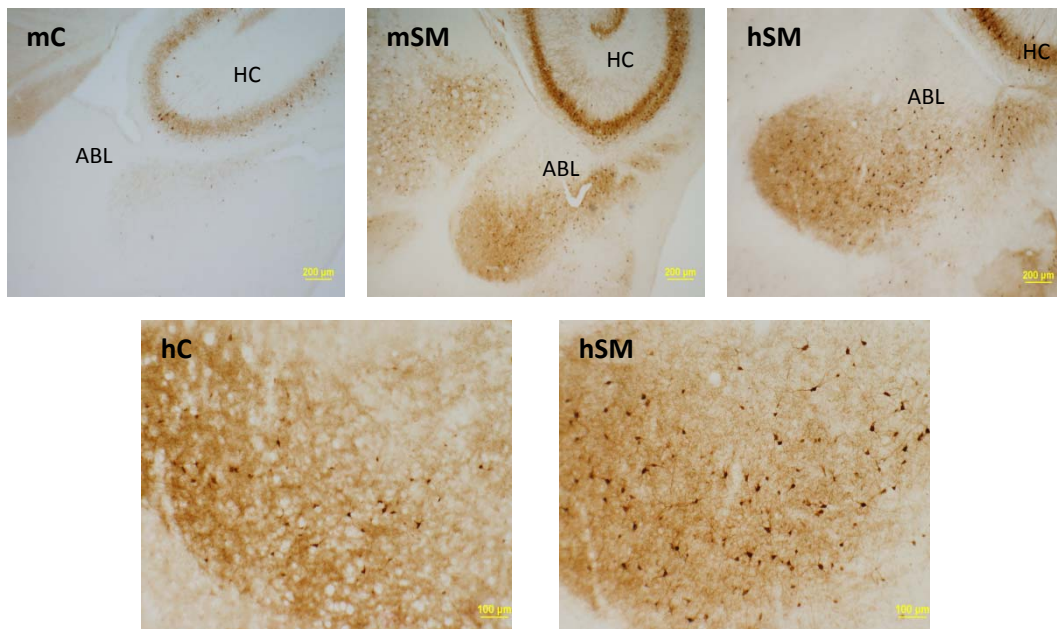


Fig. 61. Microfotografías de inmunotinción para parvalbumina mostrando la amígdala basolateral de rata el día PN26 en cortes sagitales y su detalle a mayor aumento. Se observa un incremento en el marcaje de hSM y mSM con respecto a hC y mC, respectivamente.

hC: hembra control; hSM: hembra separada; mC: macho control; mSM: macho separado.

ABL: amígdala basolateral; HCv: hipocampo ventral.

En todas las imágenes lo dorsal está orientado hacia arriba y lo rostral a la izquierda.

## 6 SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN MONOAMINÉRGICOS

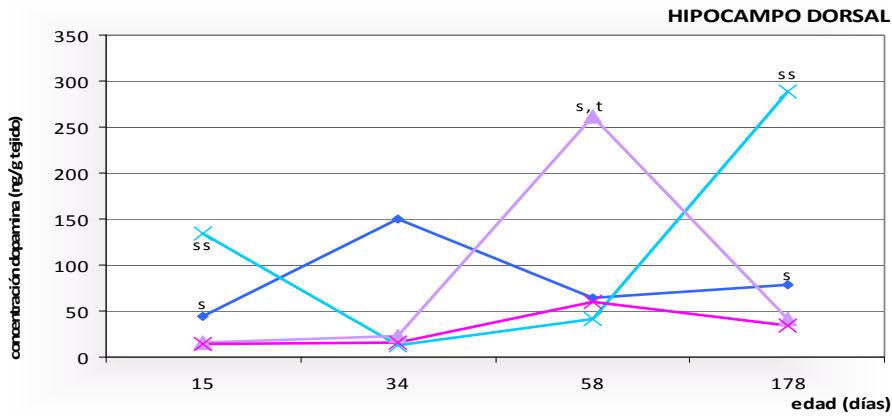
### 6.1 DOPAMINA

Como puede observarse en las gráficas 26-29, el contenido de dopamina a lo largo del desarrollo varía en las distintas áreas estudiadas. En el hipocampo, el contenido de dopamina en los animales separados de la madre muestra alteraciones diferentes en ambos sexos. En el septo cabe destacar que los animales control presentan el pico de concentración máxima de dopamina en la adolescencia temprana, al contrario que los animales separados que muestran su concentración mínima. En el estriado los niveles de dopamina incrementan a lo largo del desarrollo tanto en los animales control como en sometidos a separación materna.

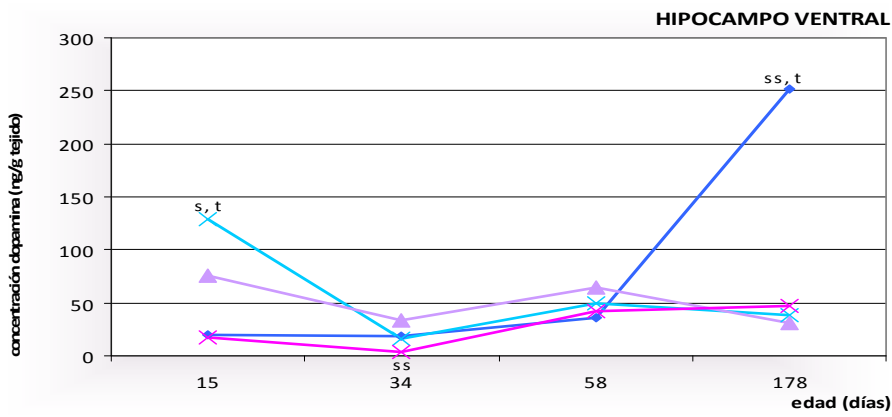
Existe un dimorfismo sexual en el contenido dopaminérgico hipocampal a lo largo de la edad. En el hipocampo dorsal, antes del destete y en la edad adulta la concentración de DA es mayor en los machos que en las hembras de ambos grupos. Sin embargo en la adolescencia tardía los niveles de dopamina son más elevados en las hembras control que en los machos. En el hipocampo ventral, el mayor contenido de dopamina de los machos en la edad temprana se observa sólo en el grupo SM y en la edad adulta sólo en los animales control.

Tras la separación materna, el índice DOPAC/DA presenta diferencias significativas en todas las áreas estudiadas, diferentes en machos y hembras, como muestran las gráficas 30-33. En el hipocampo, los machos SM presentan una disminución del turnover de dopamina a los 15 días de edad; sin embargo, esta tasa de recambio está incrementada en la adolescencia en el hipocampo dorsal. Las hembras SM por el contrario presentan un aumento del turnover de DA el día PN 35 cuando se observa un dimorfismo sexual muy marcado en todas las áreas estudiadas. En la edad adulta cabe destacar un incremento de la tasa DOPAC/DA en el septo de los animales separados con respecto a los control y un dimorfismo sexual en el estriado que establece una mayor tasa de recambio dopaminérgica en los machos que en las hembras.

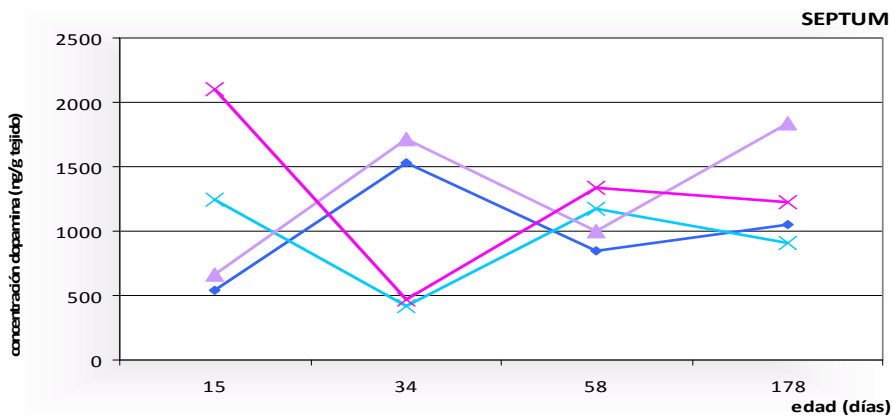
La concentración de dopamina en los distintos momentos del desarrollo en las regiones estudiadas, así como su tasa de recambio están detallados en las tablas 30-37 en el ANEXO.



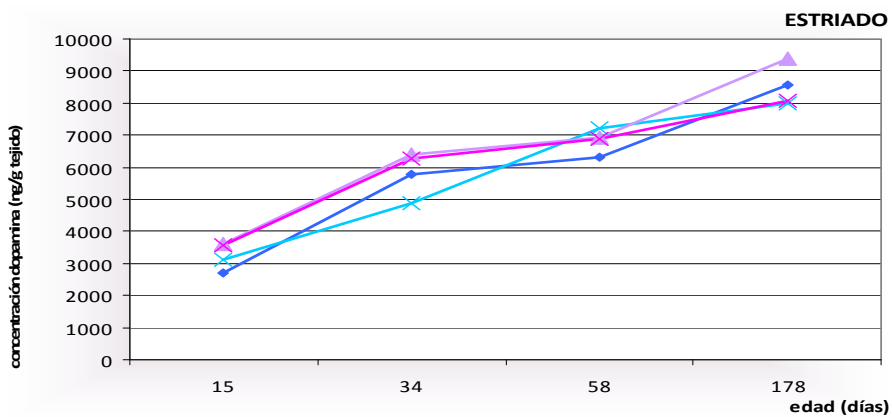
Gráfica 26.



Gráfica 27.



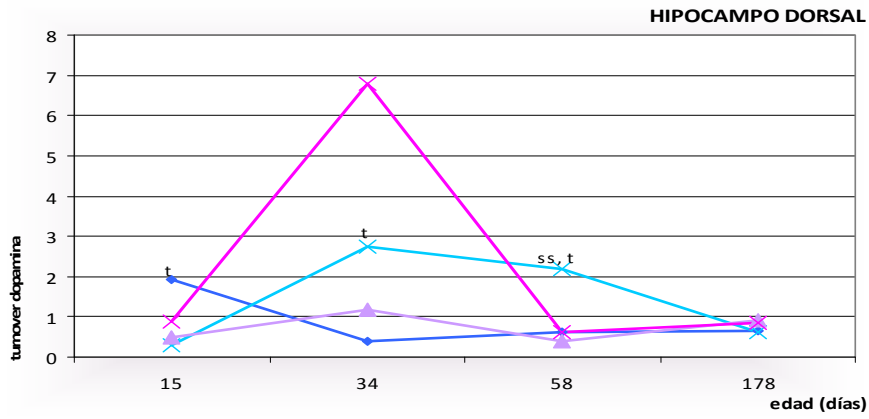
Gráfica 28.



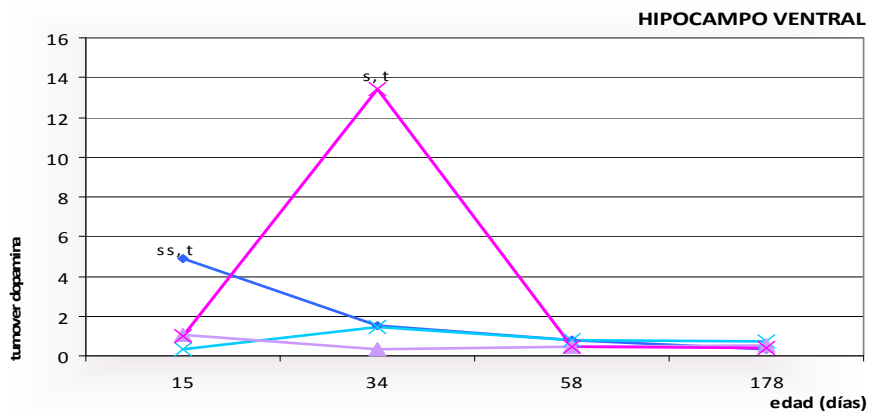
Gráfica 29.

- ◆ machos control                      ✕ machos SM
- ▲ hembras control                    ✕ hembras SM

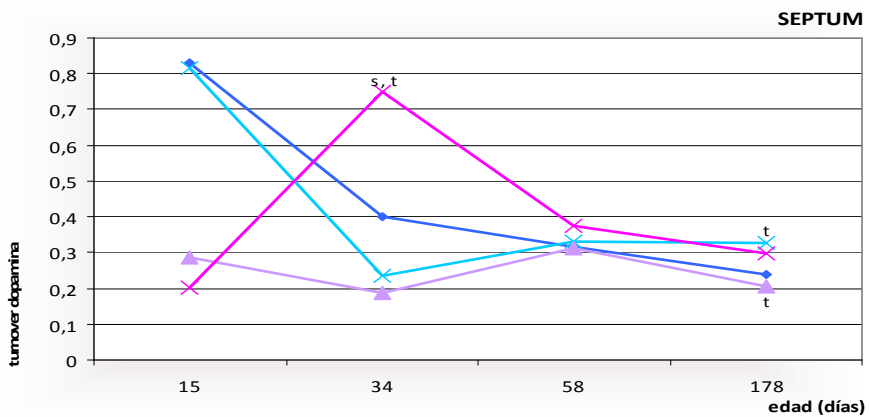
"s", "t" indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, "ss", "tt" muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), "sss", "ttt" altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).



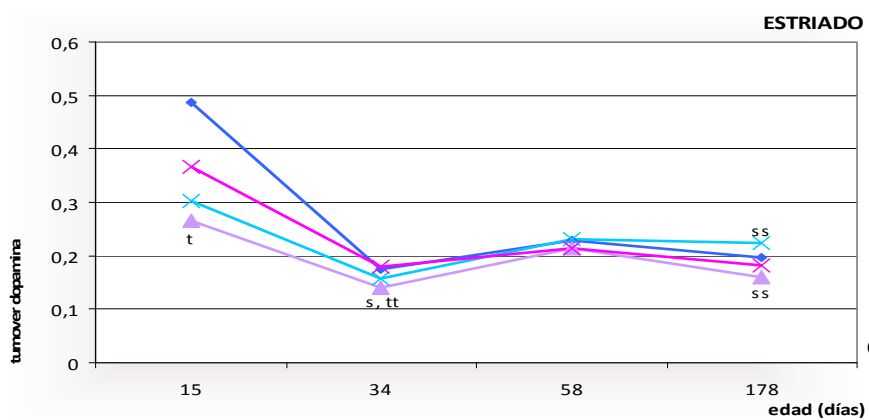
Gráfica 30.



Gráfica 31.



Gráfica 32.



Gráfica 33.

- ◆ machos control                      ✕ machos SM
- ▲ hembras control                    ✕ hembras SM

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

## 6.2 SEROTONINA

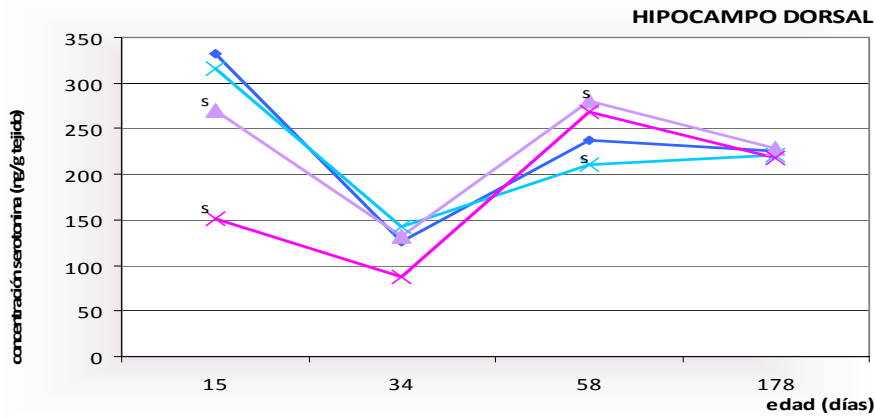
La separación materna induce una disminución del contenido de serotonina principalmente de las hembras. Este efecto se observa a los 15 días de edad en el estriado (Gráfica 37) y en la adolescencia temprana en el hipocampo ventral y el septo (Gráficas 35, 36). En los machos SM se observan diferencias significativas únicamente en el hipocampo ventral el día PN 35.

En las gráficas 38-41 se puede apreciar que el turnover de las neuronas serotoninérgicas a los 15 días de edad en los animales separados de ambos sexos es inferior al presentado por los animales control. El índice 5-HIAA/5-HT en la adolescencia temprana presenta un incremento muy elevado en el hipocampo dorsal y el septo de las hembras. Por el contrario, en el estriado en PN 35 este índice se ve disminuido en los machos SM, mientras que en PN 56 los machos SM muestran un incremento de valor del turnover en comparación con los machos control. En la edad adulta sólo permanece alterada la tasa de recambio de serotonina de los animales separados en el hipocampo, observándose un aumento significativo en ambos sexos.

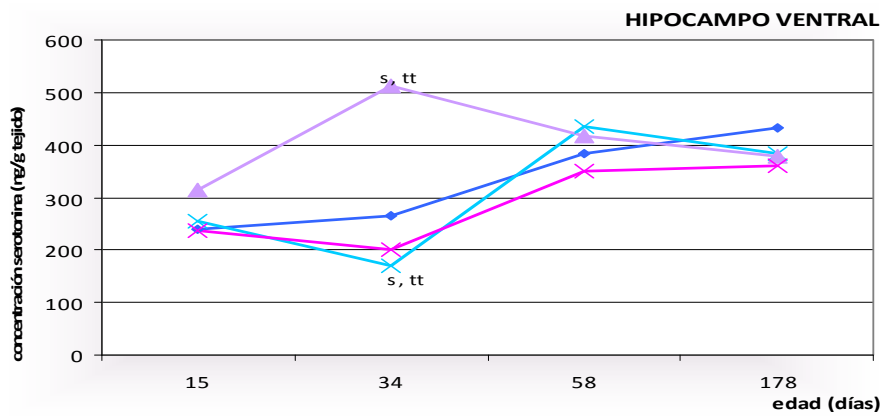
Existen diferencias sexuales en el contenido de serotonina y su tasa de recambio tanto en los animales controles como sometidos a separación materna en todas las áreas estudiadas en distintos momentos a lo largo del desarrollo. El dimorfismo sexual de la concentración de esta amina en PN 15 sólo se hace patente en el hipocampo dorsal (Gráfica 34). En PN 35 observamos diferencias de concentración de serotonina según el sexo en el hipocampo ventral y el septo, y en PN 56 en el hipocampo dorsal y el estriado. En la edad adulta sólo se observa dimorfismo en el septo. En todos los casos los niveles de este neurotransmisor son mayores en las hembras que en los machos.

El índice 5-HIAA/5-HT en PN 15 es significativamente mayor en las hembras que en los machos en el hipocampo. A los 35 días de edad esta diferencia con respecto al sexo se observa en el hipocampo dorsal y el estriado de los animales separados, y el día PN 56 sólo existe en los animales control en el estriado. En los animales adultos el dimorfismo sexual se detecta en el septo de los animales control y en el estriado de ambos grupos experimentales; en ambos casos, los valores del turnover de serotonina son mayores en los machos con respecto a las hembras.

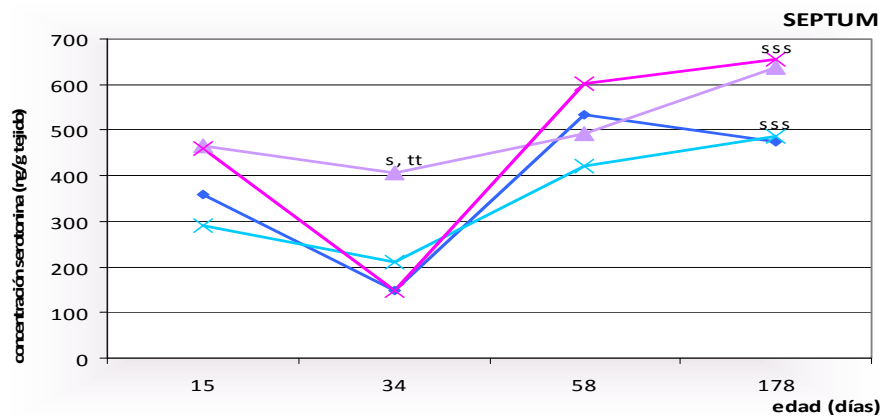
La concentración de serotonina en los distintos momentos del desarrollo en las regiones estudiadas, así como su tasa de recambio están detallados en las tablas 38-45 en el ANEXO.



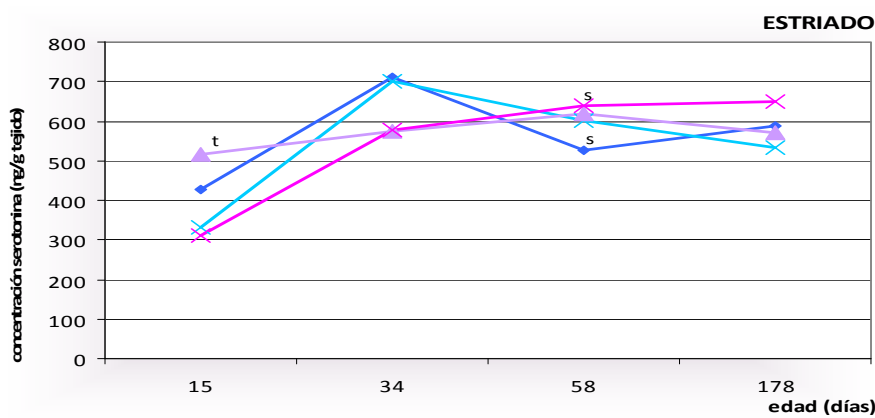
Gráfica 34.



Gráfica 35.



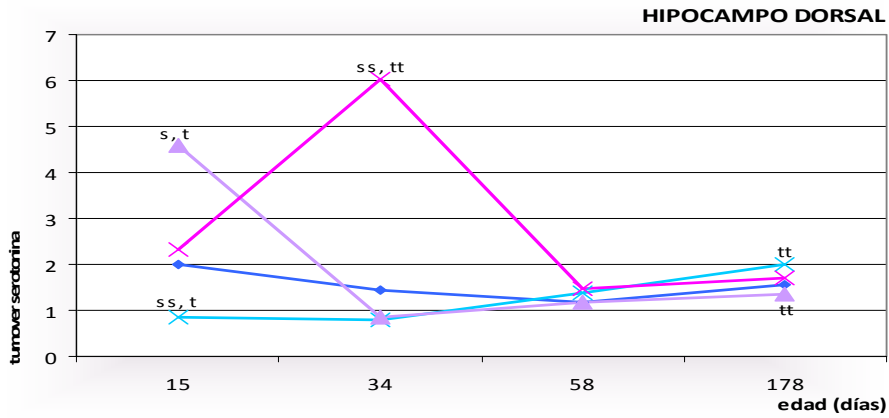
Gráfica 36.



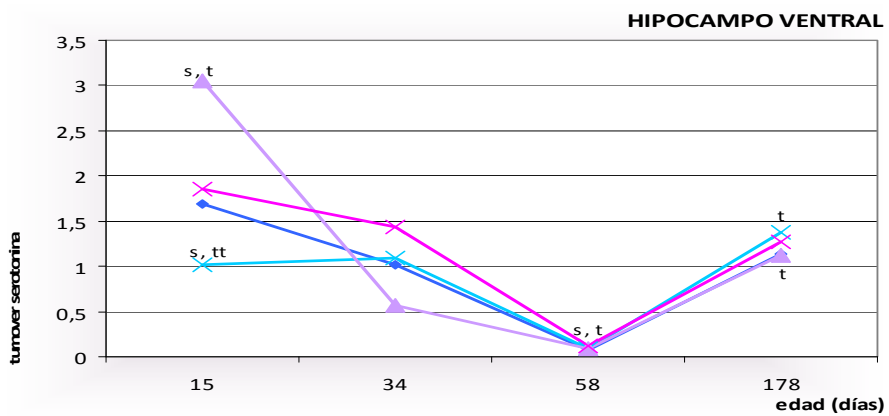
Gráfica 37.

- ◆ machos control                      ✕ machos SM
- ▲ hembras control                    ✕ hembras SM

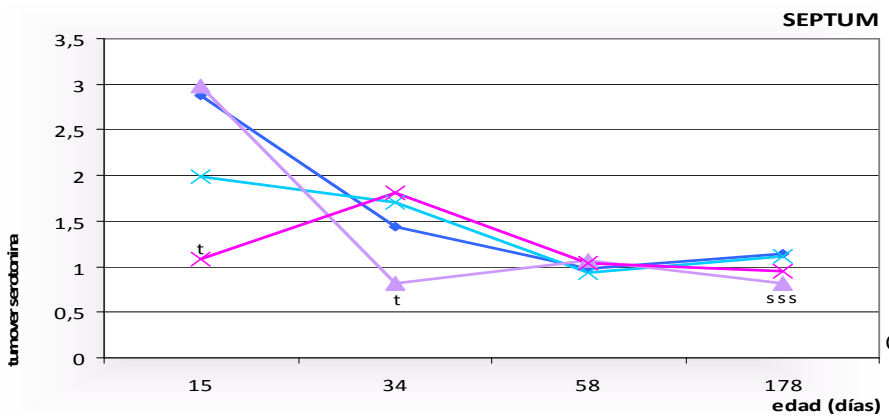
"s", "t" indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, "ss", "tt" muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), "sss", "ttt" altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).



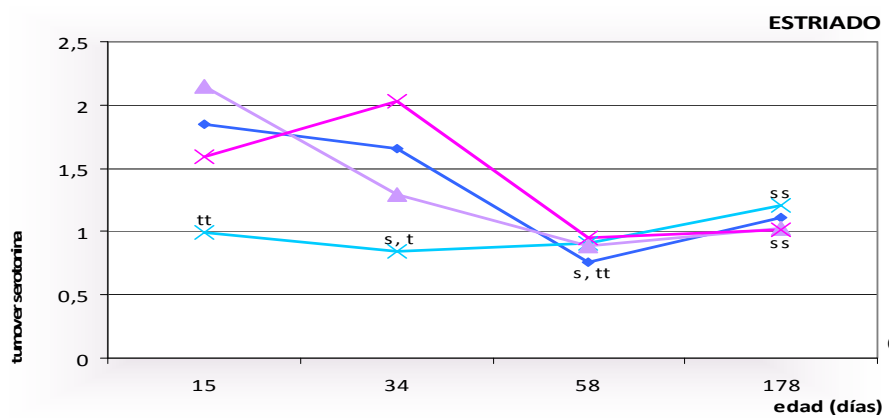
Gráfica 38.



Gráfica 39.



Gráfica 40.



Gráfica 41.

- ◆ machos control                      ✕ machos SM
- ▲ hembras control                    ✕ hembras SM

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

# DISCUSIÓN

El estrés induce plasticidad adaptativa en el cerebro, y cuando se sufre durante un periodo sensible del desarrollo, puede interferir con la programación de funciones cerebrales específicas (Chocyk 2013). Así, el estrés postnatal que supone la separación materna (Aisa B., 2007; Diaz-Luján V. E., 2008; Ladd 2000; Wigger 1999) induce modificaciones neuroendocrinas que afectan la neurogénesis de diversos sistemas de neurotransmisión (Arborelius L., 2007; Brake W. G., 2004; Chocyk 2013; Daniels W. M. U., 2004; Faturi C. B., 2010; Kauffman, 2000), alterando el desarrollo emocional y cognitivo (Aisa B., 2007; Bagot R. C., 2009; Barha C. K., 2007; Cannizzaro C., 2006; Cirulli F., 2003; Colorado R., 2006; Hui J., 2011; Huot R. L., 2002; Levine S., 2001; Liu D., 2000; Oitzl M. S., 2010). Además, algunos estudios demuestran que las alteraciones producidas por la exposición temprana a situaciones adversas son patentes también en la edad adulta (Faturi C. B., 2010; McCormick C. M., 2010a, b; Plotsky P. M., 1993).

El objetivo general de este trabajo consiste en el estudio a lo largo del desarrollo de los efectos de la separación materna en los sistemas de neurotransmisión que subyacen a los procesos cognitivos de ratas Wistar de ambos sexos. De la misma manera que hemos establecido objetivos concretos para llevar a cabo los análisis en las distintas etapas de la vida de los animales, la discusión de los resultados está estructurada de acuerdo a los mismos, cronológicamente.

#### ALTERACIONES DEBIDAS A LA SEPARACIÓN MATERNA EN EL PERIODO POSTNATAL TEMPRANO

En un primer término, el objetivo de este estudio pretende el análisis de las alteraciones provocadas por la separación materna en la etapa postnatal temprana. Como primer resultado a tener en cuenta, el protocolo de estrés repetido que hemos seguido (Colorado R., 2006) no produce diferencias en el peso de los animales tras el periodo de separación con respecto a los controles. Por una parte, se sabe que los efectos de la separación materna son consecuencia de la falta de cuidados maternos y no de la separación per se (Huot R. L., 2004), pero por otra, precisamente la separación materna induce un incremento de los cuidados de las crías tras la reunión con la madre, a modo de compensación (Macri S., 2008); además, se ha visto que esta forma de estrés postnatal no tiene efectos en el desarrollo fisiológico y comportamental de las crías (Farkas J., 2009). De acuerdo a estas observaciones, nuestros resultados apuntan que este protocolo de separación materna no interfiere negativamente en la alimentación de los animales.

Las consecuencias de la separación materna a nivel neuroendocrino se analizaron a través de los niveles de corticosterona en plasma; a nivel neuroquímico se estudiaron los efectos en el hipocampo, septo y estriado. El hipocampo es una región especialmente sensible al estrés (Andersen S. L., 2004; Gould E., 1999), aunque sus efectos son patentes también en regiones cerebrales como la corteza prefrontal, el estriado y la amígdala (Andersen S. L., 2008) por ser áreas extrahipotalámicas relacionadas con el eje HHA (Díaz-Luján V. E., 2008). En línea con la bibliografía, una vez finalizado el protocolo de separación, encontramos alteraciones tanto en los niveles de corticosterona plasmática de los animales SM (Huot R. L., 2002) como en las concentraciones de los distintos neurotransmisores analizados en el hipocampo, septo y estriado.

Está descrito que el estrés induce una liberación de glutamato (Lowy M. T., 1993; Pickering C., 2006) que si es excesiva y mantenida en el tiempo puede conducir a procesos de excitotoxicidad (Fisher A. K., 2002; Lephart E. D., 1999; Pickering C., 2006; Sapolsky R. M., 2003). Esto está de acuerdo con nuestros resultados, en los que se observa un incremento significativo de glutamato en ambos sexos el día PN 15, tras la separación materna, en todas las regiones cerebrales estudiadas. Además el GABA, que actúa como aminoácido excitador hasta el día PN 10, muestra un resultado semejante en hembras y un incremento restringido al hipocampo en machos. Cabría pensar que este aumento de aminoácidos excitatorios tras la separación materna sería la causa de un incremento de la excitabilidad neuronal que conduciría a la muerte celular en distintas regiones cerebrales, especialmente en el hipocampo. Para poder afirmar esta hipótesis, nos apoyamos en los resultados del análisis neuroanatómico de los receptores de glutamato en PN26, tras el destete, que constituyen un estudio paralelo de los efectos de la separación materna y los daños de una posible excitotoxicidad. Se sabe que en el 90% de las fibras musgosas hipocampales colocalizan receptores de GR y subunidades GluR2/3 del receptor AMPA de glutamato (Pickering C., 2006) y se ha visto que la exposición a separación materna repetida durante el SHRP induce una disminución de estas fibras musgosas en el hipocampo (Huot R. L., 2002) y de la expresión de las subunidades GluR1 y GluR2 del receptor AMPA (Pickering C., 2006). Por esto, en combinación con los resultados de la concentración de glutamato, las variaciones en el marcaje de las distintas subunidades de sus receptores nos sirven para hacernos una idea de las posibles respuestas neuronales frente a la estimulación glutamatérgica. En contra de lo esperado, en los animales que han sido sometidos a separación materna no hemos observado disminución en la expresión de las subunidades GluR1 ni GluR2/3 con respecto a los animales control en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas, de hecho, en las hembras separadas el marcaje de GluR1 está incrementado en la corteza prefrontal. Por otra parte, el estudio con el marcador neuronal NeuN nos permite conocer la densidad neuronal de las distintas regiones cerebrales; no hemos

encontrado la expresión de este marcador disminuida en ningún caso, al contrario, la densidad neuronal está incrementada en las hembras SM. Tomando estos resultados en conjunto, podemos afirmar que, a pesar del incremento de aminoácidos excitatorios, la exposición a estrés postnatal repetido no produce pérdida neuronal.

El incremento de glutamato en el hipocampo, septo y estriado pone de manifiesto la relación de estas regiones cerebrales con el eje HHA: puesto que contienen receptores de glucocorticoides (*de Kloet E. R., 1998; Dedovic K., 2009; Díaz Luján V. E., 2008*), las variaciones de estas hormonas por el estrés de la separación materna alteran la secreción de glutamato en las mismas (*Abraham I., 1996*).

Dado que el modelo de separación materna empleado en este estudio supone un estrés repetido, cabría esperar un incremento de los niveles de glucocorticoides por la activación del eje HHA (*Daniels W. M. U., 2004; Huot R. L., 2002*). Sin embargo, nuestros resultados del análisis de corticosterona el día PN 15 no sólo no muestran aumento en la concentración de este glucocorticoide en los animales separados con respecto a los animales control, sino que revelan que en los machos SM ésta está significativamente disminuida. En contra de lo esperado tras un estrés postnatal repetido (*Huot R. L., 2002*), el procedimiento de separación materna que hemos empleado induce una disminución de corticosterona, efecto observado como consecuencia de la manipulación temprana (*Durand M., 1998*).

Puesto que el glutamato está incrementado el día PN 15 en todas las regiones cerebrales, no cabe pensar que los niveles de corticosterona no se vean afectados por el procedimiento de separación materna; estos resultados podrían explicarse si, tras un tiempo prolongado de estrés, por un proceso de retroalimentación negativa los niveles en plasma de hormonas corticoideas disminuyeran como mecanismo de neuroprotección (*de Kloet E. R., 1998*). Como la liberación glutamatérgica depende de la activación de receptores de glucocorticoides (*Abraham I., 1996*), podría ser que tras el estrés crónico de la separación materna se modifique la función glutamatérgica a nivel genético por modificaciones en la expresión de receptores de glucocorticoides (*Champagne F. A., 2009*), de manera que queda alterada mientras se mantienen elevados los niveles de estas hormonas; al retornar a sus niveles normales por retroalimentación negativa, a largo plazo se normalizaría asimismo la función glutamatérgica. Esto a su vez explicaría la normalización (en el caso de las hembras SM) o disminución (en el caso de los machos SM) posterior de los niveles de glutamato que encontramos tras el destete, en la adolescencia temprana. Además de los elevados niveles de glutamato, observamos un incremento de los niveles de GABA, en el caso de las hembras sometidas a separación materna en las mismas regiones en las

que aumenta el glutamato, y en el caso de los machos sólo en el hipocampo; lo que podría interpretarse como un mecanismo de compensación para evitar una posible excitotoxicidad.

Las diferentes variaciones en machos y hembras de la concentración de corticosterona en plasma y del contenido de GABA pueden explicarse por el papel de los neuroesteroides en la modulación de sus receptores (*Briones-Aranda A., 2005*). Tras la separación materna, en PN 15, los machos muestran un incremento de GABA sólo en el hipocampo, mientras que las hembras lo presentan en el hipocampo, en el septo y en el estriado. El estrés afecta a la funcionalidad del receptor GABA<sub>A</sub> a través de su modulación por alopregnanolona, metabolito de la progesterona que actúa como inhibidor de la actividad del eje HHA (*Sutcliffe J. S., 2007*). Este esteroide se sintetiza en neuronas aferentes glutamatérgicas y GABAérgicas en la corteza, hipocampo y estriado (*Mellon S. H., 2007*); su síntesis cerebral comienza desde el día PN 7 (*Grobin A. C., 2006*), actúa a través del receptor GABA<sub>A</sub> (*Kelly S. J., 1999; Mellon S. H., 2007*) y su concentración se incrementa tras el estrés agudo (*McCormick 2002*). Los neuroesteroides y los glucocorticoides comparten la ruta biosintética (*de Kloet E. R., 1998; Mellon S. H., 2007*), por lo que un incremento debido a estrés de la actividad del eje HHA induce no sólo el incremento de corticosterona (*Huot R., L., 2002*) sino también de alopregnanolona (*McCormick C. M., 2002*). La potenciación de la inhibición del eje HHA por la alopregnanolona (*Sutcliffe J. S., 2007*) explicaría la disminución de la concentración de corticosterona encontrada en los machos separados con respecto a sus controles. Además, el cambio de funcionalidad de GABA de neurotransmisor activador a inhibidor en el desarrollo postnatal está acelerado por la hiperactivación de los receptores GABA<sub>A</sub> (*Ganguly K., 2001*), por lo que un incremento de activadores de este tipo de receptores, como la alopregnanolona, supondría un cambio en la maduración de los sistemas de neurotransmisión tras la separación materna.

Por otra parte, tras el nacimiento, la expresión de la enzima GAD está incrementada en regiones con una elevada concentración de glucocorticoides (*Davis A. M., 1996*), y su concentración se ha relacionado con los niveles de testosterona (*Davis A. M., 1999; McCarthy M. M., 1997*), por lo que cabría pensar que el incremento de GABA en los machos en el hipocampo y no en el resto de regiones cerebrales estudiadas tras la separación materna, podría estar relacionada con una expresión aumentada de esta enzima. Asimismo, la concentración de taurina en PN15 aparece incrementada en el hipocampo de los machos que han sufrido separación materna. Este resultado concuerda con otros estudios que demuestran que los niveles de taurina aumentan en situaciones de estrés (*Kong W. X., 2006; Wu J. Y., 1998*), y su liberación esté relacionada con la concentración de GABA y glutamato (*El Idrissi A., 2008*). Además, la taurina modifica la función hipocampal y la respuesta al estrés (*Franconi F., 2004*), de manera que el incremento que observamos en nuestros

resultados podría ser otra forma de regulación de la hiperactivación del eje HHA en los machos que han sufrido separación materna. La concentración de este aminoácido aparece asimismo incrementada en el septo de ambos sexos, posiblemente como mecanismo de neuroprotección frente a una posible excitotoxicidad (*Hada J., 1996, Oja S. S., 2000; Saransaari P., 1997a; Wu H., 2005*). La taurina no solo tampona el incremento de calcio (*Chen S. W., 2004, El Idrissi A., 2008*), sino que también fosforila proteínas dependientes de calcio evitando su activación (*Wu J. Y., 1998*). Este aminoácido puede tener un papel en la respuesta al estrés en áreas cerebrales en las que un incremento de calcio intracelular no puede ser amortiguado por proteínas enlazantes de calcio. Este resultado pone de manifiesto una respuesta al estrés diferente en distintas regiones cerebrales, así como una expresión desigual de aminoácidos cerebrales, cuyo metabolismo se regula diferencialmente durante el desarrollo (*Cheluja M. G., 2007*). La taurina, además de su papel en la homeóstasis del calcio tiene una importante función en la regulación de la transmisión glutamatérgica. Ya que la liberación de taurina está asociada a la activación de receptores NMDA de glutamato (*Wu J. Y., 1998*), un aumento de glutamato podría explicar un aumento de taurina tras la separación materna. En línea con esta idea, nuestros resultados muestran un incremento de taurina (aunque no significativo en todos los casos) en aquellas regiones cerebrales en las que hemos observado un incremento de glutamato tras el procedimiento de separación materna.

Los sistemas monoaminérgicos también están afectados por las experiencias estresantes tempranas (*Arborelius L., 2007; Brake W. G., 2004; Gardner K. L., 2009*). La separación materna induce modificaciones en el desarrollo de las vías dopaminérgicas (*Brake W. G., 2004*), y en nuestros resultados observamos variaciones de la tasa de recambio dopaminérgica en regiones extrahipotalámicas de regulación del eje HHA. En los machos, el estrés postnatal temprano induce una disminución de turnover de dopamina el día PN15 en el hipocampo; en las hembras, por el contrario, provoca un incremento del mismo en el estriado. Estas variaciones ponen de manifiesto que los sistemas dopaminérgicos que se ven afectados por la separación materna, son distintos en machos y hembras.

Los análisis neuroquímico y hormonal en PN15 ponen de manifiesto diferencias sexuales en la respuesta al estrés. Este dimorfismo sexual está de acuerdo con otros estudios que describen una respuesta al estrés influida por el sexo (*Desbonnet L., 2008; Díaz-Luján V. E., 2008*), que puede deberse a un dimorfismo en la regulación del eje HHA por los esteroides gonadales (*Sutcliffe J. S., 2007, Mendez-López M., 2009*). En los machos se produce un pico de secreción de testosterona en la primera semana de vida postnatal y la expresión de la enzima aromatasa es mayor que en hembras, por lo que la actividad del eje HHA está potenciada debido a un incremento de estradiol

cerebral durante la diferenciación sexual (Colciago A., 2005; Schwarz J. M., 2008). Esta potenciación del eje en los machos en el periodo postnatal, apoya el dimorfismo sexual que encontramos en nuestros resultados en los niveles de corticosterona en los animales control. Debido a una hiperactivación del eje HHA como consecuencia del estrés (de Kloet E. R., 1998), la secreción de hormonas gonadales en los animales sometidos a separación materna estaría asimismo potenciada. Por una parte, en los machos que han sufrido estrés postnatal estaría incrementada la secreción de testosterona, que inhibe la actividad del eje HHA (Sutcliffe J. S., 2007); por otra, estaría incrementada la síntesis de estradiol cerebral, que posee un papel neuroprotector (Figueiredo H. F., 2002; Ochedalski T., 2007). Estos resultados indican que las consecuencias de la separación materna son diferentes en función del sexo del animal y sugieren que esta forma de estrés repetido induce diferentes alteraciones en los sistemas cerebrales de machos y hembras apuntando a la activación de distintos mecanismos de compensación para evitar daños neuronales durante el periodo de desarrollo postnatal.

A pesar de los dimorfismos sexuales observados en los animales SM, hay alteraciones debidas a la separación materna que parecen comunes a machos y hembras. Nuestros resultados ponen de manifiesto una disminución de la tasa de recambio de la serotonina en el hipocampo en PN 15, tras la separación materna, en ambos sexos. El sistema de neurotransmisión serotoninérgico es sensible a las variaciones por distintas formas de estrés; otros estudios previos de separación materna (Arborelius L., 2007; Matthews K., 2003; Vicentic A., 2006) y adrenalectomía (Leret M. L., 2004) ya habían revelado una disminución de la concentración de serotonina en el hipocampo, así como una disminución de la inervación serotoninérgica como consecuencia del estrés (Kuramochi M., 2009). La maduración del sistema serotoninérgico culmina tras el nacimiento (Oreland S., 2009), y la disminución de la actividad que hemos encontrado pone de manifiesto una disfunción en este sistema que puede alterar no sólo la modulación de la respuesta al estrés (Lanfumeley L., 2008) sino también la modulación del desarrollo de otros sistemas como el dopaminérgico (Alex K. D., 2007; di Matteo V., 2002).

Además, en el septo se observa un incremento de la concentración de glutamato y taurina en los animales separados también en ambos sexos. El septo es una región cerebral implicada en la regulación del eje HHA (de Kloet E. R., 1998; Díaz Luján V. E., 2008). La taurina interviene en la neurotransmisión aminoacidérgica (del Arco A., 2001; Chepkova A. N., 2006; El Idrissi A., 2008) y se encuentra asociada a terminales glutamatérgicos (Torp R., 1992). Por su función neuroprotectora durante el desarrollo (Oja S. S., 2000), el incremento de este aminoácido en el septo podría ser un mecanismo de compensación del incremento glutamatérgico tras la separación materna.

## ALTERACIONES DEBIDAS A LA SEPARACIÓN MATERNA DURANTE LA ADOLESCENCIA

A la vista de las alteraciones observadas en las primeras semanas de vida debidas a la separación materna, el objetivo de los estudios realizados a lo largo de la adolescencia está enfocado al análisis de las alteraciones en los procesos cognitivos y de las modificaciones a nivel neuroquímico y neuroanatómico que subyacen a ellas. Las modificaciones sexualmente dimórficas que aparecen en el periodo postnatal temprano explican parte de los cambios que hemos encontrado posteriormente en nuestro estudio.

Los resultados del estudio neuroanatómico con el marcador NeuN en PN26 revelan un dimorfismo sexual en la respuesta al estrés postnatal de la población neuronal, que indica que las hembras que han sido sometidas a separación materna incrementan la densidad neuronal en el hipocampo, la corteza prefrontal y el estriado, probablemente como respuesta a daños inducidos por el estrés repetido. Cabe destacar el aumento en el hipocampo, especialmente llamativo en el giro dentado; esta es la región más sensible del hipocampo al estrés mantenido durante el desarrollo postnatal (*Gould E., 1999*) por ser cuando ocurre la proliferación de células granulares, proceso que está regulado negativamente por los glucocorticoides (*Gould E., 1999; McEwen B. S., 1991*). Este aumento de la población neuronal podría deberse a un incremento de la proliferación o a una disminución de la muerte neuronal. Para poder definir la causa de este incremento poblacional, nos apoyamos en los resultados obtenidos de la concentración de taurina en estas regiones cerebrales. Se sabe que la taurina en cultivos celulares estimula la proliferación neuronal, de manera independiente de la acción de GABA (*Hernández-Benítez R., 2012*); sin embargo, en las hembras no se observan variaciones en el contenido de este aminoácido en el periodo postnatal temprano, por lo que podríamos pensar que la diferencia en la densidad neuronal podría deberse a una disminución en la muerte neuronal típica del desarrollo cerebral. Además, no hemos observado variaciones en la expresión de las subunidades estudiadas de los receptores AMPA ni NMDA (a excepción de la expresión de GluR1 en la corteza prefrontal), lo que indica que a pesar del incremento en el número de neuronas en estas regiones cerebrales no se ha modificado la expresión de receptores de glutamato. Además, en contra de lo esperado por un incremento neuronal, la concentración de glutamato de las hembras SM en la adolescencia temprana no difiere de los controles. En su conjunto, estas observaciones apuntan a una posible regulación a la baja de receptores de glutamato para evitar un proceso de excitotoxicidad inducido por el incremento glutamatérgico que se produce por el estrés que supone la separación materna.

Por otro lado, el marcaje de células que contienen CB en la adolescencia temprana es mayor en las hembras que en los machos que han sufrido separación materna. Está descrito que las proteínas enlazantes de calcio modulan la concentración de calcio intracelular (*Lephart D., 1999*), por lo que un incremento de las mismas podría asegurar la supervivencia neuronal en procesos de excitotoxicidad. Teniendo en cuenta este resultado, parece que las hembras sometidas a este procedimiento experimental no sólo regulan a la baja los receptores de glutamato, sino que también activan mecanismos de control de la concentración de calcio para evitar daños celulares inducidos por estrés postnatal.

La corteza prefrontal de las hembras que han sufrido separación materna es la única región cerebral estudiada en la adolescencia temprana en la que encontramos un incremento de la subunidad GluR1 del receptor AMPA de glutamato además de un incremento de la densidad neuronal; asimismo, se observa un aumento de las proteínas enlazantes de calcio calbindina y parvalbúmina. Se sabe que las neuronas no-piramidales que contienen calbindina o parvalbúmina son GABAérgicas en la mayoría de las áreas corticales (*deFelipe J., 1993*), y que el estrés temprano puede interferir directamente con el desarrollo de diferentes poblaciones de interneuronas GABAérgicas en la corteza prefrontal (*Helmeke C., 2008*), por lo que el aumento de proteínas enlazantes de calcio en esta región podría deberse también a un incremento de interneuronas GABAérgicas. De esta manera, el aumento de glutamato tras la separación materna, que podría tener efectos deletéreos en la corteza prefrontal por hiperactivación de los receptores AMPA, estaría amortiguado por la presencia de proteínas enlazantes de calcio.

Los resultados del estudio neuroanatómico de los machos en PN26 revelan diferencias en las modificaciones inducidas por la separación materna con respecto a lo observado en las hembras: los machos parecen alterar la modulación del sistema glutamatérgico como consecuencia del estrés postnatal repetido, especialmente en el hipocampo y la corteza prefrontal. A pesar de que la expresión de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA de glutamato no varían, en PN 26 los machos SM sí muestran una disminución en la distribución de la enzima nNOS hipocampal, apuntando a una disfunción en la transmisión glutamatérgica. El NO modula el receptor NMDA de glutamato (*Bliss T., 1996; Wink D. A., 1996*) y el incremento de la liberación de glutamato activa su síntesis (*Ignarro L. J., 2000*). Estos estudios sugieren que una falta de NO dificultaría la función glutamatérgica, lo que apoya la disminución de la concentración de glutamato hipocampal que muestran los machos sometidos a separación materna en la adolescencia temprana en relación a la disminución de la expresión de la enzima nNOS que demuestran nuestros resultados de inmunotinción.

La disminución del marcaje de nNOS también se hace patente en la corteza prefrontal de los machos que han sufrido estrés postnatal. En esta región cerebral hemos encontrado además un incremento de calbindina y parvalbúmina, lo que explica la disminución de nNOS: esta enzima es dependiente de calcio (*Ignarro L. J., 2000*), y un incremento de proteínas enlazantes de calcio, que disminuye la concentración de calcio intracelular (*Lephart E. D., 1999*), induciría una disminución de la expresión de esta enzima.

Por otra parte, en el hipocampo, las células que contienen nNOS son interneuronas GABAérgicas (*Valtschanoff J. G., 1993*), igual que las neuronas nNOS positivas corticales (*Chesselet M. F., 1989; Gabbott P. L., 1995*). Considerando estos estudios, la disminución del marcaje con nNOS que muestra nuestro estudio neuroanatómico podría ser el resultado de una disminución de las neuronas GABAérgicas como consecuencia del estrés temprano (*Hsu F. C., 2003*), lo que explicaría en parte la disminución del contenido de este aminoácido en el hipocampo de los machos SM en la adolescencia temprana.

En el estudio neuroanatómico en PN26 de la amígdala hemos encontrado un incremento significativo de las proteínas enlazantes de calcio calbindina y parvalbúmina en los animales separados de ambos sexos, que sugiere la importancia de su papel y su regulación en respuesta al estrés temprano. Las variaciones de glucocorticoides regulan la actividad de esta región cerebral (*Karst H., 2002*), que está implicada en la regulación de las respuestas emocionales y en la formación de recuerdos emocionales fuertes (*Oitzl M. S., 2010*), por lo que el incremento de estas proteínas en ambos sexos como consecuencia de la separación materna podría ser un mecanismo de neuroprotección (*Lephart E. D., 1999*). La amígdala es necesaria para que ocurra un cambio entre el procesamiento de las relaciones asociativas de la representación espacial-contextual a través del hipocampo en una representación procedural, como respuesta a un estímulo a través del núcleo caudado como consecuencia de la exposición a estrés (*Beck K. D., 2010*). Su activación como consecuencia del estrés facilita la plasticidad hipocampal y el almacenamiento de información (*Zoladz P. R., 2013*), y las proteínas enlazantes de calcio, que regulan las señales pre y postsinápticas, intervienen en la plasticidad dendrítica (*Giachino C. 2007, Schwaller B. 2002*).

En la adolescencia temprana, las **capacidades cognitivas** estudiadas no presentan diferencias sexuales. Esto podría tener su explicación en el hecho de que en este periodo aún no se ha alcanzado la madurez sexual: hasta la quinta semana postnatal no tiene lugar el pico de producción de estradiol, hasta la sexta no comienzan los ciclos estrales regulares ni la producción de esperma y hasta la octava no se alcanza el pico de testosterona (*McCormick C. M., 2010a*).

La **memoria de reconocimiento**, estudiada en el campo abierto, no varía en machos y hembras ni tampoco con la edad. Además no está afectada por la separación materna. Este tipo de memoria supone la capacidad de reconocer y discernir entre dos objetos diferentes, capacidad necesaria para el reconocimiento del entorno y la supervivencia (Steckler T., 1998), lo que explicaría el hecho de que no presente dimorfismos sexuales ni se vea alterada debido al estrés postnatal.

Está descrito que la corteza prefrontal medial interviene en esta capacidad cognitiva (Ennaceur, A., 1997; Steckler T., 1998), y a la vista de nuestros resultados, modificaciones como el incremento del marcaje con GluR1 en las hembras SM, la disminución del marcaje con nNOS en los machos SM o el incremento de proteínas enlazantes de calcio, nos indican la activación de mecanismos compensatorios que permiten que funciones como el reconocimiento de objetos no se alteren como consecuencia del estrés postnatal temprano. Por otra parte, en el análisis neuroquímico y neuroanatómico del hipocampo en la adolescencia, hemos observado tanto dimorfismos sexuales en el contenido de varios neurotransmisores como distintas modificaciones debido a la separación materna, por lo que podemos afirmar, como ya lo hicieron otros autores (Ennaceur A., 1997; Steckler T., 1998) que esta región cerebral no está directamente implicada en la memoria de reconocimiento no espacial de los objetos.

En referencia a la **actividad motora**, nuestros resultados muestran una disminución de la misma en la adolescencia temprana en animales de ambos sexos tras la separación materna, que también induce una disminución del número de posturas erguidas. Una disminución en la locomoción está relacionada con una disminución de la liberación de dopamina en el estriado (Cabib S., 1994), región cerebral que está relacionada con la actividad motora y exploratoria, de manera que en respuesta a estrés, la vía nigroestriatal se activa (Chocyck A., 2011). Las hembras que han sufrido separación materna muestran un incremento de la tasa de recambio de la dopamina en el estriado en PN35, pero sin embargo no encontramos alteraciones de los niveles de esta monoamina en los machos. Esto se explica porque los glucocorticoides modifican el desarrollo de las vías dopaminérgicas (Braun K., 2000; Chocyck A., 2011) pero, debido al estrés, se producen diferentes variaciones de la concentración de dopamina en función del sexo (Beck K. D., 2002). Por otra parte, en el hipocampo de los animales que han sufrido separación materna observamos un incremento de la tasa de recambio de la dopamina y una disminución de la concentración de serotonina. Una disminución de serotonina evita la habituación motora en el campo abierto (Bidzinski A., 1998), lo que puede estar directamente relacionado con la disminución de la actividad motora.

Estos animales también presentan una disminución de la concentración de dopamina en el septo, aunque estadísticamente no es significativa; en esta región cerebral también se observa un

incremento del turnover de dopamina y una disminución de serotonina sólo en las hembras separadas. Las alteraciones que se producen en el hipocampo afectan a la función estriatal, puesto que esta región cerebral está relacionada directa (Steckler T., 1998; Schwabe L., 2012) e indirectamente (Cammarota M., 2008) con el estriado. El septo está asimismo relacionado con el estriado y con el hipocampo (Beck K. D., 2010), y está implicado en los procesos de control emocional a través de la vía mesolímbica (Barili P., 1998; Ruiz-Gallo M., 2008) y en las funciones comportamentales a través de la transmisión serotoninérgica (Hensler J. G., 2006). A la vista de las alteraciones que hemos encontrado, la disminución de la actividad motora en la adolescencia temprana está determinada por una disfunción dopaminérgica en los animales sometidos a separación materna. Cabe destacar que la concentración de GABA también está disminuida en el septo en ambos sexos. Podría ser que esta disminución de la función inhibitoria (Herlenius E., 2004) esté relacionada con las disfunciones hipocampales encontradas en machos y hembras, así como los cambios en el sistema serotoninérgico, que modula la transmisión dopaminérgica (Alex K. D., 2007; di Matteo V., 2002).

En el estriado de los machos separados, observamos además una disminución de los niveles de glutamato, patente también en el hipocampo. Este aminoácido también interviene en el comportamiento motor (Baumann M. H., 2011; Galvan A., 2006) y con la modulación del sistema dopaminérgico (Reiner A., 2010), por lo que esta alteración en el sistema glutamatérgico de los machos puede estar asimismo relacionada con la disminución de su actividad motora en la adolescencia temprana.

Parece que el estrés producido por la separación materna provoca una disminución de la actividad motora de los animales con bases neuronales sexualmente dimórficas; en las hembras está relacionada con una disfunción dopaminérgica y en los machos, además, con una disfunción glutamatérgica. En cualquier caso esta capacidad depende de la actividad estriatal y de su modulación por el hipocampo y el septo.

La **actividad motora** y el **comportamiento impulsivo** están estrechamente relacionados por ser características del comportamiento exploratorio de los animales, en el que interviene la transmisión glutamatérgica (Baumann M. H., 2011; Galvan A., 2006). Aunque no hemos encontrado variaciones significativas en el comportamiento impulsivo de los animales en la adolescencia temprana, la deambulación central de los machos separados está disminuida con respecto a la de los machos control a esta edad. Estos animales, como ya hemos visto, presentan una alteración en la transmisión glutamatérgica: la expresión de la enzima nNOS está disminuida en su corteza prefrontal y en su hipocampo, donde también aparece disminuida la concentración de glutamato. Por una parte, se sabe que la vía mesocortical dopaminérgica interviene en procesos emocionales (Ruiz-Gallo M., 2008) y funciones ejecutivas (Buckert M., 2012), y por otra, que la corteza se relaciona con el hipocampo a través de la modulación de la transmisión excitatoria (Barili P., 1998); la vía mesolímbica, junto con la vía mesocortical, también está implicada en procesos de control emocional (Horsley R. R., 2007; Madrugá C., 2006; Ruiz-Gallo M., 2008). Analizando estas observaciones en su conjunto, nuestros resultados sugieren que el comportamiento impulsivo está relacionado con la transmisión glutamatérgica y la modulación que ejerce en las distintas vías dopaminérgicas.

En línea con estas observaciones, en la **adolescencia tardía** la actividad motora y el comportamiento impulsivo presentan un dimorfismo sexual en los animales controles. Tanto la deambulación total como el ratio de deambulación interna y el número de posturas erguidas son mayores en hembras que en machos. La concentración de dopamina y serotonina en el hipocampo es mayor en las hembras control, así como la concentración de serotonina en el estriado; estos dimorfismos podrían explicar una potenciación de la función dopaminérgica (Alex K. D., 2007; di Matteo V., 2002); asimismo, la concentración de glutamato y GABA en el hipocampo y el estriado también es mayor en las hembras, por lo que las diferencias sexuales en la actividad motora y la impulsividad en la adolescencia tardía parecen estar relacionadas no sólo con los sistemas dopaminérgicos de neurotransmisión (Ruiz-Gallo M., 2008), sino también con los aminoacidérgicos que los modulan (Baumann M. H., 2011; Galvan A., 2006; Reiner A., 2010). Nuestros resultados están de acuerdo con trabajos previos que describen un dimorfismo sexual en el comportamiento exploratorio de los animales (Bowman R. E., 2003; Duchesne A., 2009).

La separación materna no produce alteraciones motoras en PN56, pero sin embargo, si induce variaciones en el comportamiento impulsivo de los machos en este momento del desarrollo. Este resultado esta en línea con diversos autores que han encontrado un incremento de la impulsividad como consecuencia de la separación materna (*Catalani A., 2000; Colorado R., 2006; Kwak H. R., 2009; Lambas-Señas L., 2009; Neumann I. D., 2005; Pickering C., 2006; Rees S. L., 2006; Roman E., 2006*), así como una respuesta sexualmente dimórfica en los comportamientos emocionales en respuesta a un estrés (*Díaz-Luján V. E., 2008*). En machos que han sufrido separación materna incrementa la concentración de glutamato en el estriado y taurina en la misma región cerebral. Como la taurina se encuentra asociada a terminales glutamatérgicos (*Torp R., 1992*) y potencia la transmisión de este aminoácido (*del Olmo N., 2000a*), el aumento de la función glutamatérgica en esta región cerebral a la que apuntan nuestros resultados, como hemos comentado anteriormente, podría ser el motivo por el que la impulsividad de los machos separados aparece incrementada en la adolescencia tardía. Cabe destacar que la taurina, de manera exógena, inhibe la liberación y síntesis de serotonina (*Kong X. W., 2006*), lo que explica el incremento de la tasa de recambio serotoninérgica que aparece también en el estriado en estos animales.

Los resultados de nuestro estudio apuntan que la **memoria de reconocimiento espacial** varía según el sexo y el momento del desarrollo. En la adolescencia temprana ninguno de los dos sexos posee la capacidad de reconocer el cambio de posición de un objeto previamente presentado, y la separación materna no tiene ningún efecto sobre la misma. Sin embargo, en la adolescencia tardía aparece un dimorfismo sexual en la capacidad de localización espacial, que es mayor en los machos control. Este dimorfismo sexual ya se había observado en la capacidad de reconocimiento espacial en otros estudios (*Jonnasson Z., 2005; Sutcliffe J. S., 2007*), y la observación en nuestros resultados en la adolescencia tardía, cerca de la madurez sexual, está además en concordancia con el hecho de que el uso de diferentes estrategias en la resolución de laberintos depende en parte de los estrógenos (*Beck K. D., 2010*), que intervienen en los procesos de aprendizaje (*Catalani A., 2011; Daniel J. M., 2006; Mendez Lopez M., 2009; Sutcliffe J. S., 2007*), adquisición y retención de la memoria espacial (*Daniel J. M., 1999*). La mayoría de los machos usa estrategias de lugar o la memoria de referencia, como ir a un determinado brazo, y la mayoría de las hembras usa una estrategia de respuesta o la memoria de trabajo, como girar en una determinada dirección (*Beck K. D., 2010; Galea L. A. M., 2001*). Estas observaciones explican el hecho de que en la adolescencia tardía la capacidad de reconocimiento espacial de objetos sea mejor en los machos control, que sin embargo cometen un mayor número de errores que las hembras control en la resolución del laberinto radial de 8 brazos.

Nuestros resultados muestran una alteración de la memoria espacial en la adolescencia tardía sólo en los machos separados; este resultado está apoyado por otros estudios que muestran que las alteraciones causadas en la memoria y el aprendizaje por estrés están más relacionadas con los machos que con las hembras (Zoladz P. R., 2013), que son más resistentes al empeoramiento de la memoria como consecuencia del estrés (Bowman R. E., 2005). Por otra parte, cabe destacar que los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento impulsivo también muestran cambios sólo en los machos; la resolución del laberinto radial se realiza mejor y con un menor número de errores si los animales muestran hiperactividad (Görisch J., 2006), por lo que, aunque no se observe un incremento de la deambulación total, el aumento de la impulsividad de los machos separados podría estar relacionado con la mejora de su resolución del laberinto radial, de manera que la emotividad de los animales influya en sus capacidades cognitivas. De hecho, en la adolescencia tardía, las hembras control muestran una mayor actividad motora e impulsividad y en la resolución del laberinto radial de 8 brazos cometen un menor número de errores que los machos control.

El empeoramiento de la capacidad de reconocimiento espacial de los machos separados en la prueba de localización de objetos indica un empeoramiento de la memoria de referencia de estos animales, que sin embargo, aparece mejorada en el laberinto radial de 8 brazos en la prueba de adquisición de memoria. Las diferencias obtenidas entre los resultados de la memoria espacial estudiada en el campo abierto y en el laberinto de 8 brazos se deben a que en el primer aparato se analiza la capacidad de reconocimiento espacial *per se* y en el segundo la adquisición de la memoria espacial tras un aprendizaje condicionado: los laberintos son instrumentos que permiten el estudio de la memoria empleando un refuerzo, por lo que en cierto modo suponen un estrés para los animales sometidos a este tipo de pruebas (Catalani A., 2011). El aprendizaje y la adquisición de la memoria están influidos por el sexo, y las hembras no sólo aprenden más rápido que los machos en pruebas instrumentales (Bimonte H. A., 2000; Catalani A., 2011), sino que además son más resistentes que los machos a los efectos adversos del estrés en la memoria (Bowman R. E., 2005; Catalani A., 2011). El estradiol regula los efectos organizativos en las capacidades cognitivas del estrés y protege contra los efectos de la corticosterona, por esto en la adolescencia tardía, cuando ya existen ciclos estrales regulares (McCormick C. M., 2010a) los machos expresan más efectos morfológicos y comportamentales frente a la exposición a estrés que las hembras (Catalani A., 2011). Por otro lado, se ha visto que el procesamiento de la memoria tras un estrés leve mejora más rápidamente en machos que previamente han sido sometidos a separación materna (Bagot R. C., 2009), y que su respuesta de liberación de corticosterona está amortiguada (Daniels W. M. U., 2004). Por esto, las hembras controles resuelven mejor el laberinto radial de 8 brazos, que supone

un ligero estrés (*Carrillo-Mora P., 2009; Catalani A., 2011*), pero los machos que han sido previamente sometidos a separación materna mejoran su resolución.

En la adolescencia tardía, las hembras separadas muestran variaciones en los niveles de glutamato y GABA en el hipocampo ventral y el estriado que no parecen tener efectos a nivel comportamental, y los machos, presentan variaciones en los sistemas de transmisión aminoacídicos que parecen estar relacionadas con las variaciones en sus capacidades cognitivas. Sin embargo, está descrito que las áreas activadas en la conducta espacial en machos y hembras son diferentes (*Beck K. D., 2010*). En las hembras separadas, la disminución de GABA y glutamato, cuya biosíntesis está relacionada (*Hassel B., 2006*), parece ser un mecanismo de compensación para evitar alteraciones de los procesos cognitivos en la adolescencia tardía.

Las modificaciones que muestran los machos separados en la concentración de taurina y GABA pueden explicar los cambios que presentan en su memoria espacial.

Los niveles de GABA en el hipocampo ventral están aumentados en los machos SM, así como la concentración de glutamato, aunque estadísticamente no es significativo. Se sabe que la taurina está asociada con el sistema GABAérgico a través de la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> (*Paula-Lima, 2005*). Un incremento de la concentración de glutamato induce una liberación de GABA y taurina actuando a través del NO retrógrado de las neuronas postsinápticas (*Oja S. S., 2000; Paula-Lima A. C., 2005; Saransaari P., 1997b*). Asociada al sistema GABAérgico, la taurina tiene efectos depresores del sistema nervioso por activación de receptores GABA<sub>A</sub> (*Saransaari P., 1997b*); el incremento de GABA y taurina en el hipocampo ventral de los machos separados explica la disminución de la capacidad de reconocimiento espacial de estos animales en la adolescencia tardía, por una disfunción de la actividad hipocampal, necesaria para la memoria espacial (*Aggleton J. P., 2004; Bliss T., 1996; Cassel J. C., 1998; Galani R., 1998; He J., 2002; Kosten T., 2007a*).

Por otra parte, la taurina está relacionado con la formación de la memoria (*del Olmo N., 2000a, 2003*) e interviene, con el mecanismo de LLP<sub>TAU</sub> en el proceso de consolidación de la LTP (*del Olmo N., 2003; Suárez L. M., 2013*). Este aminoácido se puede encontrar asociado a terminales glutamatérgicos (*Torp T., 1992*), en los que facilita la excitabilidad sináptica disminuyendo el umbral de activación (*del Olmo N., 2000a*). De acuerdo a estos estudios, un incremento de taurina induce una mejora de la formación de la memoria a largo plazo. Asimismo, se sabe que el NO contribuye a la formación de la fase tardía de la LTP (*Ignarro L. J., 2000*). En el estudio neuroanatómico de los animales adultos, el marcaje de nNOS en los machos separados está incrementado; este resultado apunta una activación excitatoria en esta región cerebral que podría ser patente en la

adolescencia tardía. Se sabe que la reactivación sináptica es necesaria para la formación de L-LTP (Frey U., 1998), y un incremento de la síntesis de NO podría indicar una mejora del proceso de formación de memoria a largo plazo. Además, está descrita una relación entre la liberación de taurina y NO (Saransaari P., 1999). Teniendo en cuenta estos resultados en su conjunto, las variaciones encontradas en la enzima nNOS y en la concentración de taurina en el hipocampo ventral de los machos separados, apuntan una mejora de la formación de la memoria espacial a largo plazo, reflejada en los resultados de adquisición y consolidación de la memoria obtenidos en el laberinto radial de 8 brazos.

Está descrito que la separación materna modifica el proceso de LTP de manera diferente en machos y hembras (Bronzino J. D., 1996), lo que apoya las diferentes variaciones que encontramos en ambos sexos en los aminoácidos implicados en este proceso.

Además de las variaciones en el hipocampo ventral, los machos separados presentan un aumento de glutamato y taurina también en el estriado, que es una estructura implicada en el reconocimiento espacial además de en el comportamiento exploratorio y motor de los animales (Schwabe L., 2012), por lo que estas variaciones pueden asimismo estar relacionadas con la adquisición y consolidación de la memoria espacial de estos animales.

A pesar de que la inducción de LTP también depende de la activación de receptores de dopamina (Suárez L. M., 2013), que actúa como regulador de cambios sinápticos en distintas regiones cerebrales (Jay T. M., 2003), los machos sometidos a separación materna no presentan alteraciones en los niveles de esta monoamina. De hecho este sistema no presenta alteraciones en la adolescencia tardía que parezcan tener efectos en los procesos cognitivos de los animales sometidos a separación materna.

## ALTERACIONES DEBIDAS A LA SEPARACIÓN MATERNA EN LA EDAD ADULTA

Con el fin de esclarecer si la separación materna tiene efectos a largo plazo y si las alteraciones que hemos observado a lo largo del desarrollo se mantienen, llevamos a cabo un estudio de los procesos cognitivos y un análisis neuroquímico en la edad adulta. Asimismo, realizamos un análisis neuroanatómico con los marcadores con los que obtuvimos los resultados más significativos en la adolescencia temprana.

En lo concerniente a los mecanismos de respuesta al estrés, la taurina en las hembras adultas que han sido sometidas a separación materna está disminuida en todas las regiones cerebrales estudiadas. Por otro lado, en estos animales se mantiene en la edad adulta el incremento de parvalbúmina que aparece en la adolescencia. Como ya hemos visto anteriormente, la taurina es un aminoácido con propiedades neuroprotectoras (*Hada J., 1996; Oja 2000; Saransaari P., 1997a; Tadros M. G., 2005; Wu H., 2005*) por su capacidad de tamponar el incremento de calcio (*Chen S. W., 2004; El Idrissi A., 2008*). Además, la taurina facilita la procesos de plasticidad sináptica (*del Olmo N., 2000a*). Las proteínas enlazantes de calcio no sólo modulan la concentración de calcio intracelular (*Lephart E. D., 1999*), sino que también regulan las señales pre y postsinápticas e intervienen en la plasticidad de las dendritas (*Giachino C. 2007, Schwaller B. 2002*). Teniendo estas observaciones en cuenta, nuestros resultados sugieren que el mantenimiento del incremento de esta proteína enlazante de calcio en el hipocampo, que está implicado en la regulación de la actividad del eje HHA (*Dedovic K., 2009*), es un mecanismo de protección frente a posibles daños neuronales por excitotoxicidad, ante la disminución de otros mecanismos de neuroprotección como la taurina.

Nuestros resultados demuestran que existen modificaciones en la actividad de los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico y serotoninérgico en distintas regiones cerebrales. Está descrito que las experiencias adversas durante el desarrollo postnatal producen alteraciones en estos sistemas que se manifiestan en la edad adulta (*Gardner K. L., 2009*). Además, ponen de manifiesto distintas alteraciones en la actividad motora, la impulsividad y la capacidad de reconocimiento espacial.

El comportamiento impulsivo de los animales separados de ambos sexos está incrementado en la edad adulta. El incremento de la tasa de recambio serotoninérgico que presentan en el hipocampo, junto con la disminución de GABA en el hipocampo ventral parecen inducir una disminución de la inhibición de esta región en la modulación del estriado (*Schwabe L., 2012; Steckler T., 1998*), resultando en un incremento de la impulsividad de estos animales. La tasa de recambio de la dopamina en el septo también está incrementada, pudiendo estar afectando asimismo esta regulación.

Por otra parte, en los machos que han sufrido separación materna se observa una disminución de la concentración de dopamina en el hipocampo ventral, lo que refleja una disfunción de la transmisión dopaminérgica que resulta en la disminución de la actividad motora que muestran estos animales en la edad adulta (*Herlenius E., 2004; Jay T. M., 2003; Ruiz-Gallo M., 2008*). Además, la separación materna induce un incremento de la capacidad de reconocimiento espacial en los machos. De acuerdo con la relación de la función del hipocampo ventral con esta capacidad cognitiva (*Aggleton J. P., 2004; Bliss T., 1996; Cassel J. C., 1998; Galani R., 1998; He J., 2002; Kosten T., 2007a*), tal como hemos descrito en la adolescencia tardía, la causa de esta modificación puede ser la variación del contenido de GABA que presentan los machos separados. La disminución de la inhibición en el hipocampo ventral, que se pone de manifiesto en los menores niveles de GABA encontrados en estos animales, indica un incremento de la actividad de esta región hipocampal, implicada en la memoria espacial.

Las hembras separadas, en la edad adulta muestran un incremento del número de posturas erguidas y un incremento de la impulsividad, que pueden estar relacionadas con el empeoramiento de la capacidad de reconocimiento espacial de estos animales. En este momento del desarrollo, las hembras que han sufrido separación materna presentan variaciones en la transmisión dopaminérgica, serotoninérgica y aminoacidérgica en el hipocampo, septo y estriado, sistemas implicados en el comportamiento exploratorio (*Ruiz-Gallo M., 2008; Galvan A., 2006; Baumann M. H., 2011*), que aparece alterado en nuestros resultados.

## DISCUSIÓN GENERAL

La respuesta al estrés y la realización de tareas cognitivas parece estar programada por diferentes niveles de cuidados maternos (*Liu D., 2000*). Nuestro trabajo, a diferencia de otros estudios de separación materna prolongada, no muestra un incremento de la actividad motora ni una disminución del comportamiento exploratorio de los animales adolescentes y adultos (*Aisa B., 2007; Colorado R., 2006; Huot R. L., 2002; Slotten H., 2006; Wigger A., 1999*); además, deja patente una mejora de la memoria espacial en los distintos momentos del desarrollo analizados, asemejando nuestros resultados a los obtenidos en experimentos de periodos breves de separación materna o incluso a trabajos de manipulación postnatal en lo que a mejoras cognitivas se refiere (*Biagini G., 1998; Bilbo S. D., 2007; Cannizzaro C., 2006; Durand M., 1998; Guijarro 2007; Kosten 2007; Lehmann 2002; Pickering 2006; Roman, 2006; Roozental 2002*).

Para entender las diferencias encontradas con resultados de estudios previos hay que tener en cuenta que no todos los estudios acerca de las consecuencias de la separación materna en los procesos cognitivos siguen el mismo protocolo de separación (*Nishi M., 2013*): existen variaciones tanto en el número de días de separación como en el tiempo de la misma. El protocolo que hemos seguido nosotros (*Colorado R., 2006*), con dos días de descanso en el periodo de separación materna, constituye una manera no sólo de evitar diferencias en la alimentación y el peso de los animales que podrían interferir con los resultados, sino de evitar la sensibilización al estrés; es posible que esta pausa en la aplicación del estrés sea clave para evitar efectos deletéreos en el periodo postnatal temprano y suponga en cambio una ventaja en el desarrollo.

Otro factor a tener en cuenta es que la mayoría de los estudios se realizan en la adolescencia o en la edad adulta y no siempre en animales de ambos sexos, por lo que los resultados obtenidos con protocolos similares de separación tampoco son comparables. Los efectos del estrés son distintos en machos y hembras (*Bowman R. E., 2005; Zoladz P. R., 2013*), y está descrito que aunque en machos no varían a lo largo de la edad, en las hembras son diferentes en la adolescencia y la edad adulta (*Bowman R. E., 2005*), y también varían en función del ciclo estral (*Bowman R. E., 2001*).

Por otra parte, los estudios comportamentales no siempre se acompañan de estudios neuroquímicos o neuroanatómicos, así como los estudios moleculares no suelen llevar asociados estudios de comportamiento. Los resultados de nuestro estudio sirven para esclarecer las diferentes variaciones neuroquímicas y neuroanatómicas que pueden explicar los cambios en la respuesta al estrés en machos y hembras, así como la relación entre las capacidades cognitivas de los animales y los procesos neurobiológicos que subyacen a ellas. Asimismo este trabajo pone de manifiesto la importancia del estudio de los mismos en ambos sexos y a diferentes edades.

Los cambios debidos a separación materna no sólo se deben a las variaciones en los niveles de corticosterona, sino también a la regulación extrahipotalámica del eje HHA durante el desarrollo postnatal y a las variaciones de neurotransmisores (*Faturi C. B., 2010*), como demuestran los resultados de nuestro estudio. Además, los efectos de este procedimiento de estrés postnatal pueden ser beneficiosos; diversos trabajos apuntan una mejora de las capacidades cognitivas como consecuencia de la separación materna (*Pryce C. R., 2003; Schäble S., 2007; Weiss I. C., 2001*), así como una respuesta amortiguada de liberación de corticosterona (*Daniels W. M. U., 2004*) y una mejora de la función hipocampal (*Bagot R. C., 2009*) tras la exposición a estrés en la adolescencia y la edad adulta. A la vista de estas observaciones, la mejora cognitiva que demuestran nuestros resultados nos plantea que la separación materna repetida durante largos periodos de tiempo puede ser un procedimiento con consecuencias positivas para las crías a largo plazo. De la misma manera que el estrés agudo durante el aprendizaje mejora esta capacidad (*Beck K. D., 2010; Chaouloff F., 2008; Roozendaal B., 2002*), el estrés postnatal temprano podría preparar a los animales para enfrentarse de una manera más efectiva a determinadas tareas cognitivas a lo largo de la vida. La disminución de los cuidados maternos puede ser interpretada en las crías como una señal de adversidad ambiental (*Meaney M. J., 2002*) induciendo un reajuste de la adaptabilidad y regulación de los sistemas neuroendocrinos implicados en las respuestas de miedo y estrés de las crías (*Macrì S., 2006*) que les proporcione un beneficio en la respuesta a un estímulo peligroso en la edad adulta.

Las experiencias tempranas pueden ser importantes para predecir posibles demandas y problemas que puedan aparecer a lo largo de la vida del animal (*Schwabe L., 2012*), permitiendo definir estrategias adaptativas en una edad más avanzada (*Meaney M. J., 1996*), y nuestros resultados son el reflejo de cómo la exposición repetida a estrés durante el desarrollo postnatal temprano pone en marcha la modificación de los sistemas de respuesta a estrés y de neurotransmisión, de manera distinta en función del sexo.

# **CONCLUSIONES**

De los resultados de este trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1. En respuesta al estrés inducido por la separación materna se modifican los niveles de corticosterona en plasma, que presentan un marcado dimorfismo sexual.
2. La separación materna produce alteraciones sexualmente dimórficas en los sistemas monoaminérgicos de neurotransmisión, en todas las regiones cerebrales estudiadas, en los distintos momentos del desarrollo.
3. Las concentraciones de GABA y Glutamato varían con la edad siguiendo un mismo patrón, que se ve alterado por la separación materna, de distinto modo en función del sexo.
4. La concentración de taurina se ve afectada por la separación materna de manera sexualmente dimórfica en las distintas regiones cerebrales analizadas y en todas las edades estudiadas.
5. El modelo de separación materna utilizado no provoca pérdida neuronal en las regiones cerebrales estudiadas, ni disminuye el número de receptores de glutamato, indicando que no se produce daño neuronal como consecuencia de la separación materna.
6. El incremento de la densidad de proteínas enlazantes de calcio muestra que la separación materna pone en marcha mecanismos de compensación frente a un posible daño neuronal en machos y hembras.
7. La activación de los mecanismos de neuromodulación, como compensación de las alteraciones debidas a la separación materna, es diferente en ambos sexos. En hembras, las modificaciones de éstos se mantienen en el adulto, pero, sin embargo, en machos revierten.
8. La memoria de reconocimiento estudiada en el campo abierto no varía en los animales debido al sexo ni a la edad, así como tampoco a consecuencia de la separación materna, sin embargo, si se producen alteraciones de la memoria de reconocimiento espacial.
9. La separación materna afecta a la actividad motora de los animales a corto plazo y la modifica, de manera dependiente del sexo, en la edad adulta. Asimismo produce alteraciones en el comportamiento impulsivo, más patentes en los machos.
10. El comportamiento impulsivo de los animales está relacionado con la capacidad de reconocimiento espacial en el campo abierto.

**ANEXO**

DEAMBULACIÓN TOTAL						
		26 días de edad	↔	50 días de edad	↔	170 días de edad
MACHO	control	158,740 ± 13,030	,	173,800 ± 12,300 ss (p=0.002)	,	131,875 ± 18,366
	SM	101,630 ± 7,505 t (p=0.013)	p=0.000	188,678 ± 18,122 s (p=0.024)	p=0.000	57,833 ± 6,074 ss (p=0.004), t (p=0.020)
HEMBRA	control	157,625 ± 10,894	p=0.007	240,556 ± 7,351	p=0.000	137,000 ± 18,514
	SM	108,063 ± 14,442 t (p=0.016)	p=0.000	243,438 ± 12,069	p=0.000	121,846 ± 13,504

POSTURAS ERGUIDAS						
		26 días de edad	↔	50 días de edad	↔	170 días de edad
MACHO	control	25,818 ± 2,471	,	24,550 ± 4,166 ss (p=0.004)	,	22,167 ± 1,195
	SM	11,222 ± 2,471 ttt (p=0.000)	p=0.000	35,300 ± 4,005 ss (p=0.004)	p=0.000	13,286 ± 2,378 t (p=0.041)
HEMBRA	control	23,222 ± 4,766	p=0.011	41,050 ± 2,737	p=0.000	19,375 ± 2,758
	SM	10,800 ± 0,374 ttt (p=0.000)	p=0.000	42,719 ± 3,816	p=0.000	26,000 ± 3,898 t (p=0.041)

RATIO DEAMBULACION INTERNA						
		26 días de edad	↔	50 días de edad	↔	170 días de edad
MACHO	control	0,114 ± 0,020	,	0,064 ± 0,010 ss (p=0.008), tt (p=0.008)	p=0.003	0,164 ± 0,038
	SM	0,072 ± 0,016	p=0.006	0,143 ± 0,017	p=0.000	0,256 ± 0,028 tt (p=0.003)
HEMBRA	control	0,064 ± 0,018	,	0,147 ± 0,020	p=0.003	0,088 ± 0,024
	SM	0,098 ± 0,031	,	0,130 ± 0,009	p=0.000	0,215 ± 0,034 tt (p=0.003)

RATIO DEAMBULACIÓN CENTRAL						
		26 días de edad	↔	50 días de edad	↔	170 días de edad
MACHO	control	0,018 ± 0,003	p=0.010	0,011 ± 0,005 s (p=0.034), t (p=0.035)	p=0.036	0,033 ± 0,008
	SM	0,004 ± 0,002 tt (p=0.004)	p=0.010	0,028 ± 0,006	,	0,038 ± 0,011
HEMBRA	control	0,010 ± 0,004	p=0.010	0,026 ± 0,005	,	0,012 ± 0,006
	SM	0,022 ± 0,008	p=0.010	0,028 ± 0,004	,	0,038 ± 0,012

Tablas 3, 4, 5, 6. Deambulación total (número total de cuadrados recorridos por cada animal), número de posturas erguidas contabilizadas y ratios de la deambulación interna y central en el campo abierto.

Los datos están expresados como media ± error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas (p<0.05, U<0.05) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas (p<0.01, U<0.01), “sss”, “ttt” altamente significativas (p<0.001, U<0.001).

% TIEMPO EXPLORACIÓN OBJETO NUEVO						
		30 días de edad	↔	54 días de edad	↔	174 días de edad
MACHO	control	66,854 ± 10,735	,	77,226 ± 4,374	,	73,481 ± 3,903
	SM	72,649 ± 5,101	,	74,639 ± 3,735	,	71,230 ± 3,561
HEMBRA	control	62,414 ± 9,757	,	80,012 ± 2,620	,	80,906 ± 3,258
	SM	74,865 ± 2,260	,	82,214 ± 1,555	,	78,819 ± 2,469

RATIO ACERCAMIENTOS OBJETO NUEVO						
		30 días de edad	↔	54 días de edad	↔	174 días de edad
MACHO	control	0,603 ± 0,105	,	0,561 ± 0,029	,	0,541 ± 0,019
	SM	0,649 ± 0,015	,	0,558 ± 0,027	,	0,546 ± 0,006
HEMBRA	control	0,534 ± 0,080	,	0,572 ± 0,023	,	0,527 ± 0,019
	SM	0,620 ± 0,037	,	0,543 ± 0,027	,	0,569 ± 0,023

% TIEMPO EXPLORACIÓN OBJETO CAMBIADO						
		33 días de edad	↔	57 días de edad	↔	177 días de edad
MACHO	control	50,854 ± 8,595	,	74,887 ± 5,575 ss (p=0.003), tt (p=0.004)	,	62,670 ± 2,586
	SM	54,102 ± 9,871	,	54,923 ± 2,308	p=0.002	73,386 ± 6,013
HEMBRA	control	52,339 ± 9,323	,	46,898 ± 3,975	p=0.038	59,822 ± 3,892
	SM	35,559 ± 6,762	,	55,570 ± 2,456	p=0.002	60,213 ± 3,840

RATIO ACERCAMIENTOS OBJETO CAMBIADO						
		33 días de edad	↔	57 días de edad	↔	177 días de edad
MACHO	control	0,530 ± 0,067	,	0,645 ± 0,049 ss (p=0.001)	,	0,558 ± 0,035
	SM	0,532 ± 0,081	,	0,556 ± 0,030 ss (p=0.001)	p=0.022	0,686 ± 0,037 ss (p=0.002), t (p=0.048)
HEMBRA	control	0,494 ± 0,086	,	0,463 ± 0,029	,	0,546 ± 0,004
	SM	0,477 ± 0,063	,	0,475 ± 0,032	,	0,512 ± 0,005 ss (p=0.002), tt (p=0.007)

Tablas 7, 8, 9, 10. Porcentaje del tiempo de exploración y ratio de acercamientos al objeto nuevo y al objeto deslocalizado en la segunda fase de las pruebas de reconocimiento y localización de objetos, respectivamente.

Los datos están expresados como media ± error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas (p<0.05, U<0.05) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas (p<0.01, U<0.01), “sss”, “ttt” altamente significativas (p<0.001, U<0.001).

ENTRENAMIENTO		
		nº SESIONES
MACHO	control	6,50 ± 0,93
	SM	5,20 ± 0,79
HEMBRA	control	7,92 ± 1,14
	SM	7,20 ± 0,98

ADQUISICIÓN DE MEMORIA				
		EMT	EMR	ET
MACHO	control	1,85 ± 0,38	3,58 ± 0,21	5,43 ± 0,62 s (p=0.002)
	SM	1,04 ± 0,28	2,92 ± 0,18 s (p=0.042), t (p=0.023)	4,15 ± 0,45
HEMBRA	control	1,14 ± 0,35	2,69 ± 0,46	3,27 ± 0,55
	SM	1,05 ± 0,08	3,45 ± 0,19	4,53 ± 0,25

RETENCIÓN DE MEMORIA				
		EMT	EMR	ET
MACHO	control	0,80 ± 0,25	3,00 ± 0,54	3,80 ± 0,70
	SM	0,00 ± 0,00 s (p=0.049), tt (p=0.010)	2,40 ± 0,43	2,80 ± 0,55
HEMBRA	control	0,36 ± 0,15	2,00 ± 0,52	2,58 ± 0,69
	SM	0,40 ± 0,16	1,90 ± 0,41	2,30 ± 0,52

Tablas 11, 12, 13. Número de sesiones de entrenamiento y número de errores cometidos en las pruebas de adquisición y retención de memoria en el laberinto radial de 8 brazos.

EMT: errores de memoria de trabajo. EMR: errores de memoria de referencia. ET: errores totales.

Los datos están expresados como media ± error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

EXPRESIÓN DE NeuN (N <sup>o</sup> células/mm <sup>2</sup> )				
		HIPOCAMPO MEDIAL	CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL	ESTRIADO
MACHO	control	176 ± 9	1194 ± 42	1238 ± 29
	SM	168 ± 6	1163 ± 41	1263 ± 65
HEMBRA	control	177 ± 10	1247 ± 43	1200 ± 146
	SM	217 ± 6 s (p=0.034); t (p=0.034)	1884 ± 125 s (p=0.021); t (p=0.021)	1647 ± 92 s (p=0.021); t (p=0.034)

EXPRESIÓN DE GluR1 (N <sup>o</sup> células/mm <sup>2</sup> )		
		CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL
MACHO	control	110 ± 4
	SM	114 ± 3
HEMBRA	control	60 ± 4 ss (p=0.009); tt (p=0.009)
	SM	118 ± 11

EXPRESIÓN DE nNOS (N <sup>o</sup> células/mm <sup>2</sup> )			
		HIPOCAMPO MEDIAL	CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL
MACHO	control	31 ± 2 ss (p=0.002); t (p=0.033)	10 ± 1 s (p=0.022); t (p=0.014)
	SM	22 ± 1	6 ± 0
HEMBRA	control	50 ± 2	6 ± 0
	SM	38 ± 7	6 ± 1

EXPRESIÓN DE PARVALBÚMINA (N <sup>o</sup> células/mm <sup>2</sup> )				
		HIPOCAMPO MEDIAL	CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL	AMÍGDALA BASOLATERAL
MACHO	control	27 ± 2	128 ± 9	49 ± 5
	SM	25 ± 2	134 ± 7	71 ± 6 t (p=0.022)
HEMBRA	control	19 ± 1 ss (p=0.006); t (p=0.011)	104 ± 5	44 ± 3
	SM	24 ± 1	121 ± 2 t (p=0.027)	63 ± 8 t (p=0.037)

Tablas 14, 15, 16, 17. Número de células positivas para el marcaje con NeuN, GluR1, nNOS y PV (n<sup>o</sup> células/mm<sup>2</sup>).

Los datos están expresados como media ± error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas (p<0.05, U<0.05) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas (p<0.01, U<0.01), “sss”, “ttt” altamente significativas (p<0.001, U<0.001).

CONCENTRACIÓN DE GABA ( $\mu\text{g/g}$ tejido) HIPOCAMPO DORSAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	85,322 $\pm$ 5,831	p=0.002	181,872 $\pm$ 15,736	p=0.005	75,908 $\pm$ 14,696	,	76,089 $\pm$ 9,796
	SM	152,538 $\pm$ 11,159 tt (p=0.001)	,	146,721 $\pm$ 17,308	,	96,809 $\pm$ 18,922	,	63,462 $\pm$ 4,733
HEMBRA	control	125,640 $\pm$ 31,190	,	188,108 $\pm$ 18,827	,	130,330 $\pm$ 20,247 s (p=0.049)	,	126,168 $\pm$ 18,932 s (p=0.037)
	SM	122,080 $\pm$ 27,918	,	176,561 $\pm$ 9,302	p=0.010	96,990 $\pm$ 18,442	,	76,746 $\pm$ 18,369

CONCENTRACIÓN DE GABA ( $\mu\text{g/g}$ tejido) HIPOCAMPO VENTRAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	88,626 $\pm$ 6,076	p=0.002	204,936 $\pm$ 28,381	p=0.000	69,838 $\pm$ 12,237	p=0.003	139,283 $\pm$ 13,661
	SM	155,246 $\pm$ 8,411 tt (p=0.001)	,	138,596 $\pm$ 21,436 s (p=0.025), t (p=0.048)	,	126,481 $\pm$ 17,677 t (p=0.037)	,	84,587 $\pm$ 14,212 tt (p=0.007)
HEMBRA	control	89,340 $\pm$ 6,850	p=0.014	193,544 $\pm$ 21,914	,	153,960 $\pm$ 9,725 ss (p=0.002), tt (p=0.007)	,	134,205 $\pm$ 16,059
	SM	212,459 $\pm$ 21,219 tt (p=0.006)	,	243,326 $\pm$ 27,722	p=0.000	80,532 $\pm$ 16,069	,	85,034 $\pm$ 22,906 tt (p=0.007)

CONCENTRACIÓN DE GABA ( $\mu\text{g/g}$ tejido) SEPTUM								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	127,524 $\pm$ 22,642	p=0.007	469,086 $\pm$ 89,068	p=0.028	191,562 $\pm$ 42,240	,	201,375 $\pm$ 37,880
	SM	211,932 $\pm$ 39,932	,	229,887 $\pm$ 45,022 t (p=0.043)	,	172,717 $\pm$ 44,117	,	205,425 $\pm$ 34,420
HEMBRA	control	98,433 $\pm$ 9,787	p=0.047	457,536 $\pm$ 156,154	,	241,540 $\pm$ 47,933	,	331,524 $\pm$ 56,648
	SM	287,755 $\pm$ 56,922 tt (p=0.006)	,	285,342 $\pm$ 60,941 t (p=0.043)	,	369,456 $\pm$ 79,577 s (p=0.046)	p=0.046	207,398 $\pm$ 75,220

CONCENTRACIÓN DE GABA ( $\mu\text{g/g}$ tejido) ESTRIADO								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	142,071 $\pm$ 22,928	p=0.007	320,619 $\pm$ 34,809	p=0.000	102,479 $\pm$ 23,886	,	173,358 $\pm$ 12,520
	SM	150,827 $\pm$ 38,112	,	219,786 $\pm$ 25,758	,	169,812 $\pm$ 16,894	,	180,061 $\pm$ 24,056
HEMBRA	control	107,902 $\pm$ 7,660	p=0.014	215,042 $\pm$ 35,123	,	224,182 $\pm$ 30,859 ss (p=0.003), tt (p=0.006)	,	237,765 $\pm$ 27,998
	SM	194,476 $\pm$ 20,225 t (p=0.011)	,	284,625 $\pm$ 37,641	p=0.001	106,290 $\pm$ 7,278	,	183,995 $\pm$ 48,688

Tablas 18, 19, 20, 21. Concentración de GABA ( $\mu\text{g/g}$  tejido) en el hipocampo ventral, hipocampo dorsal, septum y estriado.

Los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente,  
“ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

CONCENTRACIÓN DE GLUTAMATO ( $\mu\text{g/g}$ tejido) HIPOCAMPO DORSAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	223,288 $\pm$ 45,086	p=0.003	1450,941 $\pm$ 82,972	p=0.003	545,304 $\pm$ 113,182	,	502,687 $\pm$ 65,713
	SM	975,833 $\pm$ 210,324 tt (p=0.002)	,	792,453 $\pm$ 178,512 s (p=0.037), t (p=0.018)	,	608,070 $\pm$ 133,118	,	536,578 $\pm$ 132,151
HEMBRA	control	215,897 $\pm$ 78,681	p=0.011	1384,081 $\pm$ 84,866	,	1265,736 $\pm$ 331,864	,	882,674 $\pm$ 149,478 s (p=0.049)
	SM	1208,500 $\pm$ 287,316 t (p=0.016)	,	1539,900 $\pm$ 206,187	p=0.014	619,686 $\pm$ 176,043	,	463,288 $\pm$ 113,798

CONCENTRACIÓN DE GLUTAMATO ( $\mu\text{g/g}$ tejido) HIPOCAMPO VENTRAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	88,137 $\pm$ 21,813	p=0.002	1339,862 $\pm$ 125,241	p=0.004	463,569 $\pm$ 84,373	p=0.027	793,656 $\pm$ 114,598
	SM	701,166 $\pm$ 132,903 tt (p=0.005)	,	816,698 $\pm$ 153,024 s (p=0.037), t (p=0.025)	,	787,041 $\pm$ 154,734	,	606,339 $\pm$ 106,780
HEMBRA	control	126,156 $\pm$ 51,696	p=0.006	1229,524 $\pm$ 147,762	,	1154,880 $\pm$ 62,331 ss (p=0.003), tt (p=0.003)	,	909,705 $\pm$ 101,205
	SM	1116,716 $\pm$ 117,852 tt (p=0.004)	,	1689,972 $\pm$ 288,006	p=0.000	458,177 $\pm$ 140,968	,	658,345 $\pm$ 184,617

CONCENTRACIÓN DE GLUTAMATO ( $\mu\text{g/g}$ tejido) SEPTUM								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	297,425 $\pm$ 36,730	p=0.007	1665,488 $\pm$ 92,653	p=0.027	449,353 $\pm$ 93,045	,	450,290 $\pm$ 38,497
	SM	768,681 $\pm$ 204,026 s (p=0.025), t (p=0.020)	,	1611,566 $\pm$ 552,097	p=0.046	519,016 $\pm$ 158,745	,	400,018 $\pm$ 76,042
HEMBRA	control	189,062 $\pm$ 57,196	p=0.033	1045,984 $\pm$ 344,459	,	466,369 $\pm$ 84,324	,	771,742 $\pm$ 223,490
	SM	2084,562 $\pm$ 418,788 s (p=0.025), tt (p=0.004)	p=0.018	766,499 $\pm$ 95,654	,	664,867 $\pm$ 170,492	p=0.003	120,705 $\pm$ 28,121 s (p=0.010), t (p=0.014)

CONCENTRACIÓN DE GLUTAMATO ( $\mu\text{g/g}$ tejido) ESTRIADO								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	119,066 $\pm$ 20,869	p=0.003	1187,797 $\pm$ 63,332	p=0.000	210,636 $\pm$ 44,136 ss (p=0.006), tt (p=0.008)	p=0.011	496,882 $\pm$ 63,638
	SM	881,878 $\pm$ 129,729 tt (p=0.003)	,	706,486 $\pm$ 102,284 t (p=0.012)	,	602,887 $\pm$ 15,842	,	595,950 $\pm$ 58,041
HEMBRA	control	222,117 $\pm$ 82,547	p=0.014	997,974 $\pm$ 122,986	,	766,493 $\pm$ 173,940	,	827,490 $\pm$ 104,467 s (p=0.028)
	SM	1165,152 $\pm$ 153,755 tt (p=0.004)	,	936,226 $\pm$ 99,732	p=0.010	175,607 $\pm$ 29,989 ss (p=0.008), tt (p=0.006)	,	566,590 $\pm$ 147,070

Tablas 22, 23, 24, 25. Concentración de glutamato ( $\mu\text{g/g}$  tejido) en el hipocampo ventral, hipocampo dorsal, septum y estriado.

Los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

CONCENTRACIÓN DE TAURINA ( $\mu\text{g/g}$ tejido) HIPOCAMPO DORSAL								
		15 días de edad	$\leftrightarrow$	34 días de edad	$\leftrightarrow$	58 días de edad	$\leftrightarrow$	178 días de edad
MACHO	control	541,805 $\pm$ 54,723	p=0.010	1255,307 $\pm$ 166,579	p=0.007	411,520 $\pm$ 65,660	,	547,161 $\pm$ 55,313
	SM	1049,034 $\pm$ 148,420 tt (p=0.005)	,	1015,764 $\pm$ 93,567	p=0.028	661,724 $\pm$ 99,538	,	541,846 $\pm$ 22,222
HEMBRA	control	845,028 $\pm$ 235,904	,	1453,115 $\pm$ 10,735	p=0.020	404,866 $\pm$ 12,048	,	659,381 $\pm$ 34,818
	SM	746,729 $\pm$ 77,073	p=0.036	1293,125 $\pm$ 147,359	p=0.002	439,254 $\pm$ 74,767	,	372,039 $\pm$ 79,262 tt (p=0.005)

CONCENTRACIÓN DE TAURINA ( $\mu\text{g/g}$ tejido) HIPOCAMPO VENTRAL								
		15 días de edad	$\leftrightarrow$	34 días de edad	$\leftrightarrow$	58 días de edad	$\leftrightarrow$	178 días de edad
MACHO	control	484,762 $\pm$ 40,089	p=0.002	1163,006 $\pm$ 140,380	p=0.002	365,617 $\pm$ 49,051	,	459,105 $\pm$ 7,756
	SM	727,585 $\pm$ 117,333	,	810,276 $\pm$ 103,167	,	572,223 $\pm$ 77,392 ss (p=0.009), t (p=0.036)	,	421,149 $\pm$ 39,576
HEMBRA	control	399,267 $\pm$ 49,411	p=0.006	909,685 $\pm$ 98,453	p=0.003	381,446 $\pm$ 33,786	,	491,636 $\pm$ 30,512
	SM	590,468 $\pm$ 78,335	p=0.016	1063,194 $\pm$ 121,163	p=0.002	285,084 $\pm$ 38,749	,	300,408 $\pm$ 60,908 t (p=0.027)

CONCENTRACIÓN DE TAURINA ( $\mu\text{g/g}$ tejido) SEPTUM								
		15 días de edad	$\leftrightarrow$	34 días de edad	$\leftrightarrow$	58 días de edad	$\leftrightarrow$	178 días de edad
MACHO	control	630,053 $\pm$ 73,544	p=0.003	1624,218 $\pm$ 88,673	p=0.003	412,832 $\pm$ 83,073	,	474,110 $\pm$ 23,952
	SM	1231,815 $\pm$ 243,288 t (p=0.039)	,	1393,078 $\pm$ 270,079	p=0.002	348,178 $\pm$ 85,082	,	407,589 $\pm$ 54,169
HEMBRA	control	628,565 $\pm$ 86,221	,	1722,100 $\pm$ 528,820	p=0.006	317,504 $\pm$ 18,924	,	463,786 $\pm$ 76,655
	SM	1371,951 $\pm$ 164,093 tt (p=0.006)	,	1005,575 $\pm$ 95,109	p=0.005	454,168 $\pm$ 73,532	,	261,668 $\pm$ 54,342 t (p=0.036)

CONCENTRACIÓN DE TAURINA ( $\mu\text{g/g}$ tejido) ESTRIADO								
		15 días de edad	$\leftrightarrow$	34 días de edad	$\leftrightarrow$	58 días de edad	$\leftrightarrow$	178 días de edad
MACHO	control	458,085 $\pm$ 41,075	p=0.001	320,619 $\pm$ 34,809	,	379,490 $\pm$ 47,909	,	541,367 $\pm$ 50,046
	SM	546,274 $\pm$ 141,048	p=0.001	219,786 $\pm$ 25,758	p=0.002	607,641 $\pm$ 37,678 ss (p=0.005), tt (p=0.009)	,	525,820 $\pm$ 37,584
HEMBRA	control	395,718 $\pm$ 42,142	p=0.001	215,042 $\pm$ 35,123	p=0.008	445,723 $\pm$ 54,377	,	566,547 $\pm$ 41,581
	SM	549,353 $\pm$ 59,233	p=0.001	284,625 $\pm$ 37,641	,	384,585 $\pm$ 37,726	,	350,900 $\pm$ 43,818 s (p=0.015), t (p=0.012)

Tablas 26, 27, 28, 29. Concentración de taurina ( $\mu\text{g/g}$  tejido) en el hipocampo ventral, hipocampo dorsal, septum y estriado.

Los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $U < 0.05$ ) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas ( $p < 0.01$ ,  $U < 0.01$ ), “sss”, “ttt” altamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $U < 0.001$ ).

CONCENTRACIÓN DE DOPAMINA (ng/g tejido) HIPOCAMPO DORSAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	43,667 ± 2,435 s (p=0.021)	,	150,571 ± 70,695	,	63,798 ± 8,437	,	78,749 ± 11,067 s (p=0.046)
	SM	134,138 ± 31,422 ss (p=0.007)	p=0.007	13,133 ± 3,012	,	40,738 ± 9,876	p=0.032	288,100 ± 148,241 ss (p=0.006)
HEMBRA	control	16,169 ± 6,189	,	22,775 ± 9,930	p=0.023	261,000 ± 112,758 s (p=0.032), t (p=0.028)	p=0.015	41,401 ± 11,792
	SM	14,567 ± 3,149	,	15,724 ± 5,551	p=0.007	59,791 ± 12,403	,	34,575 ± 4,989

CONCENTRACIÓN DE DOPAMINA (ng/g tejido) HIPOCAMPO VENTRAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	19,380 ± 5,548	,	18,842 ± 5,004	,	35,864 ± 7,639	p=0.016	252,004 ± 98,019 ss (p=0.009), t (p=0.029)
	SM	128,370 ± 40,681 s (p=0.032), t (p=0.037)	,	15,916 ± 1,391	p=0.010	49,038 ± 7,839	,	38,069 ± 2,938
HEMBRA	control	75,446 ± 38,174	,	33,011 ± 13,531	,	64,027 ± 17,127	,	30,941 ± 6,477
	SM	16,934 ± 5,274	p=0.037	3,498 ± 0,958 ss (p=0.004)	p=0.001	41,852 ± 5,382	,	47,324 ± 8,040

CONCENTRACIÓN DE DOPAMINA (ng/g tejido) SEPTUM								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	543,926 ± 176,394	,	1533,544 ± 721,826	,	847,481 ± 245,021	,	1052,266 ± 221,752
	SM	1239,810 ± 643,719	,	416,015 ± 28,735	p=0.036	1176,061 ± 229,251	,	904,924 ± 115,010
HEMBRA	control	663,248 ± 310,517	,	1714,764 ± 803,434	,	1003,251 ± 260,020	,	1835,651 ± 436,808
	SM	2098,552 ± 855,182	,	470,787 ± 154,226	,	1334,585 ± 359,620	,	1225,571 ± 236,320

CONCENTRACIÓN DE DOPAMINA (ng/g tejido) ESTRIADO								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	2719,669 ± 469,590	,	5792,831 ± 1302,739	,	6321,155 ± 599,237	p=0.021	8573,456 ± 536,936
	SM	3114,938 ± 491,769	,	4881,579 ± 664,807	p=0.014	7218,485 ± 322,741	,	7973,287 ± 641,793
HEMBRA	control	3609,610 ± 499,616	,	6413,112 ± 1855,345	,	6933,784 ± 554,816	p=0.003	9373,525 ± 264,189
	SM	3564,940 ± 701,731	p=0.004	6270,797 ± 371,115	,	6905,516 ± 501,744	,	8063,405 ± 572,543

Tablas 30, 31, 32, 33. Concentración de dopamina (ng/g tejido) en el hipocampo ventral, hipocampo dorsal, septum y estriado.

Los datos están expresados como media ± error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas (p<0.05, U<0.05) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas (p<0.01, U<0.01), “sss”, “ttt” altamente significativas (p<0.001, U<0.001).

TURNOVER DE DOPAMINA HIPOCAMPO DORSAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	1,926 ± 0,571 t (p=0.019)	p=0.023	0,380 ± 0,217	.	0,623 ± 0,129	.	0,645 ± 0,164
	SM	0,285 ± 0,069	p=0.009	2,727 ± 0,211 t (p=0.014)	.	2,190 ± 0,441 ss (p=0.009), t (p=0.018)	p=0.030	0,625 ± 0,167
HEMBRA	control	0,490 ± 0,123	.	1,191 ± 0,375	p=0.046	0,393 ± 0,062	.	0,930 ± 0,312
	SM	0,871 ± 0,359	p=0.020	6,778 ± 2,190	p=0.002	0,614 ± 0,114	.	0,864 ± 0,198

TURNOVER DE DOPAMINA HIPOCAMPO VENTRAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	4,909 ± 1,308 ss (p=0.004), t (p=0.011)	p=0.028	1,495 ± 0,462	.	0,772 ± 0,166	p=0.013	0,303 ± 0,033
	SM	0,305 ± 0,059	p=0.021	1,439 ± 0,281	.	0,791 ± 0,253	.	0,696 ± 0,165
HEMBRA	control	1,034 ± 0,287	.	0,331 ± 0,094	.	0,462 ± 0,095	.	0,521 ± 0,089
	SM	0,986 ± 0,229	p=0.028	13,447 ± 4,636 s (p=0.042), t (p=0.027)	p=0.003	0,484 ± 0,082	.	0,423 ± 0,056

TURNOVER DE DOPAMINA SEPTUM								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	0,830 ± 0,304	.	0,401 ± 0,193	.	0,315 ± 0,024	p=0.042	0,240 ± 0,003
	SM	0,815 ± 0,275	.	0,234 ± 0,040	.	0,332 ± 0,023	.	0,327 ± 0,032 t (p=0.023)
HEMBRA	control	0,287 ± 0,066	.	0,186 ± 0,019	p=0.014	0,313 ± 0,025	p=0.023	0,205 ± 0,032
	SM	0,204 ± 0,047	p=0.022	0,748 ± 0,232 s (p=0.042), t (p=0.023)	.	0,375 ± 0,040	.	0,298 ± 0,032 t (p=0.023)

TURNOVER DE DOPAMINA ESTRIADO								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	0,487 ± 0,109	p=0.003	0,174 ± 0,006	p=0.009	0,229 ± 0,015	.	0,197 ± 0,012 ss (p=0.002)
	SM	0,302 ± 0,020	p=0.003	0,158 ± 0,009	p=0.005	0,231 ± 0,018	.	0,223 ± 0,017 ss (p=0.002)
HEMBRA	control	0,265 ± 0,001	p=0.021	0,139 ± 0,003 s (p=0.025), tt (p=0.008)	p=0.007	0,214 ± 0,012	p=0.002	0,159 ± 0,008
	SM	0,366 ± 0,024 t (p=0.011)	p=0.004	0,179 ± 0,006	.	0,213 ± 0,014	.	0,181 ± 0,010

Tablas 34, 35, 36, 37. Turnover de dopamina en el hipocampo ventral, hipocampo dorsal, septum y estriado.

Los datos están expresados como media ± error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas (p<0.05, U<0.05) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas (p<0.01, U<0.01), “sss”, “ttt” altamente significativas (p<0.001, U<0.001).

CONCENTRACIÓN DE SEROTONINA (ng/g tejido) HIPOCAMPO DORSAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	331,930 ± 62,114 s (p=0.024)	p=0.028	125,745 ± 20,758	p=0.003	237,610 ± 10,142 s (p=0.041)	,	225,754 ± 51,633
	SM	315,386 ± 20,348 s (p=0.024)	p=0.006	142,441 ± 38,827	,	210,275 ± 25,380 s (p=0.041)	,	220,745 ± 41,519
HEMBRA	control	269,652 ± 46,763	p=0.016	132,492 ± 23,378	p=0.004	279,651 ± 31,590	,	228,696 ± 17,038
	SM	151,943 ± 31,641	,	87,513 ± 19,009	p=0.000	267,933 ± 20,675	,	217,387 ± 15,492

CONCENTRACIÓN DE SEROTONINA (ng/g tejido) HIPOCAMPO VENTRAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	239,440 ± 33,356	,	265,455 ± 50,704	,	383,195 ± 23,906	,	431,446 ± 40,125
	SM	253,887 ± 28,975	,	169,361 ± 38,721 s (p=0.040), tt (p=0.004)	p=0.003	435,593 ± 44,162	,	382,665 ± 16,960
HEMBRA	control	314,848 ± 15,978	,	511,483 ± 91,818 s (p=0.040), tt (p=0.004)	,	416,404 ± 22,966	,	378,632 ± 47,688
	SM	237,584 ± 65,962	,	200,630 ± 59,158	p=0.020	350,891 ± 28,839	,	360,978 ± 41,965

CONCENTRACIÓN DE SEROTONINA (ng/g tejido) SEPTUM								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	358,663 ± 29,890	p=0.017	149,315 ± 18,314	p=0.013	534,865 ± 34,961	,	475,883 ± 65,096 sss (p=0.001)
	SM	290,532 ± 65,914	,	211,883 ± 32,137	p=0.002	422,086 ± 25,725	,	485,823 ± 55,846 sss (p=0.001)
HEMBRA	control	466,651 ± 97,902	,	405,736 ± 68,636 s (p=0.021), tt (p=0.003)	,	493,692 ± 67,867	,	636,722 ± 31,664
	SM	459,303 ± 81,894	p=0.015	146,923 ± 37,365	p=0.000	602,984 ± 63,172	,	656,541 ± 36,917

CONCENTRACIÓN DE SEROTONINA (ng/g tejido) ESTRIADO								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	427,777 ± 55,303	p=0.039	710,353 ± 90,213	,	526,953 ± 38,620 s (p=0.040)	,	587,270 ± 47,637
	SM	332,591 ± 76,744	p=0.003	700,172 ± 47,241	,	600,302 ± 19,139 s (p=0.040)	,	534,475 ± 41,646
HEMBRA	control	517,527 ± 6,665 t (p=0.034)	,	573,099 ± 190,452	,	618,780 ± 40,458	,	569,829 ± 46,184
	SM	309,437 ± 9,273	,	576,519 ± 110,745	,	639,733 ± 26,204	,	648,723 ± 23,035

Tablas 38, 39, 40, 41. Concentración de serotonina (ng/g tejido) en el hipocampo ventral, hipocampo dorsal, septum y estriado.

Los datos están expresados como media ± error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas (p<0.05, U<0.05) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas (p<0.01, U<0.01), “sss”, “ttt” altamente significativas (p<0.001, U<0.001).

TURNOVER DE SEROTONINA HIPOCAMPO DORSAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	2,003 ± 0,037	,	1,434 ± 0,317	,	1,162 ± 0,126	,	1,547 ± 0,139
	SM	0,862 ± 0,103 ss (p=0.004), t (p=0.014)	,	0,783 ± 0,070	p=0.027	1,384 ± 0,214	p=0.032	1,999 ± 0,095 tt (p=0.002)
HEMBRA	control	4,595 ± 0,643 s (p=0.011), t (p=0.022)	p=0.006	0,865 ± 0,177	,	1,167 ± 0,130	,	1,363 ± 0,074
	SM	2,318 ± 0,308	p=0.004	6,040 ± 1,232 ss (p=0.003), tt (p=0.003)	p=0.007	1,463 ± 0,127	,	1,707 ± 0,124 tt (p=0.002)

TURNOVER DE SEROTONINA HIPOCAMPO VENTRAL								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	1,695 ± 0,026	p=0.014	1,015 ± 0,223	p=0.003	0,072 ± 0,005	p=0.001	1,135 ± 0,073
	SM	1,014 ± 0,123 s (p=0.013), tt (p=0.008)	,	1,094 ± 0,077	p=0.001	0,092 ± 0,009	p=0.001	1,382 ± 0,067 t (p=0.028)
HEMBRA	control	3,046 ± 0,231 s (p=0.014), t (p=0.019)	p=0.006	0,573 ± 0,075	p=0.002	0,091 ± 0,008	p=0.001	1,124 ± 0,098
	SM	1,853 ± 0,259	,	1,437 ± 0,287	p=0.000	0,114 ± 0,008	p=0.000	1,277 ± 0,080 t (p=0.028)

TURNOVER DE SEROTONINA SEPTUM								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	2,884 ± 0,813	,	1,439 ± 0,479	,	0,979 ± 0,093	,	1,142 ± 0,037
	SM	1,988 ± 0,448	,	1,699 ± 0,386	,	0,932 ± 0,057	,	1,105 ± 0,057
HEMBRA	control	2,975 ± 0,337	p=0.009	0,812 ± 0,182 t (p=0.019)	,	1,063 ± 0,092	p=0.016	0,810 ± 0,036 sss (p=0.000)
	SM	1,090 ± 0,057 t (p=0.014)	,	1,805 ± 0,249	p=0.014	1,038 ± 0,061	,	0,955 ± 0,040

TURNOVER DE SEROTONINA ESTRIADO								
		15 días de edad	↔	34 días de edad	↔	58 días de edad	↔	178 días de edad
MACHO	control	1,844 ± 0,258	,	1,653 ± 0,266	p=0.002	0,753 ± 0,016 s (p=0.012), t (p=0.048)	p=0.001	1,113 ± 0,059 ss (p=0.006)
	SM	0,997 ± 0,060 tt (p=0.005)	,	0,843 ± 0,145 s (p=0.030), t (p=0.016)	,	0,905 ± 0,044	p=0.004	1,207 ± 0,065 ss (p=0.006)
HEMBRA	control	2,152 ± 0,065	p=0.021	1,296 ± 0,014	p=0.007	0,887 ± 0,035	p=0.028	1,022 ± 0,039
	SM	1,595 ± 0,372	,	2,025 ± 0,366	p=0.001	0,955 ± 0,039	,	1,016 ± 0,030

Tablas 42, 43, 44, 45. Turnover de serotonina en el hipocampo ventral, hipocampo dorsal, septum y estriado.

Los datos están expresados como media ± error estándar de la media.

“s”, “t” indica diferencias significativas (p<0.05, U<0.05) debidas al sexo y al tratamiento respectivamente, “ss”, “tt” muy significativas (p<0.01, U<0.01), “sss”, “ttt” altamente significativas (p<0.001, U<0.001).

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abe H., Ishida Y., Iwasaki T. (2004). Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. *Neuroscience letters*, 356(3), 191–4.
- Abrahám I., Juh G., Kkesi K. A., Kov K. J. (1996). Effect of intrahippocampal dexamethasone on the levels of amino acid transmitters and neuronal excitability, *Brain Research*, 733, 56–63.
- Aggleton J. P., Kyd R. J., Bilkey D. K. (2004). When is the perirhinal cortex necessary for the performance of spatial memory tasks? *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 28(6), 611–24.
- 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), 256–66.
- Albrecht J., Zielinska M., Allen J. W., Soldi O. P., Aschner M. (2005) Ethanol-Taurine Interactions in the Brain: Mechanisms and Pathophysiological Implications. *Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology Volume 2*. ISBN: 01256 43721.
- Alex K. D., Pehek E. (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacology & therapeutics*, 113(2), 296–320.
- Andersen S. L., Teicher M. H. (2004) Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29(11), 1988–93.
- Andersen S. L., Teicher M. H. (2008) Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends in neurosciences*, 31(4), 183–91.
- Antonio M. T., Corpas I., Leret M. L. (1999) Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicology Letters*, 104, 1–9.
- Antonio M. T., Leret M. L. (2000) Study of the neurochemical alterations produced in discrete brain areas by perinatal low-level lead exposure, 67, 635–642.
- Arborelius L., Eklund M. B. (2007) Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neuroscience*, 145(2), 738–50.
- Argüelles S., Herrera A. J., Carreño-Müller E., de Pablos R. M., Villarán R. F., Espinosa-Oliva A. M., Cano J. (2010) Degeneration of dopaminergic neurons induced by thrombin injection in the substantia nigra of the rat is enhanced by dexamethasone: role of monoamine oxidase enzyme. *Neurotoxicology*, 31(1), 55–66.
- Bagot R. C., van Hasselt F. N., Champagne D. L., Meaney M. J., Krugers H. J., Joëls M. (2009) Maternal care determines rapid effects of stress mediators on synaptic plasticity in adult rat hippocampal dentate gyrus. *Neurobiology of learning and memory*, 92(3), 292–300.

- Baimbridge K. G., Celio M. R., Rogers J. H. (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in Neuroscience*, 15, 303-8.
- Banihashemi L., O'Neill E. J., Rinaman L. (2011) Central neural responses to restraint stress are altered in rats with an early life history of repeated brief maternal separation. *Neuroscience*, 192, 413–28.
- Barbosa Neto J. B., Tiba P., Faturi C. B., de Castro-Neto E. F., da Graça Naffah-Mazacoratti M., de Jesus Mari J., Suchecki D. (2012) Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. *Neuropharmacology*, 62(1), 518–26.
- Barha C. K., Pawluski J. L., Galea L. a M. (2007) Maternal care affects male and female offspring working memory and stress reactivity. *Physiology & behavior*, 92(5), 939–50.
- Barili P., de Carolis G., Zaccheo, D., Amenta F. (1998) Sensitivity to ageing of the limbic dopaminergic system: a review, *Mechanisms of Ageing and Development* 106, 57–92.
- Baulieu E. E., Robel P., Schumacher M. (2001) Neurosteroids: beggining of th estory. *International Review of Neurobiology*; 46: 1-32.
- Baumann M. H., Williams Z., Zolkowska D., Rothman, R. B. (2011) Serotonin (5-HT) precursor loading with 5-hydroxy-l-tryptophan (5-HTP) reduces locomotor activation produced by (+)-amphetamine in the rat. *Drug and Alcohol Dependence*, 114, 147-52.
- Beck K. D., Luine V. N. (2002) Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: Role of housing conditions, *Physiology & Behaviour* 75, 661–673.
- Beck K. D., Luine V. N. (2010) Evidence for sex-specific shifting of neural processes underlying learning and memory following stress. *Physiology & behavior*, 99(2), 204–11.
- Bellinger F. P., Davidson M. S., Bedi K. S., Wilce P. (2006) Ethanol prevents NMDA receptor reduction by maternal separation in neonatal rat hippocampus. *Brain research*, 1067(1), 154–7.
- Ben-Ari Y., Khazipov R., Leinekugel X., Caillard O., Gaiarsa J. (1997) GABA<sub>A</sub>, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated “ménage à trois”. *Trends in Neuroscience*, 20, 523–529.
- Ben-Ari Y., Khalilov I., Represa A., Gozlan H. (2004) Interneurons set the tune of developing networks. *Trends in neurosciences*, 27(7), 422–7.
- Berninger B., Marty S., Zafra F., Berzaghi P., Thoenen H. (1995) GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation in vitro. *Development*, 121, 2327–2335.

- Besheer J., Jensen H. C., Bevins R. A. (1999) Dopamine antagonism in a novel-object recognition and a novel-object place conditioning preparation with rats. *Behavioral Brain Research*, *103*, 35–44.
- Biagini G., Merlo E., Carani C., Marrama P., Agnati L. F. (1998) Postnatal maternal separation during the stress hypo-responsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA hippocampal field. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *16*, 187–197.
- Bidzinski A., Siemia M., Płaznik A. (1998) The effect of serotonin depletion on motor activity habituation, and [<sup>3</sup>H] muscimol binding in the rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, *353*, 5–12.
- Bilbo S. D., Newsom N. J., Sprunger D. B., Watkins L. R., Rudy J. W., Maier, S. F. (2007) Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood. *Brain, behavior, and immunity*, *21*(3), 332–42.
- Bimonte H. A., Hyde L. A., Hoplight B. J., Denenberg V. H. (2000) In two species, females exhibit superior working memory and inferior reference memory on the water radial-arm maze. *Physiology and Behaviour*, *70*, 311–317.
- Bliss T., Jacques T. (1996) Synaptic plasticity and cellular mechanisms of memory: An overview. *Journal of Physiology*, *90*, 295–297.
- Boccia M. L., Razzoli M., Vadlamudi S. P., Trumbull W., Caleffie C., Pedersen C. (2007) Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. *Psychoneuroendocrinology*, *32*(1), 65–71.
- Bodnoff S. F. L., Meaney M. J., Lehman C., Diamond D. M., Rose M. (1995) Enduring Effects of Chronic Corticosterone Treatment on Spatial Learning, Synaptic Plasticity, and Hippocampal Neuropathology in Young and Mid-Aged Rats, *The Journal of Neuroscience*, *15*(1), 61–69.
- Bowman R. E. (2001) Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats, *Brain Research*, *904*, 279–289.
- Bowman R. E., Beck K. D., Luine V. N. (2003) Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Hormones and Behavior*, *43*(1), 48–59.
- Bowman R. E., MacLusky N. J., Sarmiento Y., Frankfurt M., Gordon M., Luine V. N. (2004) Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology*, *145*(8), 3778–87.
- Bowman R. E. (2005) Stress-induced changes in spatial memory are sexually differentiated and vary across the lifespan. *Journal of neuroendocrinology*, *17*(8), 526–35.

- Bradford H. F (1998) Dos aminoácidos excitadores: glutamato y aspartato, de: Bradford H.F.; Fundamentos de neuroquímica. Barcelona. Labor, pags 218-231.
- Brake W. G., Zhang T. Y., Diorio J., Meaney M. J., Gratton A. (2004) Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *The European journal of neuroscience*, 19(7), 1863–74.
- Bratt A. M. (2001) Long term modulation of the HPA axis by the hippocampus Behavioral, biochemical and immunological endpoints in rats exposed to chronic mild stress, *Psychoneuroendocrinology*, 26, 121–145.
- Braun K., Lange E., Metzger M., Poeggel G. (2000) Maternal separation followed by early social deprivation affects the development of monoaminergic fiber systems in the medial prefrontal cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience* 95(1), 309–318.
- Briones-Aranda A., Rocha L. Picazo O. (2005) Alterations in GABAergic function following forced swimming stress. *Pharmacology, Biochemistry & Behaviour*, 80, 463-70.
- Bronzino J. D., Kehoe P., Rushmore R. J., Kurdian J. (1996) Neonatal Isolation Alters LTP in Freely Moving Juvenile Rats: Sex Differences. *Brain Research Bulletin*, 41(3), 175–183.
- Buckert M., Kudielka B. M., Reuter M., Fiebach C. J. (2012) The COMT Val158Met polymorphism modulates working memory performance under acute stress. *Psychoneuroendocrinology*, 37(11), 1810–21.
- Cabib S., Puglisi-Allegra S. (1994) Opposite responses of mesolimbic dopamine system to controllable and uncontrollable aversive experiences. *Journal of Neuroscience*, 14(5): 3333-40.
- Calhoun J. B. (1963) *The ecology and sociobiology of the Norway rat*. HEW Public Health Service, Bethesda, MD.
- Cammarotta M., Bevilacqua L. R., Rossato J. I., Lima H., Medina, J. H., Izquierdo I. (2008) Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 105(30), 10279–10284.
- Cannizzaro C., Plescia F., Martire M., Gagliano M., Cannizzaro G., Mantia G., Cannizzaro E. (2006) Single, intense prenatal stress decreases emotionality and enhances learning performance in the adolescent rat offspring: interaction with a brief, daily maternal separation. *Behavioural brain research*, 169(1), 128–36.
- Carrillo-Mora P., Giordano M., Santamaría A. (2009) Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research* 203: 151-164.

- Casolini P., Cigliana G., Alema G. S. (1997) Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning in offspring in the early stages of life, *Neuroscience*, 79(4), 1005–1012.
- Cassel J., Cassel S., Galani R., Kelche C., Will B., & Jarrard L. (1998) Fimbria – Fornix vs Selective Hippocampal Lesions in Rats: Effects on Locomotor Activity and Spatial Learning and Memory. *Neurology of Memory and Learning*, 69, 22–45.
- Catalani A., Casolini P., Scaccianoce S., Patacchioli F. R., Spinozzi P., Angelucci L. (2000) Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny. *Neuroscience*, 100(2), 319–325.
- Catalani A., Casolini P., Cigliana G., Scaccianoce S., Consoli C., Cinque C., Angelucci L. (2002) Maternal corticosterone influences behavior, stress response and corticosteroid receptors in the female rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*. 73, 105–114.
- Catalani A., Alemà G. S., Cinque C., Zuena A. R., Casolini P. (2011) Maternal corticosterone effects on hypothalamus-pituitary-adrenal axis regulation and behavior of the offspring in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 35, 1502–17.
- Celio M.R. (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375–475.
- Champagne F., Curley J. P. (2009) Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 33(4), 593–600.
- Chaouloff F. (1993) Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Research Reviews*, 18(1): 1-32.
- Chaouloff F., Hémar A., Manzoni O. (2008) Local facilitation of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression by corticosterone and dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology*. 33(5), 686–91.
- Charnay Y., Léger L. (2010) Brain serotonergic circuitries. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(4): 471-87.
- Cheluja M. G., Scolari M. J., Coelho T. M., Blake M. G., Boccia M. M., Baratti C. M., Acosta G. B. (2007) L-serine and GABA uptake by synaptosomes during postnatal development of rat. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 146(4), 499–505.
- Chen S. W., Kong W. X., Zhang Y. J., Li Y. L., Mi X. J., Mu X. S. (2004) Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. *Life sciences*, 75(12), 1503–11.
- Chepkova A. N., Sergeeva, O., Haas H. L. (2006) Taurine rescues hippocampal long-term potentiation from ammonia-induced impairment. *Neurobiology of disease*, 23(3), 512–21.

- Chesselet M. F., Robbins E. (1989) Characterization of striatal neurons expressing high levels of glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Brain Research*, 492, 237-44.
- Chocyk A., Przyborowska A., Dudys D., Majcher I., Mackowiak M., Wedzony K. (2011) The impact of maternal separation on the number of tyrosine hydroxylase-expressing midbrain neurons during different stages of ontogenesis. *Neuroscience*, 182, 43-61.
- Chocyk A., Bobula B., Dudys D., Przyborowska A., Majcher-Maslanka I., Hess, G., Wedzony, K. (2013) Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *European Journal of Neuroscience*, 38, 2089-107.
- Cirulli F., Berry A., Alleva E. (2003) Early disruption of the mother–infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 73–82.
- Cirulli F. (2001) Role of environmental factors on brain development and nerve growth factor expression, *Physiology and Behaviour*, 73, 321-330.
- Clinton S. M., Bedrosian T., Abraham A. D., Watson, S. J., Akil, H. (2010) Neural and environmental factors impacting maternal behavior differences in high- versus low-novelty-seeking rats. *Hormones and behavior*, 57(4-5), 463–73.
- Coburn-Litvak P., Pothakos K., Tata D., McCloskey D., Anderson, B. (2003) Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(1), 11–23.
- Colciago A., Celotti F., Pravettoni A., Mornati O., Martini L., Negri-Cesi P. (2005) Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic area of developing rats. *Developmental brain research*, 155(2), 107–16.
- Colorado R., Shumake J., Conejo N. M., Gonzalez-Pardo H., Gonzalez-Lima F. (2006) Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. *Behavioural processes*, 71(1), 51–8.
- Daniel J. M., Roberts S. L., Dohanich G. P. (1999) Effects of Ovarian Hormones and Environment on Radial Maze and Water Maze Performance of Female Rats. *Physiology and Behaviour*, 66(1), 11–20.
- Daniel J. M., Sulzer J. K., Hulst J. L. (2006) Estrogen increases the sensitivity of ovariectomized rats to the disruptive effects produced by antagonism of D2 but not D1 dopamine receptors during performance of a response learning task. *Hormones and behavior*, 49(1), 38–44.
- 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, *Metabolic Brain Disease*, 19, 3–14.

- Davis A. M., Grattan D. R., Selmanoff M., McCarthy M. M. (1996) Sex Differences in Glutamic Acid Decarboxylase mRNA in Neonatal Rat Brain: Implications for Sexual Differentiation. *Hormones and Behaviour*, 30, 538–552.
- Davis A. M., Selmanoff M. (1999) Developmental sex differences in amino acid neurotransmitter levels in hypothalamic and limbic areas of rat brain. *Neuroscience*, 90(4), 1471–1482.
- Davis, A. M., Penschuck S., Fritschy J. M., McCarthy M. M. (2000) Developmental switch in the expression of GABA A receptor subunits  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  in the hypothalamus and limbic system of the rat. *Developmental Brain Research*, 119, 127–138.
- DeFelipe J. (1993) Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cerebral Cortex*, 3, 273-89.
- De Kloet E. R., Vreugdenhil E., Oitzl M. S., Joels M. (1998) Brain Corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews* 19 (3): 269-301.
- De Kloet E. R. (2000) Stress in the brain. *European Journal of Pharmacology*, 405, 187-198.
- De la Mora M. P., Gallegos-Cari A., Arizmendi-García Y., Marcellino D., Fuxe K. (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in neurobiology*, 90(2), 198–216.
- Dedovic K., Duchesne A., Andrews J., Engert V., Pruessner J. C. (2009) The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *NeuroImage*, 47(3), 864–71.
- Del Arco A., Segovia G., Prieto L., Mora F. (2001) Endogenous glutamate – taurine interaction in striatum and nucleus accumbens of the freely moving rat: studies during the normal process of aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 122, 401–414.
- Del Olmo N., Galarreta M., Bustamante J., Martín del Río R., Solís J. M. (2000) Taurine-induced synaptic potentiation: role of calcium and interaction with LTP. *Neuropharmacology*, 39, 40-54.
- Del Olmo N., Handler A., Alvarez L., Bustamante J., Martín del Río R., Solís J. M. (2003) Taurine-induced synaptic potentiation and the late phase of long-term potentiation are related mechanistically. *Neuropharmacology*, 44(1), 26–39.
- Dent G. W., Okimoto K., Smith M. A. (2000) Stress-Induced Alterations in Corticotropin-Releasing Hormone and Vasopressin Gene Expression in the Paraventricular Nucleus during Ontogeny. *Neuroendocrinology*, 71, 333–342.
- Desbonnet L., Garrett L., Daly E., McDermott K. W., Dinan T. G. (2008) Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(3-4), 259–68.

- Di Matteo V., Cacchio M., Di Giulio C., Esposito E. (2002) Role of serotonin 2C receptors in the control of brain dopaminergic function. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71, 727–734.
- Díaz-Luján V. E., Castellanos M. M., Levin G., Suárez M. M. (2008) Amitriptyline: sex-dependent effect on sympathetic response and anxiety in rats submitted to early maternal separation and variable chronic stress in adulthood. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(5), 415–22.
- Dubrovsky B., Filipini D., Gijssbers K., Birmingham M. K. (1990) Early and late effects of steroids hormones on the central nervous system. *Ciba Foundation Symposium*, 153, 240-57.
- Duchesne A., Dufresne M. M., Sullivan R. M. (2009) Sex differences in corticolimbic dopamine and serotonin systems in the rat and the effect of postnatal handling. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 33(2), 251–61.
- Durand M., Sarrieau A., Aguerre S., Morme P., Chaouloff F. (1998) Differential effects of neonatal handling on anxiety, corticosterone response to stress, and hippocampal glucocorticoid and serotonin (5-HT) 2A receptors in Lewis rats. *Psychoneuroendocrinology*, 23(4), 323–335.
- Eklund M. B., Johansson L. M., Uvnäs-Moberg K., Arborelius L. (2009) Differential effects of repeated long and brief maternal separation on behaviour and neuroendocrine parameters in Wistar dams. *Behavioural brain research*, 203(1), 69–75.
- El Idrissi A. (2008). Taurine improves learning and retention in aged mice. *Neuroscience letters*, 436(1), 19–22.
- Ellenbroek B., Derks N., Park H. J. (2005) Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress*, 8(4), 247–57.
- Engelmann M. (2003) Taurine regulates corticotropin secretion at the level of the supraoptic nucleus during stress in rats. *Neuroscience Letters*, 348(2), 120–122.
- Ennaceur A., Aggleton J. P. (1997) The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behavioural Brain Research* 88, 181–193.
- Farkas J., Reglodi D., Gaszner B., Szogyi D., Horvath G., Lubics A., Kiss P. (2009) Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain research bulletin*, 79(3-4), 208–14.
- Faturi C. B., Tiba P., Kawakami S. E., Catallani B., Kerstens M., Suchecki D. (2010) Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 34(6), 821–34.

- Figueiredo H. F., Dolgas C. M., Herman J. P. (2002) Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. *Endocrinology*, 143(7): 2534-40.
- Fisher A. K., von Rosenstiel P., Fuschs E., Goula D., Almeida O. F., Czeh B. (2002) The prototypic mineralocorticoid receptor agonist aldosterone influences neurogenesis in the dentate gyrus of the adrenalectomized rat. *Brain Research* 30, 947(2): 290-3.
- Fone K. C. F., Porkess M. V. (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 32(6), 1087–102.
- Franconi F., Diana G., Fortuna A., Galiotta G., Trombetta G., Valentini G., Loizzo A. (2004) Taurine administration during lactation modifies hippocampal CA1 neurotransmission and behavioural programming in adult male mice. *Brain research bulletin*, 63(6), 491–7.
- Frey U., Morris R. G. M. (1998) Synaptic tagging : implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation, *TINS*, 21(5), 181–188.
- Fujita M., Shimada S., Nishimura T., Uhl G. R., Tohyama M. (1993) Ontogeny of dopamine transporter mRNA expression in the rat brain. *Brain Research and Molecular Brain Research*, 19(3): 222-6.
- Gabbott P. L., Bacon S. J. (1995) Co-localisation of NADPH diaphorase activity and GABA immunoreactivity in local circuit neurones in the medial prefrontal cortex (mPFC) of the rat. *Brain Research*, 699, 321-8.
- Galani R., Weiss I., Cassel J., Kelche C. (1998) Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum, . *Behavioural Brain Research*, 96, 1–12.
- Galea L. A. M., Wide J. K., Paine T. A., Holmes M. M., Ormerod B. K., Floresco, S. B. (2001) High levels of estradiol disrupt conditioned place preference learning , stimulus response learning and reference memory but have limited effects on working memory. *Behavioural Brain Research*, 126, 115–126.
- Gallo A., Gonzalez-Lima F., Sadile A. G. (2002) Impaired metabolic capacity in the perirhinal and posterior parietal cortex lead to dissociation between attentional, motivational and spatial components of exploration in the Naples High-Excitability rat. *Behavioural Brain Research*, 130, 133–140.
- Galvan A., Kuwajima M., Smith Y. (2006) Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? *Neuroscience*, 143, 351-75.

- Ganguly K., Schinder A. F., Wong S. T., Poo M. (2001) GABA Itself Promotes the Developmental Switch of Neuronal GABAergic Responses from Excitation to Inhibition, *Cell*, 105, 521–532.
- Gardner K. L., Thrivikraman K. V., Lightman S. L., Plotsky P. M., Lowry C. (2005) Early life experience alters behavior during social defeat: focus on serotonergic systems. *Neuroscience*, 136(1), 181–91.
- Gardner K. L., Hale M. W., Lightman S. L., Plotsky P. M., Lowry, C. (2009) Adverse early life experience and social stress during adulthood interact to increase serotonin transporter mRNA expression. *Brain research*, 1305, 47–63.
- Garner B., Wood S. J., Pantelis C., van den Buuse M. (2007) Early maternal deprivation reduces prepulse inhibition and impairs spatial learning ability in adulthood: no further effect of post-pubertal chronic corticosterone treatment. *Behavioural brain research*, 176(2), 323–32.
- Garthwaite J., Charles S. L. Chess-Williams R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336, 385-8.
- Giachino C., Canalia N., Capone F., Fasolo A., Alleva E., Riva M., Peretto P. (2007) Maternal deprivation and early handling affect density of calcium binding protein-containing neurons in selected brain regions and emotional behavior in periadolescent rats. *Neuroscience*, 145(2), 568–78.
- Gilbert P. E., Kesner R. P., Decoteau W. E. (1998) Memory for Spatial Location : Role of the Hippocampus in Mediating Spatial Pattern Separation. *The Journal of Neuroscience*, 18(2), 804–810.
- Gisquet-Verrier P., Delatour B. (2006) The role of the rat prelimbic/infralimbic cortex in working memory: not involved in the short-term maintenance but in monitoring and processing functions. *Neuroscience*, 141(2), 585–96.
- González J. C., Peinado V., Machín C., Rúa C., Leret, M. L. (2004) Effects of maternal adrenalectomy on the developing dopaminergic system. *Brain research. Developmental brain research*, 149(2), 153–6.
- Görisch J., Schwarting R. K. W. (2006) Wistar rats with high versus low rearing activity differ in radial maze performance. *Neurobiology of learning and memory*, 86(2), 175–87.
- Gould E., Tanapat P. (1999). Stress and Hippocampal Neurogenesis. *Biological Psychiatry*, 46, 1472-79.
- Gould, E., Tanapat, P., Rydel, T., & Hastings, N. (2000) Regulation of Hippocampal Neurogenesis in Adulthood. *Biological Psychiatry*, 48, 715–720.

- Griscavage J. M., Rogers N. E., Sherman M. P., Ignarro L. J. (1993) Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *Journal of Immunology*, 151, 6329-37.
- Grobin A. C., Gizerian S., Lieberman J.A., Morrow A. L. (2006). Perinatal allopregnanolone influences prefrontal cortex structure, connectivity and behavior in adult rats. *Neuroscience*, 138(3), 809–19.
- Gruss M., Braun K., Frey J. U., Korz V. (2008) Maternal separation during a specific postnatal time window prevents reinforcement of hippocampal long-term potentiation in adolescent rats. *Neuroscience*, 152(1), 1–7.
- Guijarro J. Z., Tiba P., Ferreira T. L., Kawakami S. E., Oliveira M. G. M., Suchecki D. (2007) Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. *Behavioural brain research*, 184(2), 101–8.
- Gurden H., Tassin J., Jay T. M. (1999) Integrity of the mesocortical dopaminergic system is necessary for complete expression of *in vivo* hippocampal – prefrontal cortex long-term potentiation. *Neuroscience*, 94(4), 1019–1027.
- Hannesson D. K., Vacca G., Howland J. G., Phillips G. (2004) Medial prefrontal cortex is involved in spatial temporal order memory but not spatial recognition memory in tests relying on spontaneous exploration in rats. *Behavioural brain research*, 153(1), 273–85.
- He J., Yamada K., Nakajima A., Kamei H., Nabeshima T. (2002) Learning and memory in two different reward tasks in a radial arm maze in rats. *Behavioural Brain Research*, 134, 139–148.
- Hada J., Kaku T., Morimoto K., Hayashi Y., Nagai K. (1996). Adenosine transport inhibitors enhance high K<sup>+</sup>-evoked taurine release from rat hippocampus, *European Journal of Pharmacology* 305: 101-107.
- Hassel B., Dingledine R. (2006) Glutamate. En: Siegel G. J., Albers R. W., Brady S. T., Price D. L. (Eds.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspect*. 7<sup>a</sup> Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Hedner T., Lundborg P. (1980) Serotonergic development in the postnatal rat brain. *Journal of Neural Transmission*, 49(4): 257-79.
- Heller-Stilb, B., van Roeyen C., Rascher K., Hartwig H. G., Huth A., Seeliger M. W., Warskulat U., Haussinger D. (2002) Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB Journal*, 16, 231-3.

- Helmeke C., Ovtsharoff W., Poeggel G., Braun, K. (2008) Imbalance of immunohistochemically characterized interneuron populations in the adolescent and adult rodent medial prefrontal cortex after repeated exposure to neonatal separation stress. *Neuroscience*, 152(1), 18–28.
- Hensler J. G. (2006) Serotonin. En: Siegel G. J., Albers R. W., Brady S. T., Price D. L. (Eds.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. 7ª Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Herlenius E., Lagercrantz H. (2004) Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental neurology*, 190 Suppl, S8–21.
- Hernández-Benítez R., Ramos-Mandujano G., Pasantes-Morales H. (2012) Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. *Stem Cell Research*, 9(1), 24–34.
- Hevers W., Luddens H. (2002) Pharmacological heterogeneity of gamma-aminobutyric acid receptors during development suggest distinct classes of rat cerebellar granule cells in situ. *Neuropharmacology*, 42(1), 34-47.
- Horsley R. R., Norman C. Cassaday H. J. (2007) Lesions of the nucleus accumbens shell can reduce activity in the elevated plus-maze. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31, 906-14.
- Horst N. K., Laubach M. (2009) The role of rat dorsomedial prefrontal cortex in spatial working memory. *Neuroscience*, 164(2), 444–56.
- Hotte M., Naudon L., Jay T. M. (2005) Modulation of recognition and temporal order memory retrieval by dopamine D1 receptor in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 84(2), 85–92.
- Hritcu L., Clicinschi M., Nabeshima T. (2007) Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not long-term memory in rats. *Physiology & behavior*, 91(5), 652–7.
- Hsu F.C., Zhang, G. J., Raol Y. S. H., Valentino R. J., Coulter D., Brooks-Kayal A. R. (2003) Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABAA receptors and behavioral stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 100(21), 12213–8.
- Hsu H. C. (2004) Antecedents and consequences of separation anxiety in first-time mothers: infant, mother, and social-contextual characteristics. *Infant Behavior and Development*, 27(2), 113–133.
- Hui J. J., Zhang Z. J., Liu S. S., Xi G. J., Zhang X. R., Teng G. J., Reynolds G. P. (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. *Behavioural brain research*, 217(1), 122–7.

- 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 Research*, 950, 52–63.
- Huot R. L. (2004) Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology*, 29(2), 279–289.
- Ignarro L. J., Jacobs A. (2000) Functional neuroanatomy of the nitric Oxide System. H. W. M. Steinbusch, J. De Vente and S. R. Vincent, editors. Handbook of chemical Neuroanatomy, vol 17. Elsevier Science B. V.
- Jacobson L., Sapolsky R. (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews*, 12, 118-34.
- Jahng J. W., Ryu V., Yoo S. B., Noh S. J., Kim J. Y., Lee J. H. (2010) Mesolimbic dopaminergic activity responding to acute stress is blunted in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience*, 171, 144-52.
- Jay T. M. (2003) Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 69(6), 375–390.
- Jonasson Z. (2005) Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 28(8), 811–25.
- Jung A. B., Bennet J. P. Jr. (1996) Development of striatal dopaminergic function. *Brain Research and Developmental Brain Research*, 94(2): 109-43.
- 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, *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 73, 131–140.
- Kalueff A. V. (2007) Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. *Neural plasticity*, Article ID 7817
- Karst H., Nair S., Velzing E., Rumpff-van Essen L., Slagter E., Shinnick-Gallagher P., Joels M. (2002) Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons. *European Journal of Neuroscience*, 16(6), 1083–1089.
- Kaufman J., Plotsky P. M., Nemeroff C. B., Charney D. S. (2000) Effects of Early Adverse Experiences on Brain Structure and Function: Clinical Implications. *Biological Psychiatry* 48, 778-90.
- Kelly S. J., Ostrowski N. L., Wilson M. A. (1999) Gender Differences in Brain and Behavior : Hormonal and Neural Bases. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 64(4), 655–664.

- Kessels R. P. C., de Haan E. H. F., Kapelle L. J., Postma A., (2001) Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews*; 35: 295-303.
- Kim J. J., Lee H. J., Han J., Packard M. G. (2001) Amygdala Is Critical for Stress-Induced Modulation of Hippocampal Long-Term Potentiation and Learning. *The Journal of Neuroscience*, 21(14), 5222–5228.
- Kong W. X., Chen S. W., Li Y. L., Zhang Y. J., Wang R., Min L., Mi X. (2006) Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 83(2), 271–6.
- Korol D. L. (2004) Role of estrogen in balancing contributions from multiple memory systems. *Neurobiology of learning and memory*, 82(3), 309–23.
- Korz V., Frey J. U. (2005) Bidirectional modulation of hippocampal long-term potentiation under stress and no-stress conditions in basolateral amygdala-lesioned and intact rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(32), 7393–400.
- Kosten T., Karanian D., Yeh J., Haile C. N., Kim J. J., Kehoe P., Bahr B. (2007a) Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Neurobiology of learning and memory*, 88(2), 167–76.
- Kosten T., Lee H. J., Kim J. J. (2007b) Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain research*, 1154, 144–53.
- Kudielka B. M., Kirschbaum C. (2005) Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biological psychology*, 69(1), 113–32.
- Kuhar M. J., Minneman K., Muly E. C. (2006) Catecholamines. En: Siegel G. J., Albers R. W., Brady S. T., Price D. L. (Eds.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspect*. 7<sup>a</sup> Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kuhn C. M., Schanberg S. M. (1998) Responses to maternal separation mechanisms and mediators. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16,261-270.
- Kuramochi M., Nakamura S. (2009) Effects of postnatal isolation rearing and antidepressant treatment on the density of serotonergic and noradrenergic axons and depressive behavior in rats. *Neuroscience*, 163(1), 448–55.
- Kwak H. R., Lee J. W., Kwon K., Kang C. D., Cheong I. Y., Kim S., Lee H. J. (2009) Maternal Social Separation of Adolescent Rats Induces Hyperactivity and Anxiolytic Behavior. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 13, 79–83.
- Ladd C. O., Huot R. L., Thirivikraman K. V., Nemeroff C. B., Plotsky P. M. (2004) Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative

- feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biological psychiatry*, 55(4), 367–75.
- Ladd C. O., Thirvikraman K. V, Huot R. L., Plotsky P. M. (2005) Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology*, 30(6), 520–33.
- Lambás-Señas L., Mnie-Filali O., Certin V., Faure C., Lemoine L., Zimmer L., Haddjeri N. (2009) Functional correlates for 5-HT(1A) receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 33(2), 262–8.
- Lanfumeey L., Mongeau R., Cohen-Salmon C., Hamon M. (2008) Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neuroscience Biobehavioural Reviews*, 32(6): 1174-84.
- Lee H., Takamiya K., Han J., Man H., Kim C., Rumbaugh G., Huganir R. L. (2003) Phosphorylation of the AMPA Receptor GluR1 Subunit Is Required for Synaptic Plasticity and Retention of Spatial Memory. *Cell*, 112, 631–643.
- Lee J. H., Kim H. J., Kim J. G., Ryu V., Kim B. T., Kang D. W., Jahng J. W. (2007) Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience research*, 58(1), 32–9.
- Lehmann J., Pryce C. R., Bettschen D., Feldon J. (1999) The Maternal Separation Paradigm and Adult Emotionality and Cognition in Male and Female Wistar Rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 64(4), 705–715.
- Lehmann, Julia, Pryce, C. R., Jongen-re, A. L., Sto, T., Pothuizen, H. H. J., & Feldon, J. (2002). Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 23, 457–466.
- Leinekugel X., Medina I., Khalilov I., Ben-Ari Y., Khazipov R. (1997) Ca<sup>2+</sup> Oscillations Mediated by the Synergistic Excitatory Actions of GABA A and NMDA Receptors in the Neonatal Hippocampus. *Journal of Physiology*, 18, 243–255.
- Lenz K. M., Nugent B. M., McCarthy M. M. (2012) Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. *Frontiers in Neuroscience*, 6: 26.
- Lephart, E. D., Taylor, H., Jacobson, N. A., & Watson, M. A. (1998). Calretinin and Calbindin-D 28K in Male Rats During Postnatal Development. *Neurobiology of Aging*, 19(3), 253–257.
- Lephart E. D., Watson M. A. (1999) Maternal separation: hypothalamic-preoptic area and hippocampal Calbindin-D 28K and calretinin in male and female infantile rats. *Neuroscience letters* 267, 41–44.

- Leret M. L., Antonio M. T. (2002) Effects of maternal lead administration on monoaminergic, GABAergic and glutamatergic systems. *Brain Research Bulletin*, 58(5), 469–473.
- Leret M. L., Peinado V., González J. C., Suárez L. M., Rúa C. (2004a) Maternal adrenalectomy affects development of adrenal medulla. *Life sciences*, 74(15), 1861–7.
- Leret M. L., Peinado V., Suárez L. M., Tecedor L., Gamillo A., González J. C. (2004b) Role of maternal adrenal glands on the developing serotonergic and aminoacidergic systems of the postnatal rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22(2), 87–93.
- Leret M. L., Lecumberri M., Garcia-Montojo M., González J. C. (2007) Role of maternal corticosterone in the development and maturation of the aminoacidergic systems of the rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 25(7), 465–71.
- Leret M. L., Sanz N., Pérez-Hernández M., Díaz, R. Hernández-Tristán S., Rúa C. (2010a) Early postnatal stress affects brain levels of taurine in adult rats. *Poster Abstracts / International Journal of Developmental Neuroscience* 28: 655–719
- Leret M. L., Pérez-Hernández M., Sanz N., Díaz R. Hernández-Tristán S., Rúa C. (2010b) Maternal separation effects in spatial and non-spatial memory in adolescent and adult rats. *Poster Abstracts / International Journal of Developmental Neuroscience* 28: 655–719
- Levine S. (2000) Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *European Journal of Pharmacology*; 405, 149–60
- Levine S. (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic ± pituitary ± adrenal axis in the rat. *Physiology and Behaviour*, 73, 255–260.
- Li M., Wang Y., Zhang Y., Zhou Z., Yu Z. (2008) Elevation of Plasma Corticosterone Levels and Hippocampal Glucocorticoid Receptor Translocation in Rats: a Potential Mechanism for Cognition Impairment Following Chronic Low-power-density Microwave Exposure. *Journal of Radiation Research*, 49(2), 163–170.
- Lidov H. G., Molliver M.E. (1982) An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Research Bulletin*, 8, 389-430.
- Liu R., Jolas T., Aghajanian G. (2000) Serotonin 5-HT(2) receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Research*, 873(1): 34-45.
- Liu D., Diorio J., Day J. C., Francis D. D., Meaney M. J. (2000) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Neuroscience*, 3(8), 799–807.
- Llorente R., Arranz L., Marco E. M., Moreno E., Puerto M., Guaza C., Viveros M.P. (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(6), 636–50.

- Llorente R., Llorente-Berzal A., Petrosino S., Marco E. M., Guaza C., Prada C., Viveros M. P. (2008) Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. *Developmental Neurobiology*, 68(11), 1334–47.
- Llorente R., Gallardo M. L., Berzal A. L., Prada C., García-Segura L. M., Viveros M. P. (2009) Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 27(3), 233–41.
- Llorente R., Villa P., Marco E. M., Viveros M. P. (2012) Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain: a proton nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroscience 201*: 12–19
- López-Bendito G, Shigemoto R., Kulik A, Paulsen O, Fairen A, Luján R. (2002) Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development. *European Journal of Neuroscience*; 15 (11): 1766-78.
- López-Calderón A., Durán F. (2008) Farmacología de la corteza suprarrenal. En: Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza J. C., Moro M. A., Portolés A. (Eds.) *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª Ed. Panamericana, Madrid.
- López-Figueroa M. O., Caamano C. A., Morano M. I., Akil H., Watson S. J. (2002) Fluorescent imaging of mitochondrial nitric oxide in living cells. *Methods in Enzymology*. 352, 296-303.
- López M. G., Villarroya M., García A. G. (2008) Neurotransmisión adrenérgica. Sistema nervioso simpático: fármacos simpaticomiméticos. En: Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza J. C., Moro M. A., Portolés A. (Eds.) *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª Ed. Panamericana, Madrid.
- Lowy M. T., Gault L., Yamamoto B. K. (1993) Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 61, 1957-60.
- Macrì S., Wurbel H. (2006) Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behaviour*, 50, 667-80.
- Macrì S., Chiarotti F., Würbel H. (2008) Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behavioural brain research*, 191(2), 227–34.
- Madrugá C., Xavier L. L., Achaval M., Sanvitto G. L., Lucion A. B. (2006) Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behavioural brain research*, 166(2), 241–6.

- Marcos B., Aisa B., Ramírez M. J. (2008) Functional interaction between 5-HT(6) receptors and hypothalamic-pituitary-adrenal axis: cognitive implications. *Neuropharmacology*, 54(4), 708–14.
- Margineanu D. G., Gower A. J., Gobert J., Wulfert E. (1994) Long-term adrenalectomy reduces hippocampal granule cell excitability in vivo. *Brain Research Bulletin*; 33: (1): 93-8.
- Marmendal M., Eriksson C. J. P., Fahlke, C. (2006) Early deprivation increases exploration and locomotion in adult male Wistar offspring. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 85(3), 535–44.
- Martín M. I., Abalo R., García de Yébenes J. A. (2008) Fármacos en la enfermedad de Parkinson y en otros trastornos del movimiento. En: Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza J. C., Moro M. A., Portolés A. (Eds.) *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª Ed. Panamericana, Madrid.
- Matthews K., Robbins T. W. (2003) Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 45–55.
- McCarthy M., Davis A., Mong J. (1997) Excitatory Neurotransmission and sexual differentiation of the brain. *Brain Research Bulletin*; 44: 487-495.
- McCarthy M. M., Auger A. P., Perrot-Sinal T. S. (2002) Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *Trends in Neuroscience*. 25(6): 307-12.
- McCormick C. M., Smythe J. W., Sharma S., Meaney M. J. (1995) Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats, *Developmental Brain Research* 84, 55–61.
- McCormick C. M., Kehoe P., Mallinson K., Cecchi L., Frye, C. A. (2002) Neonatal isolation alters stress hormone and mesolimbic dopamine release in juvenile rats, *Pharmacology and Biochemistry of Behaviour* 73, 77–85.
- McCormick C. M., Mathews I. Z. (2010a) Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 34(5), 756–65.
- McCormick C. M., Mathews I. Z., Thomas C., Waters P. (2010b) Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain and cognition*, 72(1), 73–85.
- McDonald A. J., Mascagni F. (2001) Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience*, 105(3), 681–693.
- McEwen B. S., de Kloet E. R., Rostene W. (1986) Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system (review). *Physiological Reviews*, 66: 1121-1188.

- McEwen B. S. (1991) Our changing ideas about steroid effects on an ever-changing brain. *Seminars in Neuroscience*, 4: 497-507.
- McEwen B.S. (2007) Stress, Definitions and Concepts of *Encyclopedia of Stress* (Second Edition); page 653.
- Meaney M. J., Diorio J., Francis D., Widdowson J., LaPlante P., Caldji C., Sharma S., Seckl J. R., Plotsky P. M. (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental Neuroscience*, 18, 49-72.
- Meaney M. J., Brake W., Gratton A. (2002) Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology*, 27, 127–138.
- Mellon S. H. (2007) Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacology & therapeutics*, 116(1), 107–24.
- Méndez-López M., Méndez M., López L., Arias J. L. (2009) Spatial working memory in Wistar rats: brain sex differences in metabolic activity. *Brain research bulletin*, 79(3-4), 187–92.
- Mizoguchi K., Shoji H., Ikeda R., Tanaka Y., Tabira T. (2008) Persistent depressive state after chronic stress in rats is accompanied by HPA axis dysregulation and reduced prefrontal dopaminergic neurotransmission. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 91(1), 170–5.
- Moghaddam B., Bolinao M. L., Stein-Behrens B., Sapolsky R. (1994) Glucocorticoids mediate the stress induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Research* 655: 251-254.
- Mogi K., Nagasawa M., Kikusui T. (2011) Developmental consequences and biological significance of mother-infant bonding. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35(5), 1232–41.
- Moscovitch M., Rosenbaum R. S., Gilboa A., Addis D. R., Westmacott R., Grady C. (2005) Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *Journal of Anatomy*; 207: 35-66.
- Neumann I. D., Wigger A., Krömer S., Frank E., Landgraf R., Bosch O. J. (2005) Differential effects of periodic maternal separation on adult stress coping in a rat model of extremes in trait anxiety. *Neuroscience*, 132(3), 867–77.
- Newberry R. C., Swanson J. C. (2008) Implications of breaking mother–young social bonds. *Applied Animal Behaviour Science*, 110(1-2), 3–23.
- Nishi M., Horii-Hayashi N., Sasagawa T., Matsunaga W. (2013) Effects of early life stress on brain activity: Implications from maternal separation model in rodents. *General and Comparative Endocrinology*. 181; 306–309

- Ochedalski T., Subburaju S., Wynn P. C., Aguilera G. (2007) Interaction between oestrogen and oxytocin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(3): 189-97.
- Oitzl M. S., Champagne D. L., van der Veen R., de Kloet E. R. (2010) Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 34(6), 853–66.
- Oja S. S., Saransaari P. (2000) Modulation of taurine release by glutamate receptors and nitric oxide, *Neurobiology* 62, 407-25.
- Okada K., Okaichi H. (2009) Functional differentiation and cooperation among the hippocampal subregions in rats to effect spatial memory processes. *Behavioural Brain Research*, 200(1), 181–191.
- Olsen R. W., Betz H. (2006) GABA and Glycine. En: Siegel G. J., Albers R. W., Brady S. T., Price D. L. (Eds.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspect*. 7ª Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Oreland S., Pickering C., Göktürk C., Oreland L., Arborelius L., Nylander I. (2009) Two repeated maternal separation procedures differentially affect brain 5-hydroxytryptamine transporter and receptors in young and adult male and female rats. *Brain research*, 1305 Suppl, S37–49.
- Oreland S., Nylander I., Pickering C. (2010) Prolonged maternal separation decreases granule cell number in the dentate gyrus of 3-week-old male rats. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 28(2), 139–44.
- Owens D. F., Kriegstein A. R., (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience*. 3(9): 715-27.
- Palanza P. (2001) Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(3): 219-33.
- Parés-Herbuté N., Tapia-Arancibia L., Astier H. (1989) Ontogeny of the metencephalic, mesencephalic and diencephalic content of catecholamines as measured by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 7(1): 73-9.
- Park M., Kitahama K., Geffard M., Maeda, T. (2000) Postnatal development of the dopaminergic neurons in the rat mesencephalon. *Brain Development*, 22 Suppl 1, S38-44.
- Pasantes-Morales H., Gamboa A. (1980) Effect of taurine on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  accumulation in rat brain synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, 34(1): 244-6.

- Paula-Lima A. C., De Felice F. G., Brito-Moreira J., Ferreira S. T. (2005) Activation of GABA(A) receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology*, 49(8), 1140–8.
- Paxinos G., Watson C. (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Fourth edition.
- Pickering C., Gustafsson L., Cebere A., Nylander I., Liljequist S. (2006) Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. *Brain research*, 1099(1), 101–8.
- 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 Research and Molecular Brain Research*, 18, 195-200.
- Pryce C. R., Feldon J. (2003) Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 57–71.
- Rees S. L., Steiner M., Fleming A. S. (2006) Early deprivation, but not maternal separation, attenuates rise in corticosterone levels after exposure to a novel environment in both juvenile and adult female rats. *Behavioural brain research*, 175(2), 383–91.
- Reiner A., Hart N. M., Lei W., Deng Y. (2010) Corticostriatal projection neurons – dichotomous types and dichotomous functions. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4: 142.
- Represa A., Ben-Ari Y. (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends in neurosciences*, 28(6), 278–83.
- Riaza Bermudo-Soriano C., Perez-Rodriguez M. M., Vaquero-Lorenzo C., Baca-Garcia E. (2012) New perspectives in glutamate and anxiety. *Pharmacology and Biochemistry of Behaviour*, 100, 752-74.
- Rogers N. E., Ignarro L. J. (1992) Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189, 242-9.
- Roman E., Gustafsson L., Berg M., Nylander I. (2006) Behavioral profiles and stress-induced corticosteroid secretion in male Wistar rats subjected to short and prolonged periods of maternal separation. *Hormones and behavior*, 50(5), 736–47.
- Rooszendaal B. (2000) Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation, 25, 213–238.
- Rooszendaal B. (2002) Stress and Memory: Opposing Effects of Glucocorticoids on Memory Consolidation and Memory Retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 578–595.

- Rossato J. I., Bevilaqua L. R. M., Myskiw J. C., Medina J. H., Izquierdo I., Cammarota M. (2007) On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning & memory*, 14(1), 36–46.
- Rüedi-Bettschen D., Pedersen E.M., Feldon J., Pryce C. R. (2005) Early deprivation under specific conditions leads to reduced interest in reward in adulthood in Wistar rats. *Behavioural brain research*, 156(2), 297–310.
- Ruiz-Gayo M., Fuentes Cubero J. A. (2008) Introducción a la Farmacología del sistema nervioso central. Neurotransmisores y receptores. En: Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza J. C., Moro M. A., Portolés A. (Eds.) *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª Ed. Panamericana, Madrid.
- Sapolsky R. (1992) *Stress, the aging brain and the mechanism of neuron death*. MIT Press, Cambridge.
- Sapolsky R. M. (2003) Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochemistry Research*, 28, 1735-42.
- Saransaari P., Oja S. S. (1997a). Taurine release from the developing and ageing hippocampus: Stimulation by agonists of ionotropic glutamate receptors. *Mechanisms of Ageing and Development*, 99, 219–232.
- Saransaari P., Oja S. S. (1997b) Enhanced taurine release in cell-damaging conditions in the developing and ageing mouse, *Neuroscience* 79(3), 847–854.
- Saransaari P., Oja S. S. (1999) Taurine release modified by nitric oxide-generating compounds in the developing and adult mouse hippocampus. *Neuroscience*, 89, 1103-11.
- Schäble S., Poeggel G., Braun K., Gruss M. (2007) Long-term consequences of early experience on adult avoidance learning in female rats: role of the dopaminergic system. *Neurobiology of learning and memory*, 87(1), 109–22.
- Schmidt M., Enthoven L., van der Mark M., Levine S., de Kloet E. R., Oitzl M. S. (2003) The postnatal development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 21(3), 125–132.
- Schwabe L., Joels M., Roozendaal B., Wolf O. T., Oitzl M. S. (2012) Stress effects on memory: an update and integration. *Neuroscience Biobehavioural Reviews*, 36, 1740-9.
- Schwaller B., Meyer M., Schiffmann S. (2002) “New” functions for “old” proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum* 1: 241–258.
- Schwarz J. M., McCarthy M. M. (2008) Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(3-5), 300–6.
- Seyle H. (1950) Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*; 1, 1383-92

- Siegel G. J., Albers R. W., Brady S. T., Price D. L. (2006) *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*, 7<sup>th</sup> Edition. Ed. Elsevier.
- Sloten H. a, Kalinichev M., Hagan J. J., Marsden C. A., Fone K. C. F. (2006) Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. *Brain research*, 1097 (1), 123–32.
- Steckler T., Drinkenburg W. H. I. M., Sahgal A., Aggleton J. P. (1998) Recognition memory in rats. *Neuroanatomical substrates*, 54 (97).
- Sturman J. A. (1993) Taurine in development. *Physiological Reviews*, 73 (1): 119-47.
- Suárez L. M. (2013) Neuropharmacology Cooperation of taurine uptake and dopamine D1 receptor activation facilitates the induction of protein synthesis-dependent late LTP. *Neuropharmacology*, (November), 1–11.
- Suchecki D., Palma B. D., Tufik S. (2000) Pituitary – adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. *Behavioural Brain Research*, 111, 99–106.
- Suchecki D., Tufik S. (2007) Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *The American Journal of Physiology*, 1332–1338.
- Sutcliffe J. S., Marshall K. M., Neill J. C. (2007) Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural brain research*, 177 (1), 117–25.
- Tadros M. G., Khalifa A. E., Abdel-Naim A. B., Arafa H. M. M. (2005) Neuroprotective effect of taurine in 3-nitropropionic acid-induced experimental animal model of Huntington’s disease phenotype. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 82 (3), 574–82.
- Torp R., Haug F. M., Tonder N., Zimmer J., Ottersen O. P. (1992) Neuroactive amino acids in organotypic slice cultures of the rat hippocampus: an immunocytochemical study of the distribution of GABA, glutamate, glutamine and taurine. *Neuroscience*, 46, 807-23.
- Tsigos C., Chrousos G. P. (2002) Hypothalamic – pituitary – adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53, 865–871.
- Turner B. B. (1992) Sex differences in the binding of type I and type II corticosteroid receptors in rat hippocampus. *Brain Research*, 581(2): 229-36.
- Valtschanoff J. G., Weinberg R. J., Kharazia V. N., Nakane M., Schmidt H. H. (1993) Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. *Journal of Comparative Neurology*, 331, 111-21.
- Van Hooft J. A., Yakel J. L. (2003) 5-HT<sub>3</sub> receptors in the CNS: 3B or not 3B? *Trends on Pharmacology Sciences*, 24(4): 157-60.
- Vázquez D. M., López J. F., Morano M. I., Kwak S. P., Watson S. J., Akil H. (1998) Alpha beta and gamma mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic acid splice variants: differential

- expression and rapid regulation in the developing hippocampus. *Endocrinology*, 139 (7): 3165-77.
- Vicentic A., Francis D., Moffett M., Lakatos A., Kuhar M. J., Yerkes T., Primate N. (2006) Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. *Neuroscience*, 140, 355–365.
- Vincent S. R., Woodside B. and Amir S. (2000) Functional neuroanatomy of the nitric Oxide System. H. W. M. Steinbusch, J. De Vente and S. R. Vincent, editors. Handbook of chemical Neuroanatomy, vol 17. Elsevier Science B. V.
- Viveros M. P., Llorente R., López-Gallardo M., Suarez J., Bermúdez-Silva F., De la Fuente M., García-Segura L. M. (2009) Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1, S217–26.
- Walker C. D., Welberg L. A. M., Plotsky P. M. (2002) Glucocorticoids, Stress, and Development. En: Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M, Farhbach, S. E., Rubin, R. T. (Eds.). *Hormones, brain and behavior*. Academic Press, New York.
- Wang G.-W., Cai J.X. (2006) Disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats. *Behavioural brain research*, 175(2), 329–36.
- Wang H., Hu Y., Tsien J. Z. (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in neurobiology*, 79(3), 123–35.
- Weiser M. J., Handa R. J. (2009) Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience*, 159(2), 883–95.
- Weiss I. C., Domeney A. M., Heidbreder C. A., Moreau J., Feldon J. (2001) Early social isolation, but not maternal separation, affects behavioral sensitization to amphetamine in male and female adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 70, 397–409.
- Whitaker-Azmitia P. M. (2001) Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin*, 56(5): 479-85.
- Wigger A., Neumann I. D. (1999) Periodic Maternal Deprivation Induces Gender-Dependent Alterations in Behavioral and Neuroendocrine Responses to Emotional Stress in Adult Rats, *Physiology and Behaviour*, 66(2), 293–302.
- Wilson M. A. (1996) GABA physiology: modulation by benzodiazepines and hormones. *Critical Reviews in Neurobiology*; 10 (1): 1-37.
- Wink D. A., Hanbauer I., Grisham M. B., Laval F., Nims R. W., Laval J., Cook J., Pacelli R., Liebmann J., Krishna M., Ford P. C., Mitchell J. B. (1996) Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Current Topics in Cellular Regulation*, 34, 159-87.

- Wink D. A., Osawa Y., Darbyshire J. F., Jones C. R., Eshenaur S. C., Nims R. W. (1993) Inhibition of Cytochromes P450 by Nitric Oxide and a Nitric Oxide-Releasing Agent. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 300, Issue 1, January 1993, Pages 115-123.
- Wu J. Y., Tang X. W., Schloss J. V., Faiman M. D. (1998) Regulation of taurine biosynthesis and its physiological significance in the brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 442, 339-45.
- Wu H., Jin Y., Wei J., Jin H., Sha D., Wu J.Y. (2005) Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain research*, 1038(2), 123–31.
- Zhang L., Levine S., Dent G., Zhan Y., Xing G., Okimoto D., Smith M. A. (2002) Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. *Developmental Brain Research*, 133, 1–11.
- Zhang M., Cai J. X. (2008) Neonatal tactile stimulation enhances spatial working memory, prefrontal long-term potentiation, and D1 receptor activation in adult rats. *Neurobiology of learning and memory*, 89(4), 397–406.
- Zoladz P. R., Warnecke A. J., Woelke S. A., Burke H. M., Frigo R. M., Pisansky J. M., Talbot J. N. (2013) Pre-learning stress that is temporally removed from acquisition exerts sex-specific effects on long-term memory. *Neurobiology of learning and memory*, 100, 77–87.