

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



**CARACTERIZACIÓN PSICONEUROENDOCRINA
DE UN MODELO ANIMAL DE ALTERACIONES
PSIQUIÁTRICA CON BASE EN EL
NEURODESARROLLO: IMPLICACIONES DEL
SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ricardo Llorente de Miguel

Bajo la dirección de las doctoras

M^a Paz Viveros Hernando
Meritxell López Gallardo

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-5897-6

© Ricardo Llorente de Miguel, 2011

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN PSICONEUROENDOCRINA
DE UN MODELO ANIMAL DE ALTERACIONES
PSIQUIÁTRICAS CON BASE EN EL
NEURODESARROLLO; IMPLICACIONES DEL
SISTEMA ENDOCANNABINOIDE**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

MADRID

RICARDO LLORENTE DE MIGUEL

Año 2011

M^a Paz Viveros Hernando, Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid, y Meritxell López Gallardo, contratada Doctor de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización psiconeuroendocrina de un modelo animal de alteraciones psiquiátricas con base en el neurodesarrollo; implicaciones del sistema endocannabinoide” presentada por Ricardo Llorente de Miguel, licenciado en Biología, para optar a grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado a 7 de Febrero del 2011.

Dra. M^a Paz Viveros

Dra. Meritxell López

La presente tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de CC. Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. M^a Paz Viveros Hernando y la codirección de la Dra. Meritxell López Gallardo.

Este trabajo se realizó con la ayuda económica del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-10109), Grupos UCM-BSCH: 951579, Red de trastornos adictivos (RD06/0001/1013) y el Plan Nacional sobre Drogas (Orden SAS/1250/2009). Ricardo Llorente también fue dotado con una Beca predoctoral para formación de investigadores UCM (convocatoria 2005/06).

“We have to do the best we can. This is our sacred human responsibility.”

Albert Einstein

“Confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades.”

“Don Quijote de la Mancha” – Miguel de Cervante Saavedra

AGRADECIMIENTOS

Realizar una tesis doctoral no es un trabajo fácil, en ocasiones tampoco resulta agradable, y muchas veces te planteas si realmente merece la pena, para acabar descubriendo, que sí, realmente merece la pena. Pero, a parte de esto, hay algo que salta a la vista cuando uno se plantea hacer una tesis doctoral, que es imposible hacerla **sólo**. Son muchas horas de dedicación, de manos que ayudan, que enseñan, que colaboran y avanzan a tu par. Pero, como ocurre con este trabajo, el nombre que aparece tras el título es el de una persona. Por todo ello hay que dar gracias, y espero que este pequeño texto sirva de homenaje a todos aquellos que han hecho este camino más sencillo y ameno, que como dice el refrán: “es de bien nacido ser agradecido”.

La primera persona a la que tengo que agradecer la elaboración de esta tesis es a mi directora, la Dra. **M^a Paz Viveros**. No sólo me dio la oportunidad y el lugar donde realizar este trabajo, también me cedió todos sus conocimientos y paciencia. La Dra. **Meritxell López Gallardo**, actual responsable de una gran codirección, buenos consejos, y de un gran entrenamiento en lo que a técnicas inmunohistoquímicas se refieren. Gracias también a la Dra. **Eva M^a Marco** que me ayudó con mis primeros pasos en esto de la ciencia, enseñándome lo que sabía y resolviéndome algunos problemas, especialmente con el inglés donde siempre he andado un poco torpe.

Después vendrían los compañeros. No puedo dejar de agradecer la gran pericia quirúrgica e inteligencia con la que **Quique** me ayudó en mi primera etapa, fue un gran compañero. Luego vendrían **Claustro** y **Laura Lamota**, que nos acompañaron durante un breve lapso de tiempo, pero también aportaron su granito de arena. **Álvaro** fue el siguiente, el que me ha “aguantado” hasta ahora, aunque ha sabido soportar bien la presión (especialmente a base de “huidas” al extranjero). También he de hacer mención de **Beatriz** y **Noé**, la primera ayudando en todo lo que podía, haciendo avanzar las tesis que le han tocado vivir, dando muestras de una gran capacidad de trabajo. Al segundo sólo le pudimos disfrutar un año, pero dejó una gran huella, y un trabajo de gran calidad. Mención especial he de hacer ahora a **Celia**, que no sólo me ha ayudado con la elaboración de la tesis y otros experimentos con gran profesionalidad, si no que ahora me soporta a mi más allá del laboratorio, animándome y haciéndome la vida más llevadera, quién me lo iba a decir. Gracias también a **Erika Borcel** que a parte de conocimientos y un gran trabajo en las pruebas de comportamiento animal siempre aporta un plus de alegría y nutritivo (es una gran cocinera) que viene muy bien. Y tenemos nuevos colaboradores, son jóvenes y con ganas, y para que se sientan bienvenidos, **Ana Belén**, **Virginia**, **Alex** y **Manu**, mucho ánimo y seguir hacia delante, que realmente merece la pena.

Más allá de nuestro grupo, muchas personas han colaborado, aportando sus laboratorios, su tiempo y sus conocimientos. La Doctora **Mónica de la Fuente**, con la que hemos establecido una gran colaboración, así como a la gente de su grupo, **Lorena Arranz**, que ha sido de gran

ayuda en este proyecto, **Isabel Baeza** y **Nuria**. La Dra. **Carmen Prada** nos ha cedido su laboratorio y su experiencia, así como el grupo de la Dra. **Maribel Colado** y la Dra. **Carmen Guaza**. También el Dr. **Luis Miguel García Segura** ha prestado su inestimable colaboración, y junto a la gente del pluridisciplinar, **Marien**, **Palmira** y **David**, han logrado que esta tesis adquiriera una mayor dimensión y una gran calidad en lo que a datos y técnicas aplicadas se refieren.

I am grateful to Proff. **Ceri Davies**, from St George's Hospital of London, who received me for first time abroad, and also to his collaborators **Uma Thaker** and **Casmeil**. They taught me how to work outside the Spanish frontiers, and I lived new experiences that helped me to mature as a scientific.

I also would like to thank Proff. **Ron De Kloet**, Dr. **Onno Meier**, **Servane Lachize**, and, of course, my labmate in Leiden University **Nikos Daskalakis** who helped me in the lab. Nikos, together with **Ana**, **Natacha**, **Cristophe**, **Jordi**, **Panos**, and others made easier my adaptation to the Dutch life.

Y bueno, no es todo trabajo, también ha habido mucha gente a mi alrededor que me ha ayudado a pasar las horas en las que la actividad es menos excitante y ayuda a dispersarse a la mente, sin contar con que tomar café sólo es muy aburrido. Por eso muchas gracias a los de la 18/20, **Elena**, que junto con **Marta** representamos un más que decente grupo del 81, **Clarita**, que me costó diferenciarte de **Laura Ortiz**, pero siempre estás alegrándonos con una sonrisa y alegría envidiable. **Jose** siempre con grandes consejos informáticos; **Alberto**, del que siempre guardaré un buen recuerdo, sobre todo de sus grandes teorías sexodimórficas; y **Pilar**, mi albaceteña favorita, gracias por tu apoyo. **Ana Guijarro** y **Miguel Biscaia**, que no sólo echabais una mano cuando se necesitaba, sino que aportabais vuestra visión de la vida siempre enriquecedora. **Yurena** siempre activa, y con palabras de ánimo, ahora me toca mi, tu vales, no dudes en demostrarlo a la mínima posibilidad. **Alexia** e **Inés**, qué gran paciencia habéis demostrado tener, seguir así, que alguien la necesitará. Sin olvidarme mencionar a **Aida**, **Laura** y **Ana** que cierran el grupo de los que puedo llamar compañeros del departamento.

Por último, pero no menos importante, también tengo que mostrarme agradecido a mi familia, de no ser por ellos no estaría escribiendo esto, mis padres **Antonio** y **Magdalena**, mi hermano **Felipe**, con mención especial a mi “madre madrileña” mi tía **Brigi**, y un hombre al que le hubiera encantado estar hoy aquí y siempre se esforzó porque yo llegara a donde estoy ahora, mi tío **Pablo Llorente**.

No estoy seguro de que no me haya dejado a alguien entre las teclas del ordenador, ha sido mucho tiempo y muchos compañeros los que han estado a mi lado, tanto españoles como extranjeros, sólo puedo concluir:

GRACIAS A TODOS - THANK YOU ALL

LISTA DE ABREVIATURAS

Por orden alfabético

2-AG, 2-Araquidonil glicerol

5-HIAA, Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT, Serotonina

ACTH, hormona adrenocorticotropa

AEA, Anandamida

BDNF, Factor neurotrófico derivado del cerebro

ConA, concavalina A

Cre, Creatina

CRF, factor liberador de corticotropina

DA, Dopamina

DOPAC, Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

Fj-C, Fluoro-jade C

GABA, Ácido gamma-aminobutírico

GFAP, Proteína glial fibrilar ácida

Gln, Glutamina

Glu, Glutamato

Glx, Glutamina y glutamato

GR, receptor de glucocorticoides

HHA, hipotálamo-hipófisis-adrenal

HVA, Ácido homovalínico

Lac, Lactato

LPS, lipopolisacaridasa

MR, receptor de mineralcorticoides

NAA, N-acetil aspartato

NCAM, Molécula de adhesión celular neural

NK, Natural killer

NOT, Test de reconocimiento de objetos

PEA, Fosforiletanolamina

PN, día postnatal

PPI, Inhibición prepulso

RMN, Espectroscopía por resonancia magnética nuclear

SAT, Prueba de alternancia espontánea

SHRP, Período de baja reactividad frente al estrés

Tau, Taurina

tCho, Colina total

ÍNDICE

RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	25
1. ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS. HIPÓTESIS DEL NEURODESARROLLO	27
1.1. EMPLEO DE MODELOS ANIMALES BASADOS EN LA HIPÓTESIS DEL NEURODESARROLLO	30
1.2. LA SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA COMO MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DE LA HIPÓTESIS DEL NEURODESARROLLO EN EL ÁMBITO DE LAS ENFERMEDADES NEUROPSIQUIÁTRICAS	34
2. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE ENDÓGENO	40
2.1. RECEPTORES Y LIGANDOS ENDÓGENOS	40
2.2. PRINCIPALES FUNCIONES DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO	44
2.2.1. PAPEL DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE DURANTE EL DESARROLLO NEURAL	45
2.2.2. FUNCIÓN NEUROPROTECTORA DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
BLOQUE I. ETAPA ADOLESCENTE	59
CAPÍTULO 1	61
CARACTERIZACIÓN PSICONEUROINMUNOENDOCRINA DEL MODELO ANIMAL DE SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA EN EDAD ADOLESCENTE. EFECTOS DEL AGONISTA CANNABINOIDE WIN55,212-2	
Llorente R , Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la FM, Viveros MP (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. Psychoneuroendocrinology 32: 636-650.	65
<u>Principle short- and long-term effects of early maternal deprivation (24h, postnatal day 9) on immune function in Wistar male and female rats (Se incluyen los datos originales que aparecen en la revisión del Anexo I: De la Fuente <i>et al.</i>, 2009. Ann. N Y Acad. Sci. 1153: 176-83)</u>	81
CAPÍTULO 2	93
EFFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA SOBRE SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS CEREBRALES DURANTE EL DESARROLLO: EDAD ADOLESCENTE	
Llorente R , O'Shea E, Gutierrez-López MD, Llorente-Berzal A, Colado MI, Viveros MP (2010) Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. Neurosci Lett 479: 112-7	97

BLOQUE II. ETAPA NEONATAL	105
CAPÍTULO 3	107
EFFECTOS CELULARES Y BIOQUÍMICOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA EN EL HIPOCAMPO DE ANIMALES NEONATALES. MODULACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA POR DOS INHIBIDORES DE LA INACTIVACIÓN DE ENDOCANNABINOIDES	
Llorente R , Llorente-Berzal A, Petrosino S, Marco EM, Guaza C, Prada C, López-Gallardo M, Di Marzo V, Viveros MP (2008) Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: A possible role for the endocannabinoid system. Dev Neurobiol 68: 1334-47	113
CAPÍTULO 4	129
EFFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA SOBRE NEURONAS Y CÉLULAS GLÍALES EN HIPOCAMPO Y CEREBELO, ASÍ COMO SOBRE LOS NIVELES CIRCULANTES DE LEPTINA Y ACTH DURANTE EL DESARROLLO	
Llorente R , Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Segura LM, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. Int J Dev Neurosci 27: 233-41 .	133
<u>Effects of maternal deprivation on leptin and ACTH levels (Se incluyen los datos originales que aparecen en la revisión del Anexo I: Viveros et al., 2009. Psychoneuroendocrinology 34 Suppl 1: S217-26)</u>	143
CAPÍTULO 5	149
EFFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA EN ANIMALES NEONATALES SOBRE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB₁ Y CB₂ Y SOBRE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE LOS ENDOCANNABINOIDES, EN EL HIPOCAMPO EN DESARROLLO	
Suárez J, Llorente R , Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermudez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. Hippocampus 19: 623-32	153
Suárez J, Rivera P, Llorente R , Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2010) Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. Brain Res 1349: 162-73	163
CAPÍTULO 6	177
CAMBIOS METABÓLICOS A CORTO PLAZO INDUCIDOS POR LA SEPARACIÓN MATERNA EN HIPOCAMPO Y CORTEZA PREFRONTAL. ESTUDIO DE ESPECTROSCOPIA POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	
Llorente R , Villa Valverde P, Marco, EM, Viveros, MP (2011) Analyzing the	179

effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain, a proton NMR spectroscopy study. Enviado a **NMR in Biomed. Enviado Enero 2011.**

BLOQUE III. HIPÓTESIS DEL "DOBLE IMPACTO"	211
CAPÍTULO 7	213
EFFECTOS PSICONEUROENDOCRINOS A LARGO PLAZO DE LA SEPARACIÓN MATERNA Y UN PROTOCOLO DE ESTRÉS CRÓNICO IMPREDECIBLE DURANTE LA EDAD JUVENIL. IMPLICACIONES DE LA HIPÓTESIS DEL "DOBLE IMPACTO"	
Llorente R , Miguel-Blanco C, Aisa B, Lachize S, Borcel E, Meijer OC, Maria-Javier Ramirez, De Kloet ER, Viveros MP (2011) Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. Enviado a J. Neuroendocrinology. In press.	217
DISCUSIÓN	241
1. RESPECTO AL MODELO DE SEPARACIÓN MATERNA NEONATAL	243
1.1. EFECTOS COMPORTAMENTALES Y METABÓLICOS	244
1.2. EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISIS ADRENAL Y SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS	248
1.3. EFECTOS A CORTO PLAZO SOBRE EL DESARROLLO DE ESTRUCTURAS CEREBRALES Y NIVELES DE HORMONAS	252
1.4. OTROS CAMBIOS ENDOCRINOS Y ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO	258
2. INTERACCIÓN CON EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	262
3. MODELO DEL "DOBLE IMPACTO"	272
4. DIFERENCIAS SEXUALES	279
CONCLUSIONES	287
ANEXOS	
I. FÁRMACOS EMPLEADOS	293
II. MODELOS COMPORTAMENTALES USADOS	299
III. REVISIONES	307
De la Fuente M, Llorente R , Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Cruces J, Viveros MP (2009). Early maternal deprivation in rats: a proposed animal model for the study of developmental neuroimmunoendocrine interactions. Ann N Y Acad Sci 1153: 176-83.	309
Viveros MP, Llorente R , Lopez-Gallardo M, Suarez J, Bermudez-Silva F, De la Fuente M, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Segura LM (2009). Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. Psychoneuroendocrinology 34 Suppl 1: S217-26.	317
Marco EM, Adriani W, Llorente R , Laviola G, Viveros MP (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. Neurosci.	327

Biobehav. Rev. 33: 498-507.

Viveros MP, **Llorente R**, Suarez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, Rodriguez de Fonseca F (2011) The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: Sex differences and neuropsychiatric implications. Sent to Journal of Psychopharmacology on January 2011. 337

IV. English version: SUMMARY AND CONCLUSIONS 381

BIBLIOGRAFIA 395

Título Tesis Doctoral: Caracterización psiconeuroendocrina de un modelo animal de alteraciones psiquiátricas con base en el neurodesarrollo; implicaciones del sistema endocannabinoide.

Una de las limitaciones más evidentes en la aplicación de modelos animales para el estudio de enfermedades psiquiátricas es que resulta imposible reproducir todos los aspectos de la enfermedad debido a la complejidad de su sintomatología en humanos. A pesar de ello, se han desarrollado una gran variedad de modelos animales con la intención de reproducir algunos de los signos específicos de diversos desórdenes psiquiátricos. Estos procedimientos permiten establecer controles experimentales que no son posibles en los estudios desarrollados en humanos, y proporcionan una valiosa estrategia para el estudio de los sustratos neurobiológicos de estas enfermedades. Existen numerosas evidencias que apuntan al hecho de que experiencias traumáticas en la edad precoz podrían estar asociadas con el desarrollo de algunas psicopatologías (tales como la esquizofrenia o la depresión), así como alteraciones neuroendocrinas que aparecerían en edad más avanzada. A este respecto, se han desarrollado diversos protocolos experimentales que pueden modelizar diferentes condiciones de estrés en edades tempranas del desarrollo. En el presente estudio hemos elegido como principal modelo animal la **separación materna temprana**. Estudios previos han mostrado que ratas expuestas a un episodio de 24 horas de separación de la madre el día 9 de vida postnatal presentaban en edad adulta alteraciones comportamentales similares a una sintomatología de tipo psicótico, incluidos problemas en la respuesta de inhibición prepulso, en la respuesta de inhibición latente, en la entrada de información sensorial auditiva y en relación a la habituación a la respuesta al sobresalto. Considerando posibles correlatos neuroquímicos, los animales adultos expuestos al protocolo de separación materna temprana mostraron, entre otros cambios, en el hipocampo una reducción significativa en los niveles de la molécula de adhesión celular neural polisializada (PSA-NCAM), en el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y en los niveles de expresión de ARNm para las subunidades del receptor N-metil-D aspartato (NMDA) de glutamato, NR-2A y NR-2B. Estos cambios sugieren una pérdida de la plasticidad sináptica, así como una hipofuncionalidad del sistema glutamatérgico,

RESUMEN

fenómenos que han sido recientemente propuestos como posible sustrato neurobiológico en la etiopatogénesis de la esquizofrenia.

Uno de nuestros objetivos era proporcionar nuevos datos para realizar una caracterización psiconeuroendocrina más completa de este modelo animal, desde una perspectiva multidisciplinar mediante la evaluación de los efectos de la separación materna temprana en ratas adolescentes de ambos sexos. En estudios previos encontraron que los compuestos cannabinoideos revertían el aumento en los niveles de impulsividad registrados en los animales adolescentes que habían sido sometidos al protocolo de separación materna temprana en edad neonatal y que el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 presentaba notables propiedades neuroprotectoras en ratas neonatas. Así pues, hipotetizamos que este compuesto podría contrarrestar, al menos, algunos de los efectos deletéreos que esperábamos encontrar en los animales expuestos al protocolo de separación materna neonatal. Por ello la droga fue administrada inmediatamente después del periodo de separación materna y los posibles efectos fueron evaluados durante la edad adolescente (desde el día 28 hasta el 43 de vida postnatal). Los machos separados neonatalmente de su madre mostraron una reducción significativa de la actividad locomotora en el tablero con agujeros y el laberinto en cruz elevado. El agonista cannabinoide indujo, exclusivamente entre los machos, un efecto de tipo ansiogénico que fue revertido por la separación materna. En la prueba de natación forzada, ambos tratamientos indujeron de forma independiente respuestas de tipo depresivo en animales de ambos sexos. La separación materna produjo un deterioro de la función inmune, mientras que los efectos de la droga sobre los diferentes parámetros inmunes estudiados dependieron del órgano analizado. Las hembras separadas neonatalmente de sus madres presentaron menores niveles plasmáticos de corticosterona, mientras que el agonista cannabinoide indujo un incremento de los niveles de esta hormona en todos los grupos estudiados. En general, los resultados aquí presentados muestran que tanto la separación materna temprana como el agonista cannabinoide provocaron notables efectos deletéreos además de interesantes interacciones, especialmente en relación al comportamiento emocional y a la función inmune. Con el fin de obtener un cuadro más completo de los cambios dinámicos provocados por la separación materna a nivel del sistema inmune analizamos los efectos de este protocolo a corto (día postnatal 13) y a largo plazo, en la edad adulta (día 75 postnatal). En edad neonatal, tanto en machos como en hembras la separación materna

provocó una importante reducción en la actividad de las células NK (*natural killers*) del timo, además de una disminución de la respuesta proliferativa frente a la activación por el antígeno lipopolisacárido (LPS) y de la quimiotaxis de linfocitos tanto del timo como del bazo. En la edad adulta, la separación materna indujo en ambos sexos marcadas reducciones de la actividad de las células NK y de las respuestas linfoproliferativas a LPS de células procedentes del timo y del bazo, así como una reducción en la respuesta linfoproliferativa frente a la activación por concavalina A (ConA), aunque esta última sólo fue significativa en las células del timo de los machos.

Los efectos de la separación materna sobre los niveles de serotonina (5-HT) y dopamina (DA) así como de sus metabolitos en la corteza prefrontal, el hipocampo, el estriado, el mesencéfalo y el cerebelo de animales periadolescentes (35 días de edad) también fueron investigados. Las áreas cerebrales y los sistemas neuroquímicos fueron elegidos por su relación funcional con el perfil de comportamiento emocional inducido por la separación materna. Las ratas que habían sido sometidas al protocolo de separación materna temprana mostraron un incremento significativo en los niveles de 5-HT en todas las áreas cerebrales estudiadas, excepto en el cerebelo. Además, en estos animales también se observó un aumento significativo en los niveles de DA en corteza prefrontal y en el estriado, donde también se apreció una reducción en los ratios DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético)/DA y HVA (ácido homovalínico)/DA. El efecto de la separación materna temprana sobre los sistemas monoaminérgicos fue en varios casos dependiente del sexo.

De acuerdo con la hipótesis del neurodesarrollo, consideramos que las alteraciones comportamentales observadas tanto en la adolescencia, como en la edad adulta podrían estar mediadas por un inadecuado neurodesarrollo, que podría estar relacionado, al menos en parte, con el incremento en los niveles de corticosterona inducido por el episodio de estrés. Con el fin de confirmar esta hipótesis, nos centramos en dos estructuras que muestran una gran densidad de receptores para glucocorticoides, el hipocampo y el cerebelo, y analizamos las posibles alteraciones neuronales y gliales presentes en dichas regiones en ratas neonatas (13 días de edad) por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Para evaluar la presencia de neuronas en degeneración empleamos la tinción por Fluoro-jade C (Fj-C) mientras que para el estudio de los astrocitos empleamos el anticuerpo anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP). En los

RESUMEN

animales del grupo control observamos que las hembras presentaban un número significativamente mayor de células GFAP positivas en comparación con los machos, así como una tendencia a mostrar mayores niveles de células Fj-C positivas. La separación materna provocó degeneración neuronal y cambios en el número de células astrogiales en el hipocampo y en la corteza cerebelosa en las ratas neonatas que, en líneas generales, fueron más marcadas entre los machos. A la misma edad neonatal (postnatal 13), encontramos una reducción significativa en los niveles plasmáticos de leptina como consecuencia de la separación materna temprana, así como un incremento en los niveles de corticosterona y hormona liberadora de corticotropina (ACTH). En nuestra opinión, estos cambios endocrinos podrían mediar los cambios celulares descritos en el hipocampo y en el cerebelo durante el desarrollo. Las alteraciones neurales aquí descritas como consecuencia de la separación materna temprana parecen apoyar la utilidad de este modelo animal en el estudio de los desórdenes neuropsiquiátricos con un origen en el neurodesarrollo.

Son numerosas las evidencias que relacionan una alteración del sistema endocannabinoide con la patogénesis de la esquizofrenia. Es más, el uso frecuente de cannabis incrementa significativamente el riesgo de padecer ataques psicóticos y esquizofrenia. Además, el sistema endocannabinoide desempeña un papel crucial en el desarrollo cerebral. Basándonos en los síntomas de tipo psicótico descritos en ratas adultas sometidas a un protocolo de separación materna temprana y en nuestros propios descubrimientos sobre los cambios celulares encontrados en áreas relevantes del cerebro, tales como el hipocampo, en nuestro estudio esperábamos que la separación materna neonatal fuera capaz de inducir alteraciones en el sistema cannabinoide endógeno. Nuestros resultados confirmaron la hipótesis establecida y los animales neonatos que habían sido sometidos al protocolo de separación materna mostraron unos niveles elevados del 2-araquidonil glicerol (2-AG) y un descenso de inmunorreactividad de los receptores CB1 en el hipocampo. Una vez más, estas alteraciones fueron más marcadas en los machos. En consonancia con el incremento de 2-AG, también encontramos una reducción significativa de la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL), enzima responsable de la degradación de este endocannabinoide, en el hipocampo de los animales expuestos a la separación materna, y este efecto fue de nuevo más marcado entre los machos. Este dimorfismo sexual se encuentra en línea con los resultados previos en los cuales los efectos neurales y gliales de la separación materna eran más

evidentes entre los animales macho. Es más, dos inhibidores de la degradación de los ligandos cannabinoides endógenos modularon los anteriormente citados efectos celulares de la separación materna en el hipocampo. En conjunto, estos resultados apuntan a una clara asociación entre la exposición a situaciones de estrés durante el desarrollo y una desregulación del sistema endocannabinoide. Esta asociación puede ser de relevancia para los casos de esquizofrenia y otros desórdenes neuropsiquiátricos. Además, nuestro protocolo de separación materna temprana parece ser un modelo animal de gran utilidad para el estudio del papel del sistema endocannabinoide en el desarrollo cerebral y en su posible implicación en las enfermedades mentales con un origen en el neurodesarrollo.

En los últimos años se han aplicado nuevas técnicas de resonancia magnética en el campo de la investigación biomédica. A este respecto, se han descrito cambios metabólicos en el hipocampo y en la corteza prefrontal de individuos esquizofrénicos mediante técnicas *ex vivo* de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (HR-MAS). Por ello, investigamos la posible existencia de cambios similares en el cerebro de los animales sometidos al protocolo de separación materna temprana. A corto plazo (postnatal 13), tanto en machos como en hembras, se observó un perfil metabólico significativamente diferente en el hipocampo y en la corteza prefrontal de los animales separados neonatalmente de sus madres en relación a los animales control no separados. En los animales separados se observaron unos niveles reducidos de glutamina y glutamato en las dos regiones cerebrales analizadas, mientras que la taurina parecía estar incrementada tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal de los animales separados. Como consecuencia del protocolo de separación materna también se encontraron diferencias en los niveles de N-acetil aspartato en la corteza prefrontal y en los niveles de fosforiletanolamina en hipocampo. Se encontraron además otros cambios dependientes del sexo y de la región cerebral analizada como consecuencia del protocolo de separación materna temprana. Estos resultados indican que los animales sometidos a un protocolo de separación materna neonatal presentan un perfil metabólico alterado, y, de este modo, se abren nuevos horizontes en la implementación de una investigación translacional en el área de la neuropsiquiatría.

Además del periodo perinatal, la adolescencia representa otro periodo crítico del desarrollo durante la cual el sistema nervioso muestra una plasticidad única. En este

RESUMEN

periodo de transición entre la infancia y la edad adulta continúa el desarrollo del sistema nervioso central, incluyendo la maduración y reorganización de las vías de los principales sistemas de neurotransmisión. En general, hay importantes cambios en diversas áreas cerebrales tales como la corteza prefrontal y estructuras cerebrales límbicas relevantes para la cognición, la emoción, la motivación y la reactividad frente al estrés. Es más, durante el periodo periadolescente parece existir una “ventana” de mayor vulnerabilidad en relación al comienzo de ciertas enfermedades neuropsiquiátricas. Por lo tanto, la adolescencia también podría ser un periodo de vulnerabilidad única para los efectos persistentes del estrés crónico. En relación a la etiopatogénesis de diversos desórdenes psiquiátricos, la hipótesis del “doble impacto” establece que diversos factores durante el desarrollo temprano podrían actuar como un “primer impacto” aumentando la vulnerabilidad relativa a desarrollar una enfermedad psiquiátrica en el momento en el cual un evento estresante adicional (“segundo impacto”) acontece en edades más avanzadas. En este modelo, el “primer impacto” comprende factores de predisposición genética y/o factores ambientales precoces y el “segundo impacto” comprendería uno o más factores ambientales, tales como la exposición a drogas de abuso o a situaciones de estrés social. En el contexto de esta hipótesis, en el último experimento de la presente Tesis Doctoral el protocolo de separación materna temprana fue empleado como “primer impacto” mientras que la exposición a un protocolo de estrés crónico impredecible durante la adolescencia (durante los días 28 hasta el 43 de vida postnatal) fue utilizado como “segundo impacto”. Por ello, nos propusimos analizar en profundidad los efectos psiconeuroendocrinos que podían observarse a largo plazo en este modelo animal de la hipótesis del “doble impacto”. Los animales fueron evaluados en el laberinto en cruz elevado (ansiedad) a día 44 de vida postnatal, y en dos pruebas de memoria: el test de alternancia espontánea (SAT) y la prueba de reconocimiento de objetos (NOT) en la vida adulta (a partir del día 70 de vida postnatal). Mediante técnicas de hibridación *in situ* se analizó la expresión en el hipocampo de los receptores de glucocorticoides (GR) y de los receptores de mineralocorticoides (MR), así como la expresión de sinaptofisina, de la molécula de adhesión neural (NCAM) y de BDNF. La determinación de los niveles plasmáticos de leptina, testosterona y estradiol se llevó a cabo por radioinmunoensayo. Los animales jóvenes sometidos al protocolo de estrés crónico impredecible mostraron un incremento en el porcentaje de tiempo y entradas en los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado independientemente de la condición

neonatal de los animales. Los dos protocolos de estrés provocaron un marcado deterioro cognitivo, que quedó reflejado en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos, encontrándose un deterioro aún mayor entre los machos. Cada protocolo de estrés, considerado independientemente provocó efectos diferentes en las tres moléculas sinápticas analizadas, que fueron diferentes en machos y hembras. La combinación de ambos protocolos, la separación materna y el protocolo de estrés crónico impredecible, indujo un efecto deletéreo único sobre estas tres moléculas. La separación materna indujo a largo plazo una significativa reducción en los niveles de GR hipocampal solo en los machos, mientras que el protocolo de estrés crónico impredecible presentó una tendencia a incrementar la expresión de receptores MR en machos y a reducirla en las hembras. Ambos protocolos de estrés provocaron una marcada reducción en los niveles de testosterona y estradiol en los machos, mientras que los machos separados también mostraron una significativa reducción de los niveles de leptina. En contraste, las hembras no mostraron alteraciones endocrinas con ninguno de los protocolos empleados. En su conjunto, nuestros datos apoyan la hipótesis del “doble impacto” e indican que la separación materna durante el periodo neonatal y/o la exposición a un protocolo de estrés crónico impredecible durante la edad adolescente inducen un déficit cognitivo permanente, acompañado por una reducción en algunos marcadores de plasticidad sináptica en el hipocampo. Los efectos a largo plazo observados en relación al crecimiento somático y a los niveles hormonales, particularmente entre los machos, podrían reflejar alteraciones metabólicas dependientes del sexo, así como un deterioro en la función reproductiva.

Los modelos animales para el estudio de los diferentes desórdenes psiquiátricos raramente contemplan la existencia de diferencias sexuales. Nuestros datos procedentes del modelo de separación materna han arrojado evidencias sobre las respuestas sexodimórficas del protocolo de estrés neonatal. Estas diferencias en los efectos de la separación materna podrían deberse a una mayor vulnerabilidad de los machos a este tipo de estrés neonatal y/o a diferencias sexodimórficas en el inicio y/o progresión de los efectos de la separación materna. Los mecanismos responsables de estas diferencias sexuales podrían estar relacionados con los efectos de los esteroides gonadales sobre la organización del cerebro. En cualquier caso, el presente protocolo experimental puede considerarse como una herramienta de gran utilidad para el estudio de los dimorfismos sexuales presentes en los diversos desórdenes psiquiátricos con un origen en el

neurodesarrollo, tras la exposición temprana a situaciones ambientales adversas. Nuestros datos resaltan la necesidad de considerar la influencia del sexo en los estudios clínicos y preclínicos relacionados con los desordenes psiquiátricos con una base en el neurodesarrollo.

Lista de artículos originales y publicaciones que contienen los resultados descritos en la presente Tesis Doctora:

Artículos originales:

Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la FM, Viveros MP (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. **Psychoneuroendocrinology** **32**: 636-650.

Llorente R, Llorente-Berzal A, Petrosino S, Marco EM, Guaza C, Prada C, López-Gallardo M, Di Marzo V, Viveros MP (2008) Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: A possible role for the endocannabinoid system. **Dev Neurobiol** **68**: 1334-47.

Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Segura LM, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. **Int J Dev Neurosci** **27**: 233-41.

Llorente R, O'Shea E, Gutierrez-López MD, Llorente-Berzal A, Colado MI, Viveros MP (2010) Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. **Neurosci Lett** **479**: 112-7

Suárez J, **Llorente R**, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermudez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. **Hippocampus** **19**: 623-32

Suárez J, Rivera P, **Llorente R**, Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2010) Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. **Brain Res** **1349**: 162-73

Llorente R, Miguel-Blanco C, Aisa B, Lachize S, Borcel E, Meijer OC, Ramirez MJ, De Kloet ER, Viveros MP (2011). Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. **J. Neuroendocrinology**. **In press**.

Llorente R, Villa Valverde P, Marco, EM, Viveros, MP (2011) Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain, a proton NMR spectroscopy study. Sent to **NMR in Biomed. January 2011.**

Revisiones:

De la Fuente M, **Llorente R**, Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Cruces J, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation in rats: a proposed animal model for the study of developmental neuroimmunoendocrine interactions. **Ann N Y Acad Sci 1153: 176-83.**

Marco EM, Adriani W, **Llorente R**, Laviola G, Viveros MP (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. **Neurosci. Biobehav. Rev. 33: 498-507.**

Viveros MP, **Llorente R**, Lopez-Gallardo M, Suarez J, Bermudez-Silva F, De la Fuente M, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Segura LM (2009) Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. **Psychoneuroendocrinology 34 Suppl 1: S217-26.**

Viveros MP, **Llorente R**, Suarez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, Rodriguez de Fonseca F (2011) The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: Sex differences and neuropsychiatric implications. Sent to **Journal of Psychopharmacology on January 2011.**

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS: HIPÓTESIS DEL NEURODESARROLLO

Las alteraciones psiquiátricas son un problema de salud pública de gran relevancia en la sociedad actual. La esquizofrenia afecta aproximadamente al 1% de la población mundial, el desorden bipolar al 1,6% y este porcentaje resulta variable en el caso de la depresión y los desórdenes de ansiedad [para revisión (Baldaçara *et al.*, 2008)]. Las alteraciones psiquiátricas son enfermedades complejas en las que intervienen factores genéticos y ambientales (Weiss y Feldon, 2001) y de las que aún se desconoce en detalle su origen y los mecanismos implicados en su desarrollo y evolución. En los últimos años, debido al empleo de nuevas técnicas, entre ellas técnicas de neuroimagen tales como la resonancia magnética, se han identificado áreas cerebrales concretas implicadas en la aparición y desarrollo de estas enfermedades. De esta forma, se han podido establecer conexiones entre estos trastornos neuropsiquiátricos y determinadas alteraciones bioquímicas, estructurales y/o funcionales del sistema nervioso central. En el momento actual, a pesar de la atención científica dedicada a estos trastornos neuropsiquiátricos y a la profusa investigación sobre este tipo de patologías, son muchos los aspectos que aún quedan por dilucidar.

A lo largo de los años se han desarrollado un gran número de hipótesis y consiguientes modelos experimentales pensados para estudiar causas, origen, evolución, signos y síntomas de una gran diversidad de enfermedades de carácter neurológico y neuropsiquiátrico. En relación al origen de estas últimas se baraja desde hace unos años la **hipótesis del neurodesarrollo**, que cada vez está siendo más aceptada gracias a los resultados que arrojan los estudios clínicos y modelos animales basados en ella. Esta hipótesis se utilizó en principio para explicar el origen y desarrollo de la esquizofrenia, y estipula que la etiología de esta enfermedad se debería a procesos patológicos causados por factores genéticos y ambientales, cuyas consecuencias se harían patentes únicamente al final de la adolescencia, comienzo de la vida adulta (Figura 1), (Lewis y Levitt, 2002; Marek y Merchant, 2005; Weinberger, 1987). El hecho de que los síntomas se revelen sólo en períodos de la vida más avanzados (en relación al daño neural) podría deberse a que es en esos períodos en los que se alcanza la madurez funcional de ciertas estructuras cerebrales cuyo funcionamiento se revelaría entonces defectuoso. Aunque el daño comience en períodos muy tempranos del desarrollo, no

INTRODUCCIÓN

quiere esto decir que nos encontremos ante un fenómeno “estático”. De hecho, es probable que se trate de un proceso dinámico en el que se vean progresivamente alteradas diversas fases del desarrollo del cerebro (neurogénesis, migración, sinaptogénesis, etc.) en un proceso de tipo “cascada” (McGrath *et al.*, 2003). Las alteraciones que se deriven de los procesos de neurodegeneración pueden incluir disfunción de vías nerviosas y sistemas neuroendocrinos estrechamente relacionados con la capacidad de afrontar situaciones estresantes, particularmente del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y su relación con el sistema límbico.

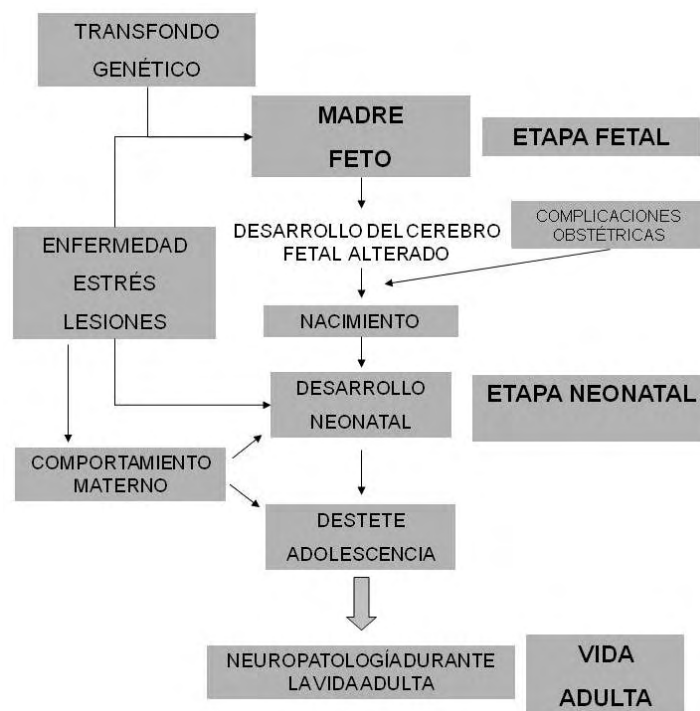


Fig. 1. Esquema que resume la hipótesis del neurodesarrollo en relación al posible origen de algunas patologías neuropsiquiátricas. Los factores adversos que interfieren en el neurodesarrollo ocurren principalmente durante etapas tempranas del desarrollo (periodos prenatal y/o neonatal), aunque no sólo los factores ambientales son importantes. Además, el genotipo de los individuos juega un papel crucial en la vulnerabilidad a padecer tales patologías.

Esta hipótesis ha sido también relacionada con otras patologías neuropsiquiátricas tales como el autismo (DiCicco-Bloom *et al.*, 2006; Pardo y Eberhart, 2007), la depresión o el síndrome bipolar (Furukawa *et al.*, 1999; Heim *et al.*, 2001), los trastornos de ansiedad (Kendler *et al.*, 1992) y el desorden de déficit de atención e hiperactividad (Anand y Scalzo, 2000). Las situaciones ambientales adversas

pueden ser de diversa índole (agentes infecciosos, agresiones físicas, factores psicológicos, etc.) y pueden tener lugar durante el periodo de gestación, y/o durante las primeras semanas del desarrollo postnatal (Brown, 2006; Brown y Derkits, 2010; Heim *et al.*, 2001; Marco *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2007; Schlotz y Phillips, 2009; Tyrka *et al.*, 2008).

Desde el periodo prenatal hasta la adolescencia el cerebro se encuentra en un proceso de intenso desarrollo (Giedd *et al.*, 2009) que incluye fenómenos de neurogénesis, maduración neural, formación de sinapsis, así como procesos de diferenciación y supervivencia neuronal (Acosta *et al.*, 2002; Andersen, 2003; Nowakowski y Hayes, 1999). Los anteriores procesos son muy complejos y están regulados de forma precisa por múltiples sistemas que interactúan tanto espacial como temporalmente, por lo que es fácil que se vean afectados por una gran variedad de factores como por ejemplo por factores genéticos y/o factores intra- y extra-uterinos durante la etapa fetal, (Connors *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009; Rees y Harding, 2004) o bien, dado que el desarrollo del sistema nervioso central continúa hasta la adolescencia, por otros factores como el nacimiento prematuro, el estrés, alteraciones endocrinas, exposición a tóxicos como pesticidas o drogas, etc. De hecho, se han descrito unos **periodos críticos**, o lo que es lo mismo, ventanas temporales en las que el organismo, y más particularmente el cerebro, está en pleno desarrollo y durante los cuales ciertas influencias ambientales o farmacológicas pueden, con una gran eficacia, provocar cambios neuroendocrinos y comportamentales a largo plazo.

1.1. EMPLEO DE MODELOS ANIMALES BASADOS EN LA HIPOTÉISIS DEL NEURODESARROLLO

Los datos epidemiológicos parecen avalar la hipótesis del neurodesarrollo como origen de diversas alteraciones y enfermedades neuropsiquiátricas. Los estudios en pacientes presentan una serie de limitaciones, y es en este punto donde resulta de gran importancia el empleo de modelos animales. En los últimos años se han desarrollado diversos modelos animales que han demostrado su validez y relevancia biológica para un análisis de la teoría del neurodesarrollo y que han permitido ampliar nuestros conocimientos acerca de los mecanismos neurobiológicos implicados en el origen y evolución de los principales trastornos neuropsiquiátricos.

Los datos epidemiológicos han mostrado una mayor incidencia de esquizofrenia y otros desórdenes psiquiátricos en individuos cuyas madres sufrieron infecciones víricas o bacterianas durante el embarazo [ver para revisión (Brown, 2006; Brown y Derkits, 2010; Meyer *et al.*, 2007; Schlotz y Phillips, 2009)]. Por este motivo se han desarrollado modelos experimentales basados en la estimulación del sistema inmune de la madre durante el periodo de gestación mediante la administración de endotoxina bacteriana lipopolosacaridasa (LPS), de virus humanos tales como el virus del SIDA, o incluso la administración de citoquinas proinflamatorias. En roedores, esta estimulación de la respuesta inflamatoria en la madre durante la gestación ha inducido la aparición en sus crías, en la edad adulta, de alteraciones neurocomportamentales, similares a las presentes en pacientes esquizofrénicos que eran, en ocasiones, sensibles al tratamiento con antipsicóticos (Borrell *et al.*, 2002; Fatemi *et al.*, 2002a; Fatemi *et al.*, 2002b; Samuelsson *et al.*, 2006).

Existen también evidencias en humanos que relacionan niveles elevados de estrés o ansiedad durante la gestación con el desarrollo de alteraciones psicológicas, tales como desequilibrio emocional, desórdenes de atención e hiperactividad, esquizofrenia, etc. [para revisión (Weinstock, 2005; Weinstock, 2008)]. A este respecto se han desarrollado diversos modelos animales mediante el empleo de diversos paradigmas experimentales en hembras gestantes que incluyen inyecciones de salino, administración de hormona adrenocorticotropa (ACTH, del inglés, *adrenocorticotropic hormone*), estrés por inmovilización, así como la exposición a otros tipos de estrés tanto de modo agudo como crónico [para más detalles (Chapillon *et al.*, 2002)]. En estos

modelos animales también se han observado importantes alteraciones neurocomportamentales en las crías tales como un aumento en los niveles de emotividad o ansiedad (Fride *et al.*, 1986; Fride y Weinstock, 1988; Vallee *et al.*, 1997), aparición de comportamientos de tipo depresivo (Morley-Fletcher *et al.*, 2003; Weinstock, 2002), alteraciones de tipo cognitivo (Chapillon *et al.*, 2002), o incluso alteraciones en el procesamiento de información sensorial acústica, que también se han observado en pacientes esquizofrénicos (Koenig *et al.*, 2005).

Hay estudios que indican una mayor tendencia a presentar déficits cognitivos y/o desórdenes psiquiátricos en individuos que han sufrido complicaciones obstétricas durante el nacimiento y la gestación, habiendo sido estudiadas mayoritariamente aquellas relacionadas con fenómenos de hipoxia [para más detalles ver (Buka *et al.*, 1993; Marco *et al.*, 2010)]. Con el fin de mimetizar las complicaciones obstetricias sufridas ocasionalmente en humanos durante los últimos tres meses de gestación, se han diseñado modelos animales de asfixia neonatal (Laviola *et al.*, 2004), éstos son protocolos de hipoxia a edad temprana (24 horas tras el parto o durante la primera semana de vida postnatal) y se ha observado que estos animales presentaban, tanto en edad adulta como durante el periodo adolescente, alteraciones a nivel emocional, un marcado déficit cognitivo y elevados niveles de impulsividad (Buwalda *et al.*, 1995; Casolini *et al.*, 2005; Grojean *et al.*, 2003; Iuvone *et al.*, 1996; Johansen *et al.*, 2002).

Otro importante grupo de modelos animales para el estudio de la hipótesis del neurodesarrollo en patologías neuropsiquiátricas se basa en la interrupción de la correcta maduración del sistema nervioso central durante estadios tempranos de vida postnatal. En este grupo nos encontramos con los modelos de lesión de determinadas regiones cerebrales en animales recién nacidos, principalmente hipocampo, amígdala (Daenen *et al.*, 2003) o corteza entorrinal (Uehara *et al.*, 2000). La lesión de estas regiones cerebrales provoca importantes alteraciones motoras y comportamentales, observables por ejemplo en la respuesta de sobresalto (*prepulse inhibition*, PPI), así como cambios en diversos sistemas de neurotransmisión (p. ej. dopaminérgico y cannabinoide) cuando los animales llegan a la edad adulta (Bouwmeester *et al.*, 2007; Daenen *et al.*, 2003; Uehara *et al.*, 2000). Aunque estos modelos sean de gran utilidad para el estudio de la hipótesis del neurodesarrollo, presentan ciertas desventajas tales como la falta de un control preciso en relación al alcance de la lesión y los riesgos asociados a la manipulación, tanto física como farmacológica (anestesia, cirugía, etc.), que sufre el animal empleado.

INTRODUCCIÓN

Por último, numerosos estudios indican que una experiencia traumática durante las primeras etapas del desarrollo neonatal puede estar asociada a la manifestación de psicopatologías durante el periodo de vida adulta (Nemeroff y Owens, 2009). Por ejemplo, el abandono paterno o el maltrato en edades infantiles están relacionados con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades mentales tales como depresión (Kendler *et al.*, 2002; Spatz Widom *et al.*, 2007), desórdenes de ansiedad o psicosis (Heim y Nemeroff, 2001; Teicher *et al.*, 2003; Teicher *et al.*, 2006). Estos datos ponen de manifiesto que la relación que se establece con los progenitores durante las primeras semanas del desarrollo postnatal resulta crítica (Champagne y Curley, 2005; Ladd *et al.*, 1999). En la mayoría de los mamíferos la madre es el principal cuidador en el seno de la pareja de progenitores, siendo la responsable tanto de la nutrición como de la limpieza de las crías y la encargada de proporcionar otros estímulos de carácter comportamental (Champagne y Curley, 2005). En base a estas evidencias se han desarrollado modelos animales en los cuales las crías de roedores o primates no humanos son privadas del cuidado y del contacto materno a lo largo de las primeras semanas de desarrollo postnatal. En la mayoría de estos modelos, la separación de la prole de su madre suele llevarse a cabo durante las dos primeras semanas del desarrollo postnatal (en el caso de los roedores durante el periodo de baja reactividad al estrés, en inglés *stress hyporesponsive period*, SHRP). Sin embargo, los diversos modelos animales de separación materna difieren fundamentalmente en la duración y frecuencia de los episodios de separación materna. En la mayor parte de estos modelos animales se han observado cambios neurobiológicos, fisiológicos y comportamentales en las crías, tanto a corto como a largo plazo (Gruss *et al.*, 2008; Marco *et al.*, 2009; Meaney, 2001; Pryce *et al.*, 2005; Rüedi-Bettschen *et al.*, 2005) que dependen de forma crítica de la duración y la edad a la que tiene lugar la separación, las condiciones ambientales de temperatura, la especie animal empleada, así como la edad a la cual se evalúan los posibles efectos de este protocolo de estrés neonatal (Ellenbroek y Riva, 2003; Marco *et al.*, 2009; Pryce *et al.*, 2005).

Los modelos de separación materna presentan, además, la ventaja de no requerir técnicas invasivas (lesiones) ni administración de sustancias patógenas. Además, contemplan un factor de riesgo importante, ya que ciertos eventos estresantes en edad infantil pueden aumentar la vulnerabilidad para el desarrollo de desórdenes neuropsiquiátricos. En la tabla 1 se resumen algunos de los tipos de los modelos de manipulación de la relación materno-filial más usados a lo largo de la literatura.

Tabla 1. Protocolos de separación materna más frecuentemente encontrados en la literatura.

Espece animal	Protocolo	Descripción
Rata	No manipulación	Reducción al máximo de la manipulación de las camadas. Se trata de un único experimentador con acceso a la habitación con el objeto de proporcionar comida y agua.
Rata, mono	Condiciones estándar de estabulación	Manipulación estándar de los animales por parte del personal del estabulario. Cambio y limpieza de jaula regular, sin manipulación adicional.
Rata	Manipulación temprana	Crías separadas de la madre durante 15 min. varios días seguidos. Las crías pueden permanecer juntas o aisladas durante este periodo. Generalmente se mantienen condiciones de temperatura controlada (incubadora o manta caliente a 30-32° C) en una jaula diferente a la que están habituados.
Rata, mono	Separación materna repetida	Crías alejadas de la madre durante un periodo de 3 a 6 horas a lo largo de varios días. Se pueden mantener condiciones de temperatura controlada (incubadora o manta caliente a 30-32° C) o temperatura ambiental (normalmente 20-22° C) en la jaula habitual o en una nueva. En este caso se puede proceder a la separación de la camada o al aislamiento individual de cada cría.
Rata	Separación materna simple	Separación de las crías de su madre durante un periodo prolongado de 24 horas (un día de las dos primeras semanas de vida). Normalmente se desplaza a la madre a una jaula nueva, dejando a la prole en la jaula habitual. Se pueden mantener condiciones de temperatura controlada (incubadora 30-32° C) o temperatura ambiental.
Rata, mono	Privación de la madre	Separación de las crías de su madre durante los primeros días de desarrollo neonatal. Las crías son mantenidas en un ambiente artificial donde se las cuida y alimenta sin que tengan contacto con sus auténticos progenitores.

Tabla modificada a partir de la presentada en Pryce *et al.*, 2005. Estos modelos y las siguientes descripciones pueden verse también en: Ellenbroek y Riva, 2003; Lehmann *et al.*, 2002; Levine, 1994; Marco *et al.*, 2009; Pryce *et al.*, 2002; Pryce y Feldon, 2003; Rüedi-Bettschen *et al.*, 2005; Viveros *et al.*, 2009.

1.2. LA SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA COMO MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DE LA HIPÓTESIS DEL NEURODESARROLLO EN EL ÁMBITO DE LAS ENFERMEDADES NEUROPSIQUIÁTRICAS

La Tabla 2 muestra un resumen de diversos modelos animales de separación materna temprana durante 24 horas, tanto en el día 9 postnatal como en otros días, anteriores y posteriores del desarrollo neonatal, así como de los efectos que se han encontrado tanto a corto como a largo plazo por diversos autores. Como se puede apreciar, algunos de los efectos más ampliamente analizados se refieren a cambios en la funcionalidad del eje HHA tanto a corto como a largo plazo. En la presente Tesis Doctoral elegimos el modelo de separación materna sobre el que habían trabajado ampliamente los grupos de De Kloet y Ellenbroek. La consulta bibliográfica y la comunicación directa con el profesor Ellenbroek al inicio de esta Tesis Doctoral nos permitieron determinar las condiciones óptimas para el desarrollo de este modelo animal en nuestro laboratorio. Así, en todos los experimentos se emplearon ratas de la estirpe *Wistar*, y el protocolo de separación materna empleado consistió en la separación de todas las crías de su madre durante un periodo de 24h desde el día 9 hasta el día 10 de vida postnatal. Ellenbroek y colaboradores informaron de que las ratas sometidas a este procedimiento de estrés neonatal muestran, en edad adulta, ciertas alteraciones que “recuerdan” o “son parecidos” a síntomas de esquizofrenia, entre otras, una reducción de la inhibición prepulso (PPI) en la respuesta de sobresalto (*startle response*) y sensibilidad aumentada a apomorfina (Ellenbroek y Cools, 1995, 2000, 2002; Ellenbroek *et al.*, 2004; Ellenbroek *et al.*, 2005; Ellenbroek y Riva, 2003; Ellenbroek *et al.*, 1998). En la presente Tesis Doctoral hemos llevado a cabo una amplia caracterización psiconeuroinmunoendocrina de este modelo animal concreto de **separación materna temprana**. En la literatura nos podremos encontrar con este modelo bajo la denominación *maternal separation* o, más frecuentemente *maternal deprivation* cuya traducción al español sería privación materna temprana. Preferimos no obstante referirnos en castellano al protocolo utilizado en esta Tesis como “separación materna” de aquí en adelante. Como hipótesis de trabajo, las alteraciones de tipo comportamentales y funcionales en general observadas en las ratas adultas separadas de

la madre podrían deberse a la acción perjudicial del **aumento de glucocorticoides (activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, HHA)** en respuesta al estrés (ver figura 2) de la privación materna sobre el cerebro en desarrollo, particularmente sobre zonas especialmente sensibles como por ejemplo el hipocampo, que tiene una alta densidad de receptores de glucocorticoides (Gould, 1994; Sapolsky *et al.*, 1988; Suchecki *et al.*, 1993).

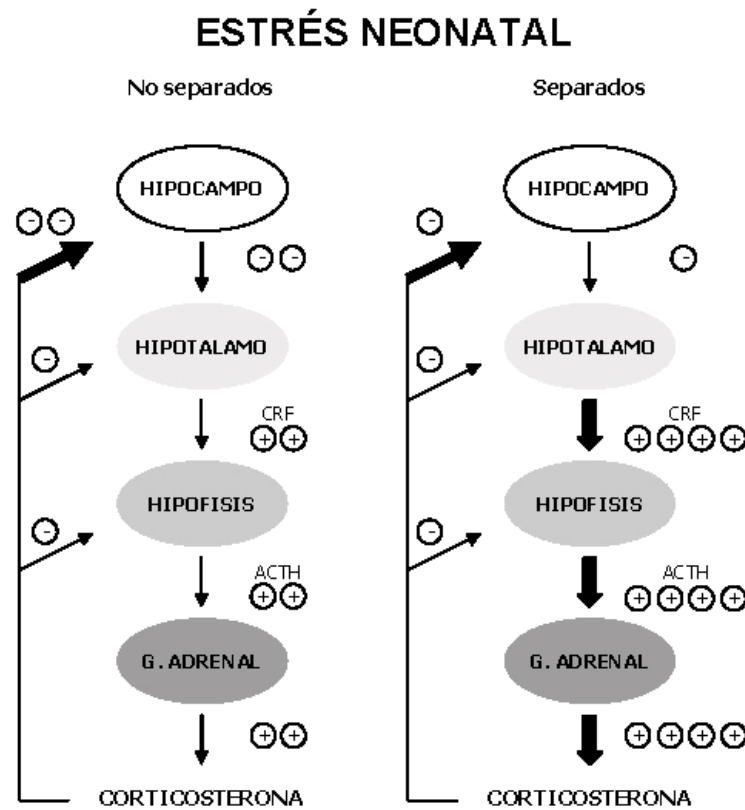


Fig. 2. Representación esquemática y simplificada de la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en individuos tras un protocolo de separación materna. ACTH, hormona adrenocorticotropa; CRF, factor de liberación de corticotropina.

Tabla 2. Principales efectos de un único episodio de 24 horas de separación materna neonatal.

	Edad de separación	Edad de evaluación de efectos	Principales alteraciones observadas
<i>A corto plazo</i>			
<i>Suchecki et al., 1993</i> Rata Wistar	6-7 PN	7 PN	Mayor aumento en los niveles de ACTH en respuesta a un estímulo estresante, respuesta que se veía incrementada con la edad de la separación.
	9-10 PN 12-13 PN	10 PN 13 PN	
<i>Van Oers et al., 1998</i> Rata híbrido de <i>Sprague-Dawley</i> y <i>Long-Evans</i>	3-4 PN	4 PN	No hay cambios tras la separación en los niveles de ACTH y corticosterona. Leve aumento de ACTH y corticosterona tras inyección de salino.
	11-12 PN	12 PN	Aumento en los niveles de corticosterona tras separación. Gran aumento de ACTH y corticosterona tras inyección de salino.
<i>Zhang et al., 2002a</i> Rata híbrido de <i>Sprague-Dawley</i> y <i>Long-Evans</i>	11-12 PN	12 PN	Incremento en el nivel de muerte celular en la corteza cerebral, Giro dentado, alveus y corteza cerebelar. Aumento de la expresión de Bax y Bcl-x en la corteza frontal. Reducción en los niveles de ARNm para BDNF e incremento del NGF en el hipocampo y zonas corticales. Aumento en los niveles de corticosterona.
	9-10 PN	12 a 24 PN	Retardo en la apertura de los ojos. Reducción en el peso corporal. Reducción de la actividad locomotora y la frecuencia de postura erguida. Menor respuesta al efecto en agudo de la administración de anfetamina.
<i>Schmidt et al., 2004</i> Ratón <i>CD1</i>	8-9 PN	9 PN	Aumento en los niveles de corticosterona y ACTH. Reducción de la expresión de ARNm para GR y MR hipocampales, y CRF en el PVN.

<i>Schmidt et al., 2006</i> Ratón <i>CD1</i>	8-9PN	4 a 8 horas tras separación	Aumento del NP-Y en el núcleo Arcuato. Disminución de la expresión de CRF en el PVN. Reducción de los niveles de leptina y glucosa en plasma. Aumento en los niveles de grelina en plasma.
Efectos a largo plazo			
<i>Ellenbroek and Cools., 1995</i> Rata <i>Wistar</i>	9-10 PN	> 90 PN	Alteración en la respuesta de inhibición latente.
<i>Rots et al., 1996</i> Rata <i>Wistar</i>	3-4 PN	60 PN	Aumento en los niveles basales de corticosterona y ACTH. Reducción del ARNm de CRF y GR en el PVN. Aumento de la expresión de ARNm para la tiroxina hidroxilasa (TH) en la <i>sustancia nigra</i> . Mayor susceptibilidad a los efectos de la apomorfina.
<i>Suchecki and Tufik, 1997</i> Rata <i>Wistar</i>	11-12 PN	16, 22 o 30 PN	Menor respuesta de corticosterona a un estímulo estresante leve respecto a los animales control.
<i>Van Oers et al., 1997</i> Rata híbrido de <i>Sprague-Dawley</i> y <i>Long-Evans</i>	3-4 PN	20 PN	Aumento en los niveles de ACTH en respuesta a un estímulo estresante.
	7-8 PN	20 PN	Reducción en los niveles de ACTH en respuesta a un estímulo estresante.
	11-12 PN	20 PN	Reducción en los niveles de ACTH en respuesta a un estímulo estresante. Reducción de los niveles de ARNm para GR en el PVN y el hipocampo.
<i>Lehmann et al., 1999</i> Rata <i>Wistar</i>	4-5 PN	> 90 PN	Reducción del peso corporal al día del destete (21 PN). Deterioro cognitivo (aprendizaje condicionado).
	9-10 PN	> 90 PN	Reducción del peso corporal al día del destete (21 PN). Mejora en el aprendizaje condicionado.

INTRODUCCIÓN

	18-19 PN Rata	> 90 PN	Reducción del peso corporal al día del destete (21 PN).
<i>Ellenbroek et al., 1998</i> Rata <i>Wistar</i>	3-4 PN	> 90 PN	Sin efectos en la respuesta de sobresalto a la inhibición prepulso (PPI).
	6-7 PN	> 90 PN	Déficit en la respuesta PPI.
	9-10 PN	> 90 PN	Déficit en la respuesta PPI.
<i>Van Oers et al., 1998</i> Rata híbrido de <i>Sprague-Dawley</i> y <i>Long-Evans</i>	3-4 PN	20 PN	Respuesta exagerada ante un estrés (ACTH) de tipo medio (inyección de salino). Significativo incremento de la expresión de CRF y c-fos después del estrés.
	11-12 PN	20 PN	Respuesta atenuada (ACTH) ante un estrés de tipo medio (inyección de salino). Significativo incremento de la expresión de CRF y c-fos después del estrés.
<i>Ellenbroek et al., 2000</i> Rata <i>Wistar</i>	9-10 PN	> 90 PN	Déficit en la respuesta PPI. Mayor susceptibilidad a los efectos de la apomorfina.
<i>Oitzl et al., 2000</i> Rata <i>Brown Norway</i>	3-4PN	3, 12, 24, y 30-32 meses de edad	Amplificación de las diferencias individuales en la capacidad de aprendizaje a medida que aumenta la edad.
<i>Workel et al., 2001</i> Rata <i>Brown Norway</i>	3-4 PN	3, meses de edad	Incremento en los niveles basales de corticosterona. Atenuación en la respuesta de corticosterona al estrés de novedad. Reducción de receptor GR (proteína) en hipocampo e hipotálamo.
		12 meses de edad	Incremento de los niveles de corticosterona ante el estrés de la novedad. Reducción de los niveles de CRF en el PVN.
		30-32 meses de edad	Atenuación en la respuesta de corticosterona a estrés severo por restricción. Reducción de la expresión de ARNm para GR en el hipocampo e hipotálamo.
<i>Husum et al., 2002</i> Rata <i>Wistar</i>	9-10 PN	> 60 PN	Reducción en la amplitud de la respuesta de sobresalto y déficit de la inhibición prepulso.

			Reducción de los niveles de NPY y CGRP en el hipocampo y la corteza occipital.
<i>Roceri et al., 2002</i> Rata Wistar	9-10 PN	> 60 PN	Reducción de la expresión hipocampal de BDNF, y las subunidades del receptor NMDA, NR-2A y 2B.
<i>Macri and Laviola, 2004</i> Ratón CD1	12-13 PN	37 PN 90 PN	Reducción de la interacción socio-sexual durante la adolescencia. Fenotipo depresivo en la prueba de natación forzada.
<i>Marco et al., 2007</i> Rata Wistar	9-10 PN Rata	40 PN	Aumento en los niveles de impulsividad.
<i>Enthoven et al., 2008</i> Ratón CD1	8-9 PN	6 meses de edad	Reducción del aprendizaje inverso.
<i>Gruss et al., 2008</i> Rata Wistar	4-5 PN	9 semanas de edad	Sin efectos sobre la LTP o la masa corporal a largo plazo.
	9-10 PN Rata	9 semanas de edad	Reducción de masa corporal a largo plazo (8 semanas de edad) Deterioro del refuerzo a largo plazo provocado por una situación estresante (natación forzada).
	18-19 PN Rata	9 semanas de edad	Sin efectos sobre la LTP o la masa corporal a largo plazo.

Abreviaturas empleadas: PN, postnatal; ACTH, hormona adrenocorticotropa; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; NGF, factor de crecimiento neural; GR, receptor glucocorticoide; CRF, factor liberador de corticotropina; MR, receptor mineralcorticoide; PVN, núcleo paraventricular hipotalámico; PPI, inhibición prepulso; NP-Y, neuropéptido Y; CGRP, péptido relacionado con el gen de la calcitonina; LTP, potenciación a largo plazo.

En la mayoría de las enfermedades neuropsiquiátricas relacionadas con el neurodesarrollo el sexo es un factor de gran relevancia en el grado de incidencia de la enfermedad, en el desarrollo de la misma, en la gravedad de los síntomas y en la eficacia del tratamiento [ver (de Kloet *et al.*, 1996; Gillies y McArthur, 2010a, b; Kumari *et al.*, 2004)]. Sin embargo, aún son escasos los estudios con modelos animales que contemplan el empleo de ambos sexos y la inmensa mayoría de los datos disponibles en la literatura acerca del modelo de separación materna antes de la publicación de los estudios de esta Tesis Doctoral se refería a animales macho.

2. EL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

El estudio del sistema cannabinoide endógeno comenzó tras la identificación y síntesis del principal compuesto psicoactivo de la planta de marihuana o cannabis, *Cannabis sativa*, en la década de los 60 (Gaoni y Mechoulam, 1964). A partir de ese momento la síntesis de otros compuestos similares permitió avanzar en el conocimiento de este sistema, y llevó a la identificación y clonaje de dos tipos de receptores cannabinoideos, tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2) (Matsuda *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 1993), en la década de los 90 y al descubrimiento del primer ligando cannabinoide endógeno, la anandamida (Devane *et al.*, 1992), en años posteriores.

2.1. RECEPTORES Y LIGANDOS ENDÓGENOS

Los receptores cannabinoideos, tanto el receptor CB1 (Rc. CB1) como el CB2 (Rc. CB2), son proteínas transmembrana acopladas a proteínas Gi/o. Estas proteínas regulan la actividad de diversas rutas de señalización intracelular, entre ellas, la regulación de enzimas encargadas de la producción de segundos mensajeros, como la adenilato ciclasa y diversas quinasas. El Rc. CB1 modula además canales iónicos, mediando el cierre de canales de calcio dependiente de voltaje, y/o la apertura de canales de potasio (Mackie, 2005; Onaivi y Hari Shanker, 2009; Pertwee, 2006).

Al descubrimiento de los receptores cannabinoideos hay que añadir el de sus ligandos endógenos. Hasta el momento se han identificado cinco (Fig. 3): araquidonil-etanolamina (Anandamida ó AEA), 2-araquidonil glicerol (2-AG), 2-araquidonil gliceril éter (noladin éter), N-araquidonildopamina (NADA) y Virodamina. Todos ellos son derivados del ácido araquidónico y actúan como agonistas de los receptores cannabinoideos, a excepción de la virodamina que parece ejercer una acción de antagonista/agonista parcial. De estos ligandos endógenos, también conocidos como endocannabinoideos, la AEA y el 2-AG han sido los más estudiados hasta el momento (Pertwee, 2008).

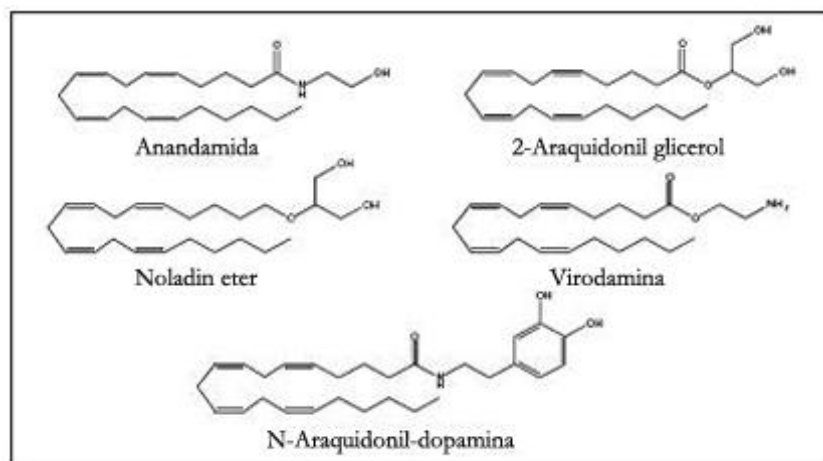


Fig. 3. Estructura química de los principales compuestos endocannabinoides descritos hasta el momento, siendo la anandamida (AEA) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG) los más ampliamente estudiados hasta el momento.

Los endocannabinoides son sintetizados “a demanda” a partir de los fosfolípidos de la membrana. La AEA es sintetizada por la acción de la enzima N-acetil transferasa (NAT) y de una fosfolipasa D específica (NAPE-PLD), a partir del precursor de membrana N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) (Okamoto *et al.*, 2004). Recientemente se ha descrito, tanto a nivel cerebral como en macrófagos, la síntesis de la AEA fosforilada que deberá ser luego desfosforilada a través de diversas fosfatasa (Liu *et al.*, 2006). La actividad de la NAT depende de la concentración de calcio intracelular y de su fosforilación mediante la proteína quinasa A. La AEA es producida y liberada en respuesta a la activación neuronal, más concretamente, tras la estimulación de receptores D₂ de dopamina, receptores muscarínicos de acetilcolina y/o receptores metabotrópicos de glutamato (Schmid *et al.*, 2002). Más recientemente se ha propuesto la existencia de una nueva ruta para la síntesis de AEA que contempla la formación de glicerofosfo-N-araquidonil-etanolamina (GP-NArE) a partir de NAPE mediante la actividad de una enzima hidrolasa y de la fosfodiesterasa 1 (GDE1) dependiente de magnesio (Simon y Cravatt, 2008). Por otro lado, la síntesis del 2-AG implica la actuación de una diacilglicerol lipasa (DAGL) que tiene como sustrato el diacilglicerol (DAG), o bien la acción combinada de una fosfolipasa A1 seguida de la acción de una fosfolipasa C (Bisogno *et al.*, 2003; Stella *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1995).

La degradación de estos compuestos es llevada a cabo tras su paso al interior celular a través de un transportador de membrana, denominado transportador de anandamida (AMT, del inglés *anandamide membrane transporter*), aún no identificado,

INTRODUCCIÓN

y capaz de transportar también otros endocannabinoides. La AEA es hidrolizada por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH, del inglés *fatty acid amidohydrolase*) (Giang y Cravatt, 1997) mientras que el 2-AG es hidrolizado en su mayor parte por la actividad monoacilglicerol lipasa (MGL) (Dinh *et al.*, 2002) y, en menor medida, por la actividad de las hidrolasas 6 y 12 (Fig. 4) (Blankman *et al.*, 2007) [para una revisión más detallada sobre los mecanismos de síntesis y degradación de los principales ligandos endocannabinoides consultar (Bisogno *et al.*, 2005; Muccioli, 2010)].

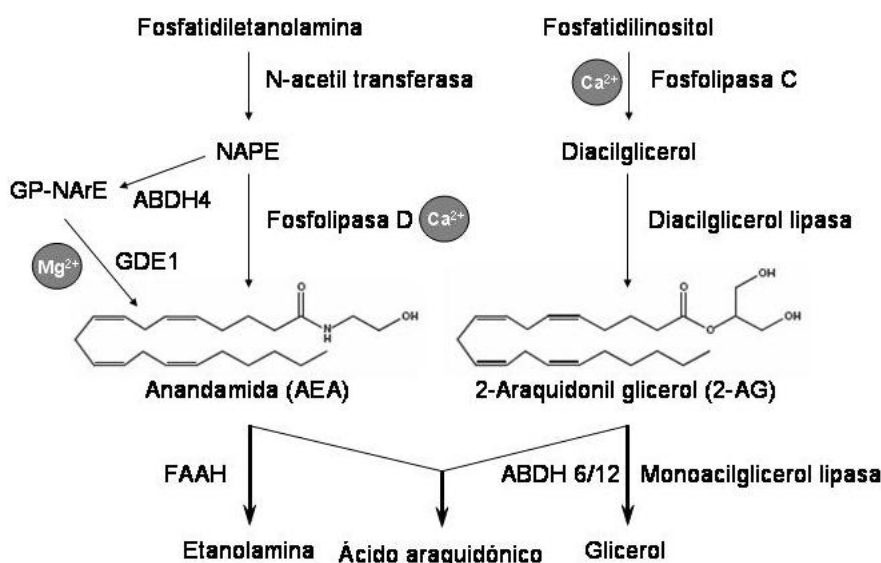


Fig. 4. Principales rutas de síntesis y degradación de dos de los endocannabinoides más conocidos, anandamida (AEA) y 2-araquidonil glicerol (2-AG). ABDH, Hidrolasas α/β ; GP-NArE, glicerofosfo-N-araquidonil-etanolamina; GDE1, glicerofosfodiesterasa 1. Modificado de Blankman *et al.*, 2007. Chem. Biol. Vol. 14 No 12 pág. 1347-56.

En los últimos años, se ha propuesto la existencia de nuevos receptores cannabinoides. La AEA y otros análogos sintéticos son capaces de activar a los receptores vanilloides TRPV₁, tradicionalmente conocidos por su implicación en la señalización del dolor. Diversos estudios muestran que algunas de las acciones de la AEA son consecuencia de la activación de estos receptores y, por lo tanto, la AEA ha sido propuesta como posible ligando endógeno de los receptores TRPV₁ (Starowicz *et al.*, 2007). Se ha descrito también una alta afinidad de la AEA por determinados receptores huérfanos acoplados a proteínas G (GPCR), destacando entre ellos el receptor GRP55 (Ross, 2009). Así, la acción de los ligandos cannabinoides endógenos no sólo se encontrará mediada por la activación de los receptores cannabinoides

tradicionalmente considerados, CB1 y CB2, sino también por la activación de otros receptores posteriormente descritos, entre ellos TRPV₁ y GRP55. Aunque todavía son necesarios estudios más detallados para poder definir la función de estos receptores y así ampliar los conocimientos acerca de la estructura y función del sistema cannabinoide endógeno.

Los Rc. CB1 se encuentran de forma abundante en el sistema nervioso central y se expresan preferentemente en zonas presinápticas (Freund *et al.*, 2003), donde participan en la inhibición de la liberación de otros neurotransmisores (Pertwee, 2006). En algunos casos también se han encontrado estos receptores en somas y dendritas neuronales (Marsicano *et al.*, 2003) así como en otros tipos celulares como oligodendrocitos, astrocitos y precursores neurales, aunque siempre expresados en menor proporción (Aguado *et al.*, 2005; Molina-Holgado *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2001). Los receptores CB1 en el cerebro de la rata presentan una elevada densidad en los ganglios basales, en la capa molecular del cerebelo y en el hipocampo, su densidad es menor en las capas I y IV de la corteza cerebral, y se encuentran presentes de forma más escasa en el hipotálamo, el tallo cerebral y la médula espinal. La distribución de este receptor en el sistema nervioso central se encuentra en estrecha relación con los efectos farmacológicos que producen los cannabinoides [ver revisión (Mackie, 2005)]. También se ha descrito la presencia de Rc. CB1 en algunos tejidos periféricos tales como las glándulas adrenales, el corazón, los pulmones, la próstata, el útero, los ovarios, los testículos, la médula ósea, el timo y las amígdalas (Galiegue *et al.*, 1995; Ishac *et al.*, 1996).

Por otro lado, los Rc. CB2 presentan una distribución mayoritariamente periférica, encontrándose principalmente en células del sistema inmune (Galiegue *et al.*, 1995; Schatz *et al.*, 1997). Los Rc. CB2 han sido relacionados con acciones moduladoras, y se ha descrito su implicación en la regulación de diversas funciones inmunes como la liberación de citoquinas y la migración de células inmunes (Klein *et al.*, 2003). A pesar de ser considerado tradicionalmente como un receptor periférico, recientemente se ha descrito la presencia de este Rc. CB2 en diferentes regiones del sistema nervioso central en condiciones fisiológicas y se ha postulado que, al menos en el cerebelo, los Rc. CB2 presentan una localización post-sináptica (Onaivi, 2006; Suárez *et al.*, 2008). Se ha identificado la presencia de receptores CB2 funcionales en el tallo cerebral, posiblemente implicados en el control de la emesis (Van Sickle *et al.*, 2005), y

INTRODUCCIÓN

también en procesos neuronales y gliales en diversas estructuras cerebrales entre las que destacan hipocampo y cerebelo (Gong *et al.*, 2006). Las implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas de la existencia de estos receptores CB2 en el sistema nervioso central no han sido aún exploradas suficientemente, aunque en los últimos años se está investigando sobre su posible participación en alteraciones neuropsiquiátricas y en relación a procesos de adicción y dependencia a drogas de abuso (García-Gutiérrez y Manzanares, 2010; García-Gutiérrez *et al.*, 2010; Roche y Finn, 2010).

Sin embargo, los Rc. CB1 siguen considerándose como los máximos responsables de las acciones psicoactivas de los cannabinoides tanto endógenos como exógenos. En los últimos años se ha demostrado también la relación de los Rc. CB2 con determinadas situaciones patológicas del sistema nervioso, por ejemplo, se ha visto un incremento en la expresión de Rc. CB2 en células de microglía activada presentes en diferentes modelos animales para el estudio de las enfermedades de Alzheimer y esclerosis múltiple (Benito *et al.*, 2003; Maresz *et al.*, 2005). De hecho, estos Rc. CB2 han sido propuestos como una posible diana terapéutica en el tratamiento de patologías relacionadas con la neuroinflamación, tales como el Alzheimer y el Parkinson (Rivers y Ashton, 2010).

2.2. PRINCIPALES FUNCIONES DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Las funciones del sistema cannabinoide endógeno son numerosas; como sistema neuromodulador se encuentra implicado en la regulación de diversos procesos fisiológicos. Estas funciones las realiza fundamentalmente a través de la modulación de la transmisión sináptica en el seno de una gran diversidad de redes neuronales locales. Se ha descrito la presencia de receptores CB1 en neuronas GABAérgicas, dopaminérgicas, adrenérgicas, glutamatérgicas y colinérgicas [ver por ejemplo (Kathmann *et al.*, 1999; Marsicano y Lutz, 2006; Monory *et al.*, 2006; Wallmichrath y Szabo, 2002)]. El sistema endocannabinoide modula la liberación de neurotransmisores tales como el glutamato, GABA (ácido gamma-aminobutírico), acetilcolina, serotonina, dopamina y adrenalina, entre otros, siendo éste el principal mecanismo por el que participa en la regulación de los diversos procesos fisiológicos (Freund *et al.*, 2003; Piomelli, 2003; Schlicker y Kathmann, 2001).

Entre las diversas funciones en las que ha sido implicado el sistema endocannabinoide destacan su papel en la coordinación y el control del movimiento, en los procesos de aprendizaje y memoria, en la regulación de estados emocionales y de ansiedad, en las respuestas al estrés y al dolor, en los mecanismos de recompensa y de control de la temperatura y del apetito [ver revisiones (Bermudez-Silva *et al.*, 2010; Gorzalka *et al.*, 2008; Hill y McEwen, 2010; Moreira y Lutz, 2008; Viveros *et al.*, 2005b)]. Además, el sistema endocannabinoide parece tener un papel crítico en el neurodesarrollo. Datos recientes apuntan a este sistema como uno de los principales responsables de la correcta organización neuronal, y como uno de los principales implicados en los procesos de neurogénesis (Anavi-Goffer y Mulder, 2009; Harkany *et al.*, 2007; Mulder *et al.*, 2008). El sistema endocannabinoide también ejerce importantes acciones neuroprotectoras en diferentes modelos de neurotoxicidad y enfermedades neurodegenerativas (Di Marzo y Petrosino, 2007; Pope *et al.*, 2010; Sarne y Mechoulam, 2005).

2.2.1. PAPEL DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE DURANTE EL DESARROLLO NEURAL

Tanto los receptores cannabinoides como sus ligandos endógenos han sido detectados en el cerebro en estadios muy tempranos del desarrollo (Berrendero *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 1997), proponiéndose que el sistema cannabinoide endógeno desempeña un papel importante en la maduración del cerebro mediando procesos de migración y neurogénesis (Jin *et al.*, 2004). Estudios recientes han revelado que tanto los endocannabinoides como ciertos lípidos relacionados con ellos están asociados con la correcta maduración y supervivencia de las células progenitoras (Aguado *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2002). Las células madre en el tejido cerebral (aún no diferenciadas) expresan las enzimas DAGL y FAAH (Aguado *et al.*, 2005), y son capaces de sintetizar tanto AEA como 2-AG (Begbie *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2008). En ratones mutantes en los que no se expresa el gen de la FAAH (FAAH^{-/-}) aumenta los niveles de AEA, y estimula la neurogénesis en zonas de proliferación neuronal tanto en el cerebro en desarrollo como en el cerebro adulto (Aguado *et al.*, 2005; Mulder *et al.*, 2008). Se ha demostrado también que una correcta señalización endocannabinoide resulta de vital importancia para el correcto desarrollo de la gliogénesis [para más detalles (Harkany *et*

INTRODUCCIÓN

al., 2007)] y en el establecimiento del equilibrio neurona-glía durante el desarrollo cerebral. El sistema cannabinoide endógeno también parece influir en la expresión de genes clave para el desarrollo neural, entre ellos los genes del sistema Bcl-2/Bax a través del cual parece participar en los procesos de apoptosis necesarios para un correcto desarrollo neural [ver revisión (Fernández-Ruiz *et al.*, 2004)].

El descubrimiento de trazas de ARNm para el Rc. CB1 en importantes zonas de proliferación neural y glial confirma la participación de este receptor en los procesos relacionados con el desarrollo neural. La expresión de receptores CB1 es baja en células madre, pero sufre un marcado incremento tras su diferenciación a neuronas (Mulder *et al.*, 2008). De forma paralela, la expresión de receptores CB2 disminuye una vez decidida la línea neural (Molina-Holgado *et al.*, 2007). Se ha descrito la presencia de ARNm para el Rc. CB1 en la zona subventricular, en la región del estriado y núcleo accumbens, y en neocorteza alrededor del día 21 de gestación en ratas (Berrendero *et al.*, 1998; Berrendero *et al.*, 1999). En otros estudios con roedores se ha descrito la presencia de Rc. CB1 en periodos más tempranos, en los días 11 y 14 coincidiendo con el periodo de desarrollo de otros sistemas de neurotransmisión [ver revisión (Fernández-Ruiz *et al.*, 2000)]. El bloqueo de receptores CB1 detiene la aparición de nuevas neuronas en capas profundas de la corteza, mientras que el incremento de los niveles de AEA mediante el bloqueo de la FAAH aumenta de forma marcada la entrada de nuevas neuronas en la placa cortical *ex vivo* (Mulder *et al.*, 2008).

Durante el desarrollo gestacional y los primeros días de desarrollo postnatal, se ha detectado una expresión de Rc. CB1 anormalmente alta en áreas de sustancia blanca, tales como el cuerpo calloso, fornix, estria terminalis, tallo cerebral, comisura anterior. La expresión de receptores CB1 disminuye una vez que los axones han alcanzado su destino final y las sinapsis se han formado (Berghuis *et al.*, 2007; Mulder *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 1997; Vitalis *et al.*, 2008). Este atípico patrón de distribución de los Rc. CB1, en zonas con una gran densidad de fibras, sugiere su presencia o en axones en proceso de migración hacia sus destinos donde establecerán las correspondientes sinapsis, o en células gliales, oligodendrocitos o astroglía, que acompañan a estas fibras durante la elongación y maduración axonal. Sin embargo, esta última hipótesis ha despertado cierta controversia al no haber detectado expresión del ARN mensajero para Rc. CB1 en células gliales en esta etapa del desarrollo (Fernández-Ruiz *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 1997).

El desarrollo ontogénico de este receptor presenta un marcado dimorfismo sexual. En hembras, los primeros días después del nacimiento se aprecia una densidad mayor de receptores en el cerebro anterior cuando se compara con los machos, situación que se revierte tras cinco días. A partir del día 10 de vida postnatal ya se pueden encontrar Rc. CB1 en zonas más definidas del cerebro, como el estriado, el sistema límbico y el mesencéfalo central. En estas áreas existe un incremento en la expresión del Rc. CB1 hasta el día 30 o 40 de vida postnatal, edad en la que se alcanzan la distribución y los niveles característicos de los animales adultos. Más recientemente se ha estudiado la expresión y función de los receptores CB1 en áreas corticales de ratas jóvenes (25 días de vida postnatal), adolescentes (40 días de vida postnatal) y adultas (70 días de vida postnatal). Se ha descrito cómo la expresión y funcionalidad de estos receptores es máxima en jóvenes y decae posteriormente hasta alcanzar los niveles característicos de los adultos. Sin embargo, el desarrollo de estos receptores CB1 sigue una trayectoria diferente en función del área cortical estudiada. Así, en zonas de corteza prefrontal medial y corteza límbica, la expresión y función de los receptores CB1 disminuye de forma pronunciada y progresiva a partir de la edad joven, mientras que en zonas de corteza sensorimotora esta reducción sólo se observa una vez alcanzada la edad adolescente (Heng *et al.*, 2010).

No sólo los receptores cannabinoides CB1 presentan un perfil particular a lo largo del desarrollo; también los ligandos endógenos presentan un patrón de síntesis y distribución característico durante las edades tempranas del desarrollo. Tanto los niveles de anandamida (AEA) como de 2-AG varían sustancialmente a lo largo del desarrollo (Berrendero *et al.*, 1999; Fernández-Ruiz *et al.*, 2000). La AEA está presente ya desde los primeros momentos de la gestación en el útero ya que participa en el proceso de implantación del embrión. La AEA parece desempeñar un papel fundamental en la correcta sincronización entre el comienzo de la receptividad uterina, la activación blastocística y la implantación del embrión (Harkany *et al.*, 2007; Paria *et al.*, 2001). A lo largo de la gestación los niveles de AEA y 2-AG fluctúan de forma diferente. Por un lado, los niveles de AEA permanecen bajos durante las etapas intermedias de la gestación (a partir del día 9-10 de gestación), y van aumentando a medida que se acerca el momento del nacimiento cuando alcanza los valores característicos de la edad adulta (Berrendero *et al.*, 1999). Por otro lado en la etapa intermedia de gestación, los niveles de 2-AG son superiores a los de la AEA, presentando, durante el desarrollo prenatal, niveles equiparables a los registrados durante la vida adulta, con un marcado incremento

INTRODUCCIÓN

en la concentración de 2AG en el momento del nacimiento (Berrendero *et al.*, 1999) (figura 5). Se propuso que este pico en los niveles cerebrales de 2-AG pudiera desempeñar un papel crítico en la estimulación del reflejo de lactancia y, por lo tanto, en el correcto desarrollo neonatal (Fride, 2004).

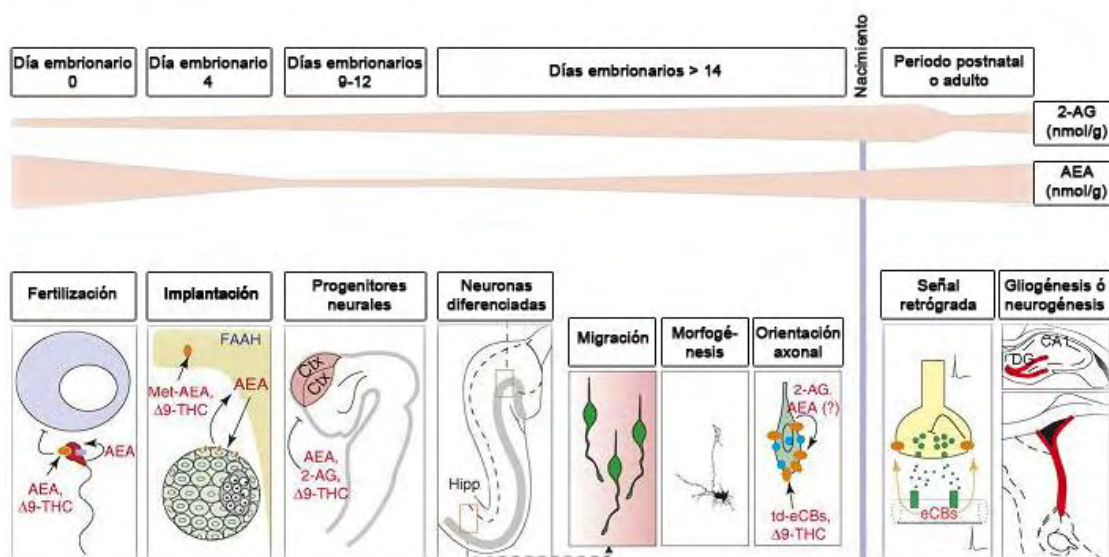


Fig. 5. Esquema de las posibles acciones del sistema endocannabinoide en el neurodesarrollo. En la parte superior se muestra la evolución de los niveles de 2-araquidnil glicerol (2-AG) y anandamida (AEA) durante el desarrollo neural, desde la fertilización hasta el periodo postnatal. En la parte inferior se encuentran ilustrados los principales cambios acados durante la embriogénesis que posiblemente cuentan con una mediación del sistema endocannabinoide. Sólo se muestran las acciones mediadas por los endocannabinoides conocidos y el tetrahidrocanabinol (Δ^9 -THC). El término td-eCBs se refiere a los lugares “diana” de los endocannabinoides potencialmente liberados por las neuronas “destino”. Esquema obtenido de Harkany *et al.*, 2007. *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol. 28 No.2 pág. 86.

2.2.2. FUNCIÓN NEUROPROTECTORA DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Las acciones neuroprotectoras de los endocannabinoides frente a lesiones cerebrales de diversa naturaleza han sido demostradas en diversos estudios *in vivo* (Gallily *et al.*, 2000; Garcia-Ovejero *et al.*, 2009) e *in vitro* (Loría *et al.*, 2010). Se han detectado alteraciones en los niveles endógenos de ligandos cannabinoides en diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson o la esclerosis múltiple (Anke *et al.*, 2004; Antonio *et al.*, 2005; Bilsland *et al.*, 2006; Dowie *et al.*, 2009). También se ha descrito un aumento en

los niveles de AEA y 2-AG en situaciones de neurotoxicidad (Mechoulam y Shohami, 2007). Esta función del sistema endocannabinoide no sólo se ha observado en modelos con animales adultos, sino también en modelos animales durante el desarrollo. Así, en un modelo animal de asfixia neonatal severa observamos que un tratamiento en agudo con WIN 55,212-2 era capaz de producir una reducción en la pérdida neuronal observable catorce días después de la lesión y del tratamiento (Martínez-Orgado *et al.*, 2003). En otro modelo de hipoxia-isquemia neonatal también se observó que el mismo agonista era capaz de provocar una reducción del 66% del área cerebral necrosada días después del tratamiento (Fernández-López *et al.*, 2007). En modelos de excitotoxicidad también se ha probado la acción neuroprotectora de los cannabinoides en cerebros de ratas neonatales, de hecho la anandamida redujo de forma dosis-dependiente la lesión provocada por un agonista de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA, protegiendo de los efectos tóxicos también a los pre-oligodendrocitos y facilitando la mielinización en zonas de sustancia blanca (Shouman *et al.*, 2006).

Son numerosos los mecanismos propuestos para la acción neuroprotectora de los endocannabinoides. Estudios *in vivo* parecen indicar que las acciones neuroprotectoras de ciertos compuestos cannabinoides son consecuencia de su notable capacidad antioxidante, de su capacidad de modular la presión arterial y/o de sus propiedades inhibitorias sobre la transmisión glutamatérgica. Las propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides podrían también deberse a las acciones de éstos sobre 1) la expresión de factores de crecimiento, BDNF o bFGF, 2) la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de crecimiento tumoral alfa (TNF α), 3) la inhibición de factores pro-apoptóticos, como el NF κ B, y/o 4) la atenuación de la liberación de ciclooxigenasa 2 [para revisión (Fowler *et al.*, 2010)]. En estudios *in vitro* se han identificado nuevos y diversos posibles mecanismos implicados en los efectos neuroprotectores de los cannabinoides. El agonista cannabinoide WIN 55,212-2 presenta propiedades neuroprotectoras frente a compuestos organofosforados (Sadri *et al.*, 2010), ejerce un marcado efecto neuroprotector frente a la excitotoxicidad provocada por NMDA en cultivos de células granulares del giro dentado, y parece ejercer sus efectos a través de la activación de receptores CB1, y a través de la modulación de canales de calcio dependientes de voltaje Ca (v) 2.2. y canales TRPA1 (Koch *et al.*, 2010). Por otro lado, las acciones neuroprotectoras del cannabidiol (CBD) parecen implicar el control homeostático de la liberación de calcio, así, en condiciones de baja excitabilidad celular, el CBD promueve la liberación de Ca²⁺, mientras que en

INTRODUCCIÓN

condiciones de alta excitabilidad (por ejemplo, en casos de excitotoxicidad), la inhibiría, mediando todas estas acciones la modulación de los niveles de calcio mitocondriales (Ryan *et al.*, 2009).

Los compuestos cannabinoides parecen ejercer sus acciones neuroprotectoras a través principalmente de los receptores CB1 y CB2 [ver revisiones (Di Marzo y Petrosino, 2007; Fowler *et al.*, 2010; Mechoulam y Shohami, 2007; Pope *et al.*, 2010; Sarne y Mechoulam, 2005)]. La carencia de Rc. CB1, en ratones deficientes para el gen del Rc. CB1 (CB1^{-/-}), confiere una mayor vulnerabilidad a posibles daños cerebrales causados por un episodio de isquemia o fenómenos de excitotoxicidad (Kim *et al.*, 2006; Parmentier-Batteur *et al.*, 2002). Se han descrito también cambios en la expresión de Rc. CB1 durante diversos procesos neurodegenerativos (Benito *et al.*, 2007; Glass *et al.*, 2000). En diferentes modelos animales de isquemia se han encontrado diversos efectos sobre la cantidad de este receptor. Por ejemplo, en uno de estos modelos se describió una reducción de la cantidad de receptor CB1 detectado por medio de técnicas inmunohistoquímicas en el hipocampo de gerbos 24, 48 y 96 horas después del proceso de isquemia (Schomacher *et al.*, 2006). En cambio, en otro modelo similar en el que se emplearon ratas, se encontró un incremento en la expresión de ARNm para el Rc. CB1 horas después del proceso (Zhang *et al.*, 2008). Es evidente que las diferencias no sólo pueden deberse a los diferentes tiempos en los que son tomados los tejidos para su análisis tras la exposición a la isquemia, también la técnica que se usa y el empleo de dos especies animales (gerbo en el primero y rata en el segundo experimento citado) pueden explicar estas divergencias. Empleando otros modelos de neurotoxicidad, como, por ejemplo, excitotoxicidad por kainato, también se ha observado un incremento en la expresión de ARNm para este receptor (Aguado *et al.*, 2007).

El Rc. CB2 también parece también ejercer un papel crítico en los fenómenos de respuesta a la neurotoxicidad. Como se describió para el Rc. CB1, la ausencia de Rc. CB2 en ratones mutantes también confiere una mayor vulnerabilidad frente a daños cerebrales, tales como los producidos en un modelo de isquemia-reperfusión (Zhang *et al.*, 2008) o de neurotoxicidad (Price *et al.*, 2009). En respuesta a ciertos fenómenos de excitotoxicidad se produce la liberación de citoquinas que facilitan la expresión de Rc. CB2 en la microglía reactiva (Fowler *et al.*, 2010). La participación de estos receptores CB2 en diversos mecanismos de neuroprotección se ve reforzada por el hecho de que su expresión aumenta en relación a determinados procesos neurotóxicos, manteniéndose su distribución más restringida en condiciones fisiológicas. Un incremento en los niveles

de expresión de estos receptores ha sido descrito en enfermos de Alzheimer en células de astrogliá y microgliá (Benito *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2005), en pacientes diagnosticados de esclerosis múltiple en células inmunes presentes en zonas de desmielinización (Benito *et al.*, 2007) y, asociados a macrófagos, en modelos experimentales de isquemia o tras la administración de una neurotoxina dopaminérgica en un modelo animal de Parkinson (Ashton *et al.*, 2007; Price *et al.*, 2009). Además, la administración de diferentes agonistas cannabinoides para el Rc. CB2 produce efectos beneficiosos en diversos modelos animales de daño neuronal (Zhang *et al.*, 2008), en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (Palazuelos *et al.*, 2009; Sagredo *et al.*, 2009), el Parkinson (Price *et al.*, 2009) y la esclerosis lateral amiotrófica (Shoemaker *et al.*, 2007).

Tanto los ligandos cannabinoides endógenos como los receptores CB1 y CB2 desempeñan un papel de gran relevancia en los procesos relacionados tanto con neurodegeneración como con neuroprotección y el resultado depende, entre otras cosas, del tipo celular y de la dosis empleada. Se ha propuesto que el sistema endocannabinoide pueda ser el mecanismo que utilizara el sistema nervioso para protegerse de diferentes agresiones, de forma semejante a como el sistema inmune protege al organismo de forma global (Mechoulam y Shohami, 2007; Pope *et al.*, 2010). Estos datos nos llevaron a emplear en la presente Tesis Doctoral dos aproximaciones diferentes para la posible reversión de los efectos de la separación materna, un agonista directo e inhibidores de la inactivación de endocannabinoides. Como se explica más adelante pudimos comprobar como la misma dosis de WIN que en un trabajo anterior había mostrado eficacia neuroprotectora en animales neonatales sometidos a hipoxia-isquemia (Martínez-Orgado *et al.*, 2003) produjo en animales control una serie de efectos deletéreos a diversos niveles de la fisiología y el comportamiento de los individuos.

Lo que en conjunto parece indicar la bibliografía es que el sistema endocannabinoide funciona como un “guardián de la homeostasis” en muchos aspectos, también en cuanto a su respuesta frente al daño cerebral, y que el mantenimiento del equilibrio en este sistema es esencial para el correcto desarrollo del individuo (Marco y Viveros, 2009)

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Sobre la base de lo expuesto en la Introducción, pasamos a continuación a exponer la hipótesis de trabajo y los objetivos que han guiado esta Tesis Doctoral. Para facilitar la comprensión de los diferentes aspectos de nuestra Hipótesis, recordaremos brevemente los antecedentes inmediatos que nos llevaron a planteárnoslo.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. En función de las alteraciones comportamentales mostradas por las ratas adultas que habían sido sometidas a privación materna (24h a día 9 postnatal), nos planteábamos que este modelo nos podría servir para “poner a prueba” la teoría del neurodesarrollo de una manera directa, mediante el estudio de posibles alteraciones en áreas críticas del cerebro durante el desarrollo temprano. A este respecto, nos planteamos que esas potenciales alteraciones podrían afectar no sólo a áreas clásicamente relacionadas con alteraciones psiquiátricas (depresión, esquizofrenia) como el hipocampo y la corteza prefrontal, sino a otras de consideración más reciente en este área de la neuropsiquiatría como el cerebelo.

2. Dado que el modelo de separación materna implica un importante componente nutricional, las consecuencias a largo plazo de este estrés neonatal podrían abarcar aspectos metabólicos, y en relación con esto podría verse afectada la evolución del peso corporal de los animales separados, así como factores endocrinos implicados directamente en el control de la ingesta y el balance energético. En concreto, nos interesamos de una manera muy particular por la leptina.

3. Esperábamos encontrar alteraciones inmunológicas en los animales sometidos a separación materna, este aspecto de nuestra hipótesis se basaba fundamentalmente en las siguientes premisas:

- a) La alimentación de las crías durante su vida postnatal temprana previa al destete tiene una importancia fundamental en cuanto al adecuado desarrollo y maduración del sistema inmunológico.
- b) Los enfermos esquizofrénicos pueden presentar alteraciones de su sistema inmunológico.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

c) Se ha propuesto a la separación materna como modelo animal de signos de tipo psicótico en edad adulta.

4. Esperábamos que la separación materna afectara al desarrollo del sistema endocannabinoide (particularmente hipocampal). Este aspecto de nuestra hipótesis se basaba fundamentalmente en las siguientes premisas:

a) Ciertas alteraciones psiquiátricas como la esquizofrenia se asocian con modificaciones tanto en los receptores cannabinoideos como en los niveles de endocannabinoideos.

b) El sistema endocannabinoide está estrechamente implicado en la respuesta al estrés y en el desarrollo del cerebro.

c) Los animales separados de la madre muestran respuestas alteradas a agonistas cannabinoideos (este dato lo obtuvimos en uno de los primeros experimentos de esta Tesis Doctoral).

5. La separación materna podría constituir un factor inductor de un fenotipo “vulnerable” a sucesos estresantes ulteriores que pudieran aparecer en un segundo período crítico del desarrollo, a saber, la adolescencia. Este modelo nos permitiría ahondar en el modelo del “doble impacto” (*two hits*). Esperábamos que los efectos presumiblemente deletéreos de cada una de las dos experiencias estresantes pudieran sumarse y/o potenciarse en cuanto a su impacto sobre la psicofisiología del animal adulto.

6. Esperábamos que el factor “sexo” afectara a la inmensa mayoría de los aspectos expuestos en los puntos anteriores.

OBJETIVOS

Con el fin de poner a prueba los diferentes aspectos de nuestra hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Realizar una caracterización psiconeuroinmunoendocrina del modelo de separación materna que abarcara períodos críticos del desarrollo, con particular atención al período adolescente.
2. Analizar posibles efectos de la separación materna sobre el desarrollo neural, atendiendo tanto a neuronas como a células de glía en hipocampo y cerebelo en desarrollo.
3. Investigar interacciones de la separación materna con el sistema endocannabinoide mediante las siguientes aproximaciones:
 - a) Estudio de los efectos combinados de separación materna y administración temprana de un agonista cannabinoide en ratas adolescentes.
 - b) Estudio de la posible modulación de efectos de la separación materna (observados en relación al objetivo 2) por parte de inhibidores de la inactivación de endocannabinoides en edad postnatal temprana.
 - c) Valoración del impacto de la separación materna sobre receptores CB₁ y CB₂ cannabinoideos, así como sobre niveles de endocannabinoides, y enzimas implicadas en su síntesis y degradación, todo ello a nivel del hipocampo en desarrollo.
4. Evaluar las consecuencias a largo plazo, desde un punto de vista integrador y una perspectiva multidisciplinar (desde moléculas de plasticidad sináptica hasta función cognitiva), de la combinación de dos impactos de naturaleza estresante, la separación materna y un protocolo de estrés crónico impredecible impuesto en el período periadolescente. En este último objetivo tuvimos en cuenta posibles efectos sobre hormonas relacionadas tanto con el balance energético como sobre la función reproductora, a saber, leptina, testosterona y estradiol.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

5. Evaluar la posible existencia de dimorfismos sexuales en todos los experimentos propuestos para la obtención de los anteriores objetivos.

BLOQUE I. ETAPA ADOLESCENTE

Caracterización psiconeuroinmunoendocrina del modelo animal de separación materna temprana en edad adolescente. Efectos del agonista cannabinoide WIN 55,212-2

Como se ha mencionado en el apartado de la introducción, la alteración de la relación materno-filial durante edades tempranas del desarrollo se ha utilizado como modelo animal para estudiar trastornos psicopatológicos. El modelo de separación materna temprana elegido en la presente Tesis Doctoral (24 h el día 9 de vida postnatal) ha demostrado ser de gran utilidad para el estudio en roedores de posibles alteraciones psicopatológicas similares a los síntomas que se observan en pacientes esquizofrénicos (Ellenbroek y Cools, 2002; Ellenbroek y Riva, 2003), en personas con sintomatología depresiva (Macri y Laviola, 2004) o con trastornos cognitivos (Enthoven *et al.*, 2008; Workel *et al.*, 2001). En el caso de este modelo, y de otros modelos de separación materna neonatal, la mayoría de los datos provienen de los resultados obtenidos en machos en edad adulta (normalmente a partir del tercer mes de vida), con lo que existe muy poca información acerca de los efectos que podría tener este tratamiento en otros periodos del desarrollo, como por ejemplo la adolescencia, o acerca de sus efectos e incidencia en las hembras.

La adolescencia en humanos se considera generalmente como el periodo entre los 13 y los 19 años. De forma paralela, en los roedores, la adolescencia se considera que comienza cuando se detectan los primeros ciclos maduros de gonadotropinas (alrededor del día 28 de vida postnatal) y finaliza en el momento de la madurez reproductiva (alrededor del día 40 de vida postnatal en hembras y del día 60 en machos). De acuerdo con esta estimación, en ratas y ratones se considera el periodo de la adolescencia como la ventana temporal comprendida entre los días 28 y 40 de vida postnatal (Spear, 2000). Durante este periodo, tanto en humanos como en roedores, suceden una gran cantidad de cambios fisiológicos, comportamentales y neuroendocrinos, mostrando los individuos adolescentes un comportamiento muy diferente al que se puede apreciar en adultos. Los adolescentes, en comparación con los individuos adultos, presentan una actividad locomotora y exploratoria incrementada, unos elevados niveles de impulsividad, una mayor interacción social, junto con una mayor vulnerabilidad y propensión al consumo y abuso de drogas [ver para revisión

(Adriani *et al.*, 1998; Adriani y Laviola, 2004; Laviola *et al.*, 2003; Primus y Kellogg, 1989; Spear, 2000, 2004; Vanderschuren *et al.*, 1997)]. La adolescencia también se caracteriza por ser la etapa de la vida en la que comienzan a aparecer los primeros signos y síntomas asociados a algunos desórdenes psiquiátricos, entre ellos la esquizofrenia (Ernst *et al.*, 2009; Spear, 2004).

En adultos se ha observado un alto índice de comorbilidad entre la esquizofrenia o los desórdenes esquizoafectivos y otros síndromes psiquiátricos tales como la depresión y los desórdenes de ansiedad (Braga *et al.*, 2004; Fenton, 2001; Green *et al.*, 2003). Es más, estos altos índices de comorbilidad parecen extenderse a edades más tempranas, observándose frecuentemente en niños y adolescentes (Ross *et al.*, 2006). A pesar de este dato, han sido muy pocos los estudios que hayan analizado la posible comorbilidad en modelos animales, y particularmente durante la ventana temporal de la adolescencia. En un modelo animal de separación materna temprana se ha descrito una menor respuesta al estrés en animales adolescentes (Suchecki y Tufik, 1997), no se han observado efectos de la separación materna sobre la respuesta de inhibición prepulso en individuos adolescentes (Ellenbroek *et al.*, 1998), y se han descrito alteraciones en los niveles de impulsividad y de reactividad a ambientes nuevos (Marco *et al.*, 2007). Dada la escasa información que existe sobre este periodo de la adolescencia en cuanto a las modificaciones provocadas por la separación materna, y su importancia en el origen y comorbilidad con diferentes trastornos psiquiátricos, resulta de gran interés su estudio en el contexto de la hipótesis del neurodesarrollo.

En diversos desórdenes psiquiátricos, entre ellos la esquizofrenia, se han descrito notables alteraciones inmunológicas (Muller *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2001). Concretamente, en pacientes esquizofrénicos se ha visto alterada la linfoproliferación en respuesta a un mitógeno (Moises *et al.*, 1985), o la capacidad quimiotáctica directa (Cosentino *et al.*, 1996). En estos pacientes neuropsiquiátricos se ha descrito un incremento de anticuerpos y citoquinas pro-inflamatorias, y se ha visto que la incidencia de trastornos mentales es del 45% entre la población que padece algún tipo de trastorno autoinmune (Potvin *et al.*, 2008; Strous y Shoenfeld, 2006). De forma semejante, en pacientes diagnosticados de depresión se ha detectado un aumento de citoquinas pro-inflamatorias y se ha descrito un aumento en la incidencia de este trastorno en personas que padecen enfermedades infecciosas, autoinmunes o neuroinflamatorias con respecto a controles sanos. Por otro lado, en los enfermos de esquizofrenia (Walker y Diforio, 1997) y depresión (Zunszain *et al.*, 2010) se encuentra alterada la función del eje HHA.

Existen además importantes interacciones entre las funciones inmune y endocrina (Gaillard, 2001). A este respecto, cabe destacar, la fuerte influencia de las hormonas implicadas en la respuesta neuroendocrina frente al estrés en el control de la respuesta inmunitaria (Eskandari y Sternberg, 2002). Esta interacción es particularmente relevante durante el desarrollo neonatal cuando ambos sistemas están madurando y estableciendo sus numerosas interconexiones (Charmandari *et al.*, 2003). Estas razones nos han llevado a plantearnos el estudio del desarrollo del sistema inmune en el contexto de la hipótesis del neurodesarrollo empleando para ello nuestro modelo animal de separación materna temprana y evaluando las posibles alteraciones a distintas edades del desarrollo.

Las consecuencias deletéreas de la separación materna podrían deberse, al menos en parte, a los efectos neurotóxicos y/o neurodegenerativos provocados por el estrés de la separación materna (Ellenbroek y Cools, 2002; Zhang *et al.*, 2002a). Dados los efectos neuroprotectores descritos para diversos compuestos cannabinoides [ver introducción y (Mechoulam y Shohami, 2007; Pope *et al.*, 2010; Sarne y Mechoulam, 2005)], en la presente Tesis Doctoral también hemos estudiado los posibles efectos neuroprotectores de un agonista cannabinoide, el agonista sintético WIN55,212-2, en la reversión o atenuación de algunos de los efectos neuroinmunoendocrinos y comportamentales inducidos por la separación materna.

Así pues, en los experimentos recogidos en el presente capítulo, estudiamos la aparición temprana, durante la edad adolescente, de **síntomas relacionados con trastornos de ansiedad y/o depresión** en ratas de ambos sexos sometidas a nuestro protocolo de separación materna temprana, empleando para ello el **laberinto en cruz elevado** y en el **test de natación forzada**. De forma complementaria se evaluaron algunos **parámetros endocrinos de respuesta al estrés** en estos animales así como su **status inmunológico**. Además, en estos experimentos, se estudió el posible papel neuroprotector del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 en nuestro modelo animal de separación materna temprana.

Parte de los experimentos donde se encuentran descritos estos resultados están reflejados en el artículo:

Llorente R et al (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32: 636-650.

Publicado on-line: <http://www.sciencedirect.com/science?>

[_ob=ArticleURL&udi=B6TBX-4NWW6SG-1&user=144492&coverDate=07%2F31%2F2007&rdoc=1&fmt=high&orig=gateway&origin=gateway&sort=d&docanchor=&view=c&acct=C000012038&version=1&urlVersion=0&userid=144492&md5=e5e0359e315aaf53389d34918ab7dc7a&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&udi=B6TBX-4NWW6SG-1&user=144492&coverDate=07%2F31%2F2007&rdoc=1&fmt=high&orig=gateway&origin=gateway&sort=d&docanchor=&view=c&acct=C000012038&version=1&urlVersion=0&userid=144492&md5=e5e0359e315aaf53389d34918ab7dc7a&searchtype=a)

Principle short- and long-term effects of early maternal deprivation (24h, postnatal day 9) on immune function in Wistar male and female rats

Data reported bellow were included, as original findings, in the review article by *De la Fuente et al. 2009. Ann N Y Acad Sci 1153: 176-83*. Please find the complete version of this review article in the “ANEXO I” of this present Doctoral Thesis.

Principales efectos de la separación materna temprana (24h, día 9 de vida postnatal) sobre la función inmune en ratas Wistar machos y hembras a corto (día 13 de vida postnatal) y largo plazo (75 días de vida postnatal)

Los datos aquí descritos se incluyeron, como datos originales, en el artículo de revisión: De la Fuente et al. 2009. Ann N Y Acad Sci 1153: 176-83 que aparece completo en el ANEXO I de la presente Tesis Doctoral.

Abstract

Adult animals that had been subjected to a single prolonged episode of maternal deprivation (MD) [24 h, postnatal day (PND) 9–10] show long-term behavioral alterations that resemble specific symptoms of schizophrenia. Moreover, at adolescence MD rats showed depressive-like behavior and altered motor responses. According to the neurodevelopmental hypothesis, certain behavioral abnormalities observed in MD animals may be related to altered neurodevelopmental processes triggered by MD-induced elevated glucocorticoids in relevant specific brain regions. We review here these neuroendocrine effects and show new data indicating that the MD procedure induces diverse detrimental effects on the immune system that are already revealed in the short term (PND 13) and persist into adulthood. These long-lasting effects might be related to altered hypothalamus–pituitary–adrenal axis activity and to social as well as nutrition-related factors. In fact, MD induces long-lasting decreases in body weight. In view of our findings we propose the present MD procedure as a potentially useful model to analyze developmental interactions between early psychophysiological stress and immunodeficient states.

Material & Methods

The experiments performed in this study were approved by our institutional committee and are in compliance with the Royal Decree 1201/2005, October 21, 2005 (BOE n° 252) on protection of experimental animals, as well as with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Animals

Albino *Wistar* rats of both sexes were used. Experimental subjects were the offspring of rats purchased from Harlan Laboratories S.L. (Barcelona, Spain) that were mated (one male x two females) in our animal facilities approximately 2 weeks after their arrival. All animals were maintained at a constant temperature (22 ± 1 °C) and humidity ($50 \pm 1\%$) in a reverse 12-h dark-light cycle (lights on at 20:00 h), with free access to food (commercial diet for rodents A04/A03; Panlab, Barcelona, Spain) and water.

On the day of birth (postnatal day, PND 0), litters were sex-balanced, weighed and culled to 8 pups (4 males and 4 females) per dam. The litters were randomly assigned to the different experimental groups: control or maternal deprived rat pups and immune tissues (thymus and spleen) were collected at the neonatal period (PND 13; n=8-9 per experimental group) and at adulthood (PND 75; n=8-9 per experimental group). The litters chosen for the adult studies were weaned at PND 22. In all experimental groups, rats of at least three litters were used in order to reduce litter effect.

Maternal deprivation

Maternal deprivation took place on PND 9. In brief, mothers from the deprived groups were removed from their offspring early in the morning of PND 9 (beginning at 09:00h). Pups were weighed and remained undisturbed without the dam in their home-cage for 24 hours (in the same animal room). On PND 10 pups were weighed again and the corresponding dam was returned back to the corresponding home-cage. Mothers from the control groups were briefly removed from their home cages on PND 9 and PND 10 and pups weighed.

Tissue collection and Immune assays

Rats were sacrificed by rapid decapitation at two time points: on PND 13 and at PND 75. All sacrifices began at 09:00 h (one hour after the beginning of the dark part of the cycle) and finished at 11:30 h approximately. Spleen and thymus were removed aseptically, freed of fat, minced with scissors and gently pressed through a mesh screen (Sigma, St. Louis, and USA). Cell suspensions were

centrifuged in a gradient of Ficoll-Hypaque (Sigma) with a density of 1.070 g/ml. Cells were recollected from the interface and re-suspended in RPMI 1640 medium enriched with L-glutamine (PAA, Pasching Austria) and supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (Gibco, Canada) and gentamicin (10 mg/ml, Gibco) (complete medium). Lymphocytes were washed and their number was determined and adjusted to 10⁶ cells/ml. Cellular viability, routinely measured before and after each experiment by the Trypan-Blue exclusion test, was higher than 95% in all experiments. All incubations were performed at 37±1°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Natural Killer activity

An enzymatic colorimetric assay was used for cytolysis measurements of target cells (Cytotox 96™ Promega, Boerlinher Ingelheim, Germany) based on the determination of lactate dehydrogenase (LDH) using tetrazoliumsalts as previously described (Ferrandez *et al.*, 1999). Briefly, target cells (YAC-1 cells from a murine lymphoma) were seeded in 96-well U-bottom culture plates (Nunclon, Denmark) at 10⁴ cells/well in 1640 RPMI medium without phenol red (PAA, Pasching Austria). Effector cells (leukocytes from spleen or thymus) were added at 10⁵ cells/well, obtaining an effector/target rate of 10/1. The plates were centrifuged at 250g for 4 min to facilitate cell to cell contacts and then they were incubated for 4 h. After incubation, LDH activity was measured in a 50 µl/well containing the supernatants by addition of the enzyme substrate with absorbance recording at 490 nm. Three kinds of control measurements were performed: a target spontaneous release, a target maximum release, and an effector spontaneous release. To determine the percentage of lysis of target cells, the following equation was used: %lysis = ((E-ES-TS)/(M-ES-TS))x100, where E, mean of absorbance in the presence of effector cells; ES, mean of absorbance of effector cells incubated alone; TS, mean of absorbance in target cells incubated with medium alone, and M, mean of maximum absorbance after incubating target cells with lysis solution.

Lymphoproliferative response

The proliferation of lymphocytes in response to the mitogen Concanavalin A (Con A) or lipopolysaccharide (LPS) was assayed following a method previously described (Del Rio *et al.*, 1994). Aliquots of 200 µl of spleen or thymus lymphocyte suspensions, adjusted to 1x10⁶ cells/ml of RPMI 1640 medium enriched with L-glutamine and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, Canada) and gentamicin (100 mg/ml, Gibco), were seeded in ninety-six well flat-bottomed microtiter plates (Nunclon, Denmark) and incubated in absence

(spontaneous proliferative response) or presence of Con A (Sigma, 1 mg/ml) or LPS (1 mg/ml) 48 h. Then, 5 mCi ^3H -thymidine (ICN, Costa Mesa, USA) was added to each well and after 24 h the cells were harvested and thymidine uptake was measured in a beta counter (LKB) for 1 min. The results were expressed as c.p.m. for spontaneous proliferative response and as stimulation index (percentage of proliferation in response to Con A or LPS, with 100% being the thymidine uptake c.p.m. in spontaneous proliferative response wells) for the proliferative response to mitogens.

Results

1. Short-term effects in 13 days old rats

The two-way ANOVA of the Natural Killer (NK) cells activity revealed a significant overall effect of sex [$F(1,21)= 11.347$; $P<0.01$] and MD [$F(1,21)= 94.208$; $P<0.001$]. A significant interaction of sex by MD was also evidenced [$F(1,21)= 7.592$; $P<0.05$] in the percentage of lysis of NK cells from the thymus. Post-hoc comparisons indicated that control males presented a higher NK activity when compared to control females and the MD protocol significantly decreased the NK activity within thymus.

Regarding LPS induced lymphoproliferative response, the analysis rendered a MD significant effect in thymus [$F(1,24)= 29.412$, $P<0.001$] and spleen [$F(1,30)= 40.102$, $P<0.001$] and a significant interaction between sex and MD [$F(1,30)= 9.963$, $P<0.01$] within the spleen. As the figure 1 shows, MD significantly decreased the LPS induced lymphoproliferative response of both male and female rat pups within the thymus, but exclusively of male rat pups within the spleen.

The analyses of the chemotactic function also revealed a significant sex Thymus: $F(1,32)= 5.734$; $P<0.05$; Spleen: $F(1,32)= 24.167$; $P<0.001$] and MD effect [Thymus: $F(1,32)= 40.409$; $P<0.001$; Spleen: $F(1,32)= 18.411$; $P<0.001$] in both immune organs. In both cases MD reduced the chemotactic function.

2. Long-term effects in 75 days old rats

The study of NK activity rendered a significant overall effect of MD both immune tissues [Thymus: $F(1,24)= 25.633$, $P<0.001$ and spleen: $F(1,24)= 44.187$, $P<0.001$]. A significant interaction between sex and MD was also achieved [$F(1,24)= 11.762$, $P<0.01$]. MD significantly decreased NK activity in both immune organs. Moreover, control males presented a higher NK activity than control females.

Two way ANOVA for mitogen induced lymphoproliferation showed a significant MD effect within the thymus for LPS [$F(1,24)= 14.392$, $P=0.001$] and ConA [$F(1,24)= 7.083$, $P<0.05$]. As figure 2 shows, MD significantly decreased LPS induced lymphoproliferative response both among male and female adult rats, while ConA induced lymphoproliferative response was only decreased among males. Within the spleen MD exclusively affected ConA induced lymphoproliferative response [$F(1,24)= 7.336$, $P<0.05$]. A significant overall effects of sex was also revealed [$F(1,24)= 16.780$, $P<0.001$] with females showing a higher level of ConA induced lymphoproliferative response.

Rats PN 13

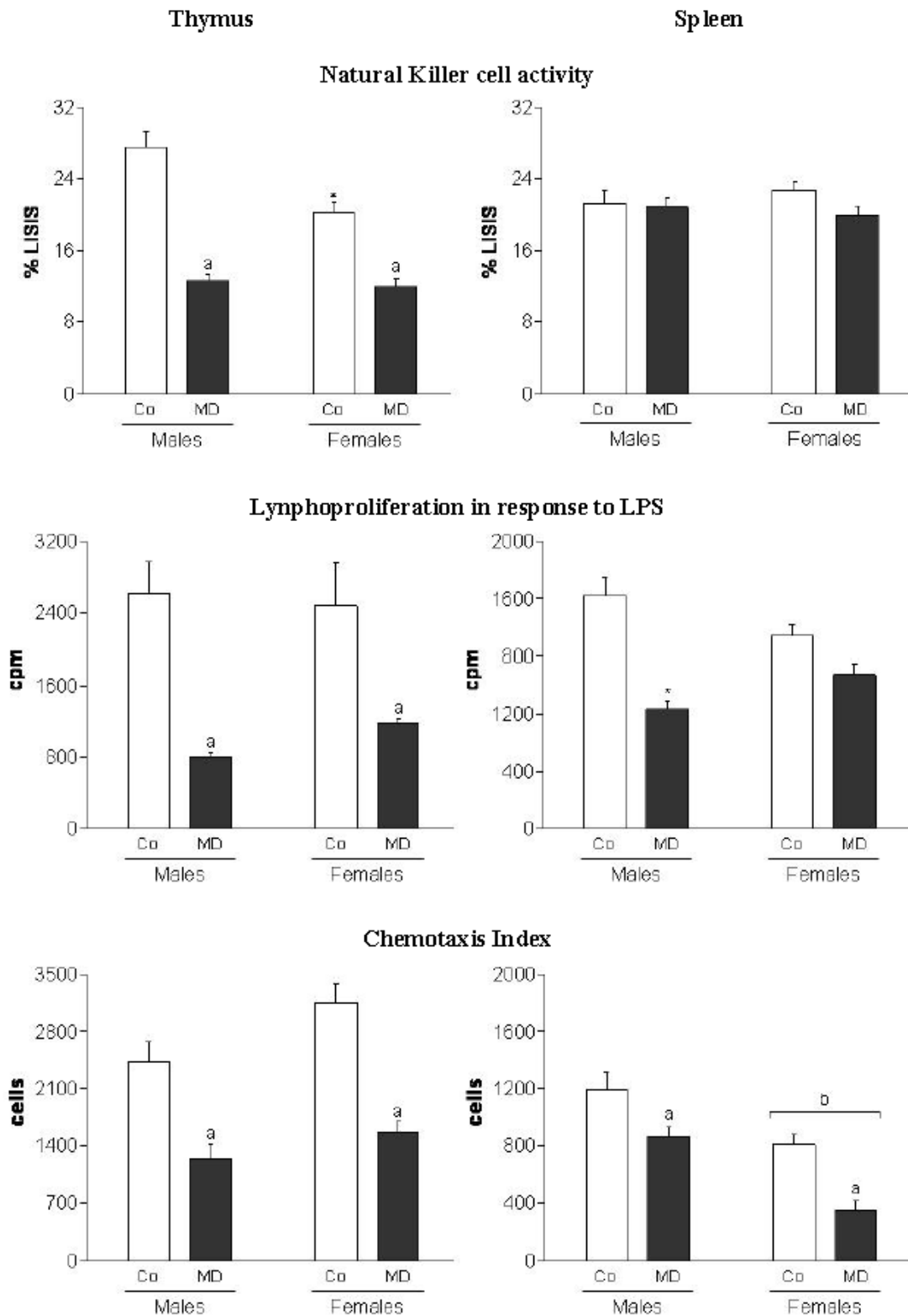


Figure 6. Effects of early maternal deprivation (MD) on immunological parameters in the thymus and spleen of 13 day old rats. Histograms represent the mean \pm S.E.M (7–10 animals per experimental group) of Natural Killer cell activity (% lisis), lymphoproliferation in response to LPS (Lipopolysaccharide) (cpm) and chemotaxis index (CI). ANOVA and Tukey ($P < 0.05$): (a) significant overall effects of MD (see text for details); (b) significant overall effects of gender (see text for details). * vs. Male Co.

Rats PN 75

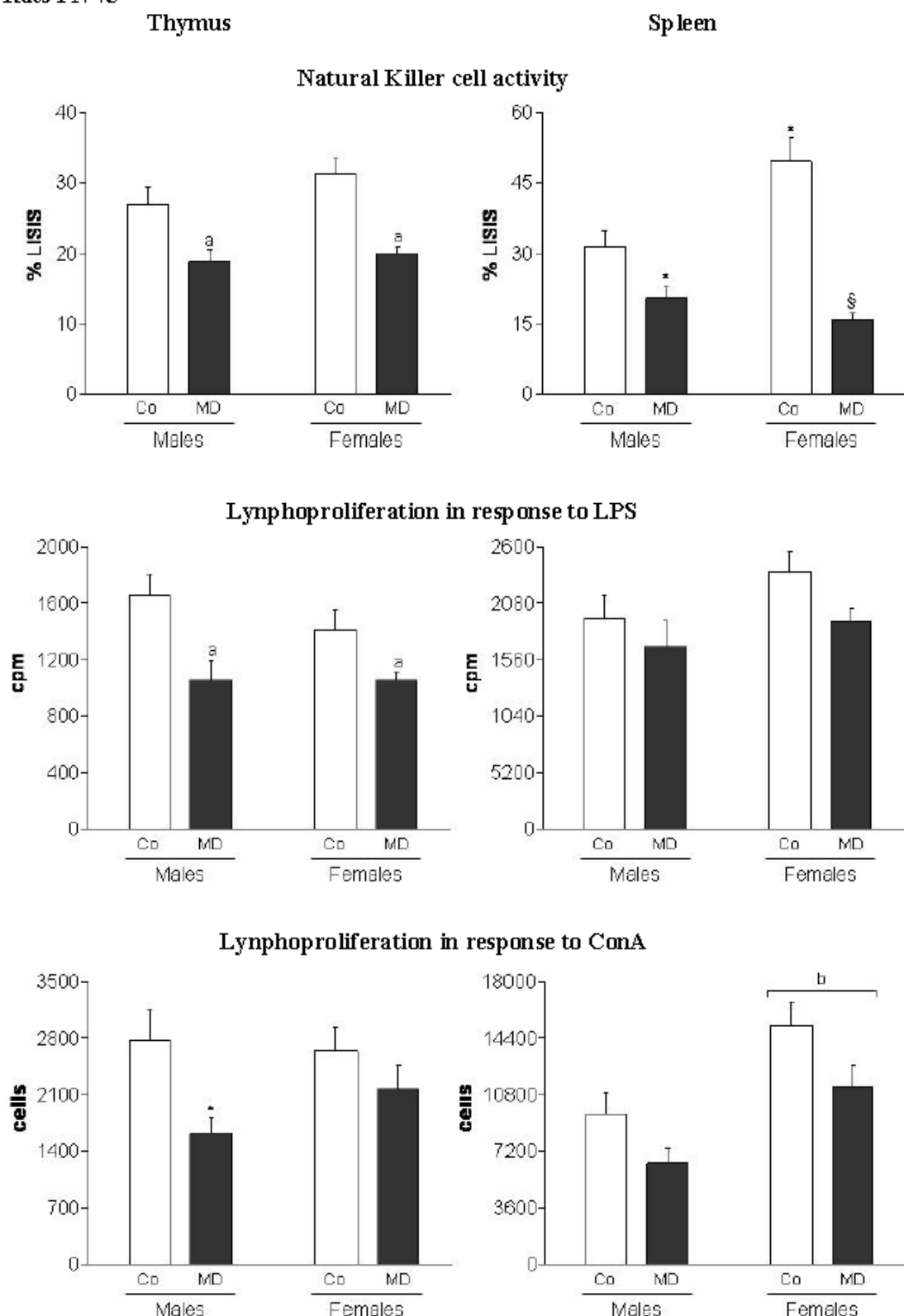


Figure 7. Effects of early maternal deprivation (MD) on immunological parameters in the thymus and spleen of 75 day old rats. Histograms represent the mean \pm S.E.M (7–10 animals per experimental group) of Natural Killer cell activity (% lysis), lymphoproliferation in response to LPS (Lipopolysaccharide) and ConA (concanavalina A) (cpm). ANOVA and Tukey ($P < 0.05$): (a) significant overall effects of MD (see text for details); (b) significant overall effects of gender (see text for details). * vs. Male Co; § vs. Female Co.

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos indican como el protocolo de la separación materna temprana provocó importantes efectos psiconeuroinmunoendocrinos ya evidentes desde la edad adolescente. Además, la administración del agonista cannabinoide WIN55,212-2 permitió demostrar el papel crítico del sistema endocannabinoide en el desarrollo neonatal, así como la posible implicación del mismo en los efectos de nuestro protocolo de separación materna temprana.

Principales efectos de la separación materna

Nuestros resultados evidenciaron importantes cambios comportamentales en los animales adolescentes sometidos al protocolo de separación materna comparados con el grupo de animales control no separados. Estas alteraciones presentaron un marcado perfil sexodimórfico, y los principales efectos encontrados fueron:

1. Una reducción del peso corporal, que se prolonga desde el momento final de la separación materna (día 10 de vida postnatal) hasta bien avanzada la adolescencia. Este efecto resultó ser más estable y duradero en machos que en hembras.

2. A nivel comportamental se observó una reducción de la actividad motora tanto horizontal como vertical en los machos separados neonatalmente de su madre. En las hembras la separación materna no pareció alterar los parámetros de actividad motora. La separación materna no afectó los niveles de emotividad evaluados en el laberinto en cruz elevado ni en machos ni en hembras. Sin embargo, los animales de ambos sexos, en el test de natación forzada mostraron un comportamiento de tipo depresivo al aumentar el tiempo transcurrido en postura de inmovilidad.

3. A nivel endocrino se describieron alteraciones en el funcionamiento del eje HHA como consecuencia de la separación materna en función del sexo. De base, las hembras presentaron niveles mayores de corticosterona en plasma que los machos. La separación materna provocó una reducción en los niveles circulantes de corticosterona únicamente en hembras.

4. A nivel inmunológico la separación materna provocó un deterioro significativo, evidente ya a los pocos días después de haber sido sometidos los animales a esta manipulación. Así, tan sólo tres días después de la separación materna (día 13 postnatal) se observó una reducción en el número de células *natural killer* (NK), en la respuesta linfoproliferativa frente a un antígeno y en la quimiotaxis respecto a los niveles observados en el timo de los animales control no separados. En bazo, tanto la respuesta linfoproliferativa frente a un antígeno como la quimiotaxis también se vieron reducidas. A esta edad ya se observan algunas diferencias sexo-dimórficas tanto a nivel basal (por ejemplo la actividad de las células NK en el timo o la quimiotaxis en el bazo), como en el efecto de la separación materna, que en el bazo resultó más dramático en machos que en hembras en relación a la respuesta al antígeno. Durante la etapa adolescente (día 40 postnatal) tanto los valores de linfoproliferación mediada por mitógeno como el índice de quimiotaxis siguen presentando valores más bajos en los individuos separados, tanto en el timo como en el bazo y los ganglios axilares, siendo este efecto significativo en ambos sexos. La alteración de estos parámetros endocrinos perdura hasta la edad adulta (día 75 postnatal), observándose aún una disminución en el timo de la actividad de las células NK y de la actividad linfoproliferativa frente a mitógeno. Cabe destacar el hecho de que las diferencias sexuales, al menos en el bazo, se mantienen en la edad adulta en relación a parámetros tales como la actividad NK o la activación frente a mitógeno, mostrando cómo el desarrollo y la actividad del sistema inmune se produce, al menos en relación con algunos parámetros, de forma diferencial en machos y en hembras.

Efectos del agonista cannabinoide

La administración de una única inyección del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 inmediatamente después del episodio de separación materna a una dosis de 0,1 mg/kg por vía subcutánea, también produjo importantes alteraciones comportamentales, endocrinas e inmunes observables en la edad adolescente.

Respecto a las alteraciones comportamentales, se observó como los machos en edad adolescente que habían sido tratados con WIN 55,212-2 presentaban una menor

actividad locomotora y exploratoria en el tablero con agujeros. En el laberinto en cruz elevado, el tratamiento con WIN 55,212-2 provocó una reducción en los parámetros de exploración de los brazos abiertos, indicativo de un posible efecto de tipo ansiogénico, en machos pero no en hembras. Por el contrario, en la prueba de la natación forzada, el agonista cannabinoide sólo afectó de forma significativa a las hembras, en las cuales provocó un aumento del tiempo transcurrido en inmovilidad, efecto relacionado clásicamente con una respuesta de tipo depresivo.

En cuanto a los efectos a nivel endocrino, tanto en machos como en hembras, la administración del agonista cannabinoide provocó un marcado y persistente incremento en los niveles basales de corticosterona plasmática, independientemente de si los animales habían sido sometidos al episodio de separación materna o no. A nivel inmunológico, la administración de WIN 55,212-2 produjo notables alteraciones en función del órgano inmune estudiado, pero consistentes en los dos sexos. En el bazo se observó un aumento en la respuesta linfoproliferativa inducida por un mitógeno, mientras que esta respuesta se vio reducida en los ganglios axilares y en el timo. Estos datos muestran como una única inyección de un agonista cannabinoide en una etapa precoz del desarrollo provoca importantes alteraciones psiconeuroinmunoendocrinas a largo plazo, que varían dependiendo del sexo y en el caso de la función inmune, del órgano estudiado.

Interacciones entre la separación materna y el agonista cannabinoide

Como se ha expuesto anteriormente, en este estudio también nos planteamos investigar el potencial neuroprotector del WIN 55,212-2 en nuestro modelo de la separación materna temprana. A nivel comportamental se observó una importante interacción entre el tratamiento farmacológico y la separación materna. Los machos adolescentes que habían recibido ambos tratamientos, separación materna y administración de WIN 55,212-2, no presentaron ni la reducción en la actividad locomotora y exploratoria inducida por el agonista cannabinoide en el tablero con agujeros, ni el efecto de tipo ansiogénico en el laberinto en cruz elevado. En la prueba de natación forzada la combinación de ambos tratamientos pareció revertir ligeramente el efecto sobre el tiempo de inmovilidad observado en las hembras, mientras que en los machos la combinación de ambos tratamientos pareció acentuar éste efecto de reducción

del tiempo de inmovilidad que provocaba la separación materna *per se*. En cuanto a la función inmune, como ocurría en el anterior caso, se obtuvieron diferentes resultados en función del órgano estudiado. Mientras que en el bazo y los nódulos axilares la interacción de ambos tratamientos se tradujo en un incremento sobre el efecto reductor de la separación materna en la quimiotaxis y en la respuesta linfoproliferativa a mitógeno, respectivamente; en el timo se vio una clara reversión o pérdida de los efectos provocados por cada tratamiento de forma independiente.

Efectos de la separación materna sobre sistemas monoaminérgicos cerebrales durante el desarrollo: edad adolescente.

La adolescencia es un periodo crítico durante el cual el cerebro continúa su crecimiento y desarrollo ya que aún no ha alcanzado la madurez (Giedd, 2008; Romeo, 2003; Spear, 2000). Cabe destacar que áreas cerebrales, tales como el hipocampo y la corteza prefrontal, implicadas en el control emocional y los fenómenos de respuesta a estrés, aún se encuentran en pleno desarrollo (Giedd, 2008; Gogtay *et al.*, 2004; Romeo *et al.*, 2003). Durante este periodo, el sistema nervioso central sufre notables procesos de crecimiento, remodelación (“*pruning*”) sináptica y especialización dendrítica, se produce la reorganización de diversos sistemas de neurotransmisión, y se observan abundantes cambios estructurales y funcionales en los mismos. Numerosos circuitos neuronales, como los relacionados con el control emocional continúan su desarrollo durante la adolescencia (Cunningham *et al.*, 2002), entre ellos los circuitos glutamatérgicos y GABAérgicos así como los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico (Andersen *et al.*, 2000; Carpenter-Hyland y Chandler, 2007; Lidow *et al.*, 1991; Partridge *et al.*, 2000; Schramm *et al.*, 2002; Teicher *et al.*, 1995). En este punto nos centraremos en el desarrollo y maduración de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico que presentan ciertas particularidades en su desarrollo tanto durante el periodo neonatal como durante la adolescencia.

El sistema serotoninérgico en las ratas muestra un desarrollo predominantemente neonatal (Hedner y Lundborg, 1980; Stancheva *et al.*, 1985). Los cuerpos celulares que contienen serotonina (5-HT) están presentes desde el nacimiento, pero van incrementando en número y ramificaciones hasta alcanzar el máximo durante la segunda semana de vida postnatal, esto es, el momento en el cual se aplica nuestro protocolo de separación materna y durante el cual el sistema es presumiblemente más vulnerable. Después de este pico en el desarrollo bioquímico y morfológico del sistema serotoninérgico se observa un lento declive hasta alcanzar durante la pubertad, alrededor de los días 35 y 45 de vida postnatal, los valores que se registran en individuos adultos (D'Amato *et al.*, 1987; Hedner y Lundborg, 1980). Este sistema tiene además importantes funciones tróficas durante el desarrollo, especialmente acciones sobre la

neurogénesis, la sinaptogénesis y la diferenciación neural (Sodhi *et al.*, 2004; Whitaker-Azmitia, 2001; Whitaker-Azmitia *et al.*, 2010), ejerciendo una importante función en el desarrollo dendrítico tanto en el hipocampo como en la corteza (Whitaker-Azmitia, 2001). En resumen, este sistema serotoninérgico no sólo presenta un desarrollo predominantemente neonatal, sino que tiene importantes implicaciones en el desarrollo del sistema nervioso central dado su papel como factor trófico durante el mismo.

El sistema dopaminérgico también presenta un importante desarrollo durante el periodo neonatal. En ratas se ha observado un incremento significativo durante el desarrollo neonatal tanto de los niveles de dopamina como del número de receptores D2 que alcanza sus valores máximos en la adolescencia, alrededor del día 30 de vida postnatal (Bruinink *et al.*, 1983). Tanto los receptores dopaminérgico D2 como los D1 presentan un pico de expresión en el estriado durante la adolescencia, desde el día 28 al 40 de vida postnatal (Tarazi *et al.*, 1998, 1999). A partir del momento de la pubertad el nivel de expresión de estos receptores disminuye hasta alcanzar las cotas registradas en animales adultos [ver (Andersen *et al.*, 2000; Teicher *et al.*, 1995)]. Además, durante la adolescencia este sistema sufre marcados procesos de remodelación, tales como proliferación y maduración de terminales axónicos y formación de sinapsis (Stamford, 1989; Teicher *et al.*, 1995). Algunos autores han sugerido que, durante la adolescencia, los receptores dopaminérgicos podrían ejercer un papel crítico en procesos relacionados con la maduración de determinadas redes neuronales en áreas mesotelencefálicas. En relación al sistema nigroestriatal, se ha observado una menor liberación de DA basal, así como en los niveles de DA almacenada para ser liberada ante la llegada de un estímulo en ratas adolescentes (Stamford, 1989). Sin embargo, las ratas adolescentes presentan un elevado nivel de recaptura de DA cuando son comparadas con animales adultos. En consecuencia, los niveles de DA que alcanza la hendidura sináptica en neuronas del estriado son bajos durante la adolescencia (Andersen y Gazzara, 1993). Las características que presenta el sistema dopaminérgico durante la adolescencia tienen notables implicaciones en el comportamiento de los animales durante este periodo, especialmente en lo que se refiere a la motivación, donde las vías dopaminérgicas procedentes del mesencéfalo y que proyectan a áreas del estriado ventral son cruciales (Ikemoto y Panksepp, 1999; Salamone y Correa, 2002).

Los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico han sido asociados con diferentes trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia (Abi-Dargham, 2007; Guillin *et al.*, 2007; Juckel *et al.*, 2003; Juckel *et al.*, 2008) y la depresión (Lowry *et al.*, 2008; Nemeroff y

Owens, 2009). En el diseño de este experimento tuvimos en cuenta datos previos, tanto comportamentales como farmacológicos, que sugerían que algunos de los efectos de la separación materna temprana podrían estar mediados por alteraciones en estos sistemas (Ellenbroek y Cools, 1995; Ellenbroek *et al.*, 1998). Un episodio de 24h de separación materna, tanto a día 9 como a día 12, provocó alteraciones a nivel del sistema serotoninérgico. En particular, los animales separados neonatalmente de sus madres presentaban mayores niveles de expresión del receptor 5HT1A en la región CA1 hipocampal y de 5HT2A en la corteza frontoparietal 24 horas tras la separación (día 10 y 13 postnatal respectivamente) (Vázquez *et al.*, 2000). Estos datos sugieren que la separación materna, a corto plazo, es capaz de modificar este sistema aún en desarrollo. Del mismo modo, existen datos indirectos que sugieren que la separación materna también afecta al sistema dopaminérgico. Los animales sometidos al protocolo de separación materna, al menos los machos, presentan una mayor susceptibilidad a la acción de fármacos dopaminérgicos como la apomorfina o la anfetamina (Ellenbroek y Cools, 1995; Rots *et al.*, 1996; Zimmerberg y Shartrand, 1992). En estos machos también se ha observado un incremento en la expresión del ARNm para la enzima tiroxina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de dopamina, en la *substancia nigra* (Rots *et al.*, 1996). En conjunto, ambos sistemas, serotoninérgico y dopaminérgico, parecen verse afectados por este protocolo de separación materna temprana, probablemente por la interacción de este episodio de estrés con el desarrollo de los mismos durante el periodo neonatal.

De este modo, en este segundo capítulo, nuestro objetivo consistió en evaluar los posibles efectos de nuestro protocolo de separación materna temprana en los **sistemas de neurotransmisión serotoninérgico y dopaminérgico evaluados en edad adolescente**. Para ello analizamos áreas cerebrales de relevancia para el control motor y emocional, a saber **corteza prefrontal, hipocampo, estriado y mesencéfalo**, en ratas adolescentes de ambos sexos.

Parte de los experimentos donde se encuentran descritos estos resultados están reflejados en el artículo:

Llorente R et al (2010) Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. *Neurosci Lett* 479: 112-7

Publicado on-line: [http://www.sciencedirect.com/science?](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T0G-5046MFG-1&_user=144492&_coverDate=07%2F26%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000012038&_version=1&_urlVersion=0&_userid=144492&md5=01f3525cd30f9577327718d490a682dc&searchtype=a)

[_ob=ArticleURL&_udi=B6T0G-5046MFG-1&_user=144492&_coverDate=07%2F26%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000012038&_version=1&_urlVersion=0&_userid=144492&md5=01f3525cd30f9577327718d490a682dc&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T0G-5046MFG-1&_user=144492&_coverDate=07%2F26%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000012038&_version=1&_urlVersion=0&_userid=144492&md5=01f3525cd30f9577327718d490a682dc&searchtype=a)

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

En este estudio hemos podido comprobar como el episodio de separación materna altera de forma permanente los sistemas neuroquímicos estudiados. Como resultados más relevantes cabe señalar:

1. La separación materna induce un incremento en los niveles de serotonina en corteza prefrontal, hipocampo, estriado, y mesencéfalo de ratas adolescentes machos y hembras de 35 días de edad. No se observaron efectos en cerebelo. Se observaron además cambios en el recambio metabólico en algunas áreas lo que indica que no sólo se vio afectada la liberación de serotonina sino también su tasa de síntesis y degradación.
2. En el caso del sistema dopaminérgico los efectos se encuentran más restringidos viéndose afectadas menos áreas cerebrales. Se observa un incremento de dopamina en la corteza prefrontal y en el estriado, siendo éste último efecto más pronunciado entre los machos. Estos datos demuestran que el sistema dopaminérgico estriatal se ve afectado por la separación materna e indican una mayor vulnerabilidad de los machos a los efectos de la separación materna.

De este modo, hemos demostrado que nuestro protocolo de separación materna temprana produce, en la edad adolescente, importantes alteraciones en la actividad de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico en áreas cerebrales de relevancia para el control motor y emocional, fundamentalmente la corteza prefrontal y el estriado. Además, las alteraciones aquí descritas podrían mediar, al menos en parte, los cambios comportamentales observados en este modelo animal durante la edad adolescente (véase el capítulo anterior).

BLOQUE II. ETAPA NEONATAL

Efectos celulares y bioquímicos de la separación materna en el hipocampo de animales neonatales. Modulación de los efectos de la separación materna por dos inhibidores de la inactivación de endocannabinoides.

En los roedores durante el periodo neonatal se ha descrito un periodo de baja respuesta al estrés (SHRP, del inglés *stress hyporesponsive period*). Este periodo abarca, aproximadamente, desde el día 2 al 14 postnatal y se caracteriza principalmente porque el eje HHA presenta una acusada hipoactividad. Durante este periodo la glándula adrenal de los roedores tiene una sensibilidad muy reducida a la ACTH, y los animales tienen unos niveles plasmáticos de corticosterona y ACTH extremadamente bajos si los comparamos con los que presentan animales adolescentes o ya adultos. Es más, fenómenos estresantes que provocarían un aumento significativo en los niveles de corticosterona en animales adultos, apenas provocan una activación de este sistema en los animales neonatos (de Kloet *et al.*, 1996; Levine, 1994, 2000). Parece ser que el mantenimiento de este estado de baja respuesta al estrés tiene que ver con factores endógenos (endocrinos y neurales) y exógenos (maternos), como se ha demostrado en estudios que alteran la relación madre-cría (de Kloet *et al.*, 1998; Levine, 2000). En algunos primates no humanos, e incluso en humanos, también se han descrito niveles de corticosterona y ACTH reducidos durante los primeros momentos del desarrollo, aunque no es comparable al SHRP descrito en roedores (Pryce *et al.*, 2002).

La existencia de este periodo parece, al menos en los roedores, tener una función de carácter protector (Huot *et al.*, 2002; Levine, 1994, 2005). El efecto deletéreo que tienen los glucocorticoides sobre la viabilidad celular, la sinaptogénesis, la morfogénesis, el aumento del estrés oxidativo, etc., ha sido ampliamente estudiado [ver para revisión (de Kloet *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2003; Sapolsky *et al.*, 1988; Viveros *et al.*, 2009)]. Durante el periodo del SHRP se produce, por ejemplo, la maduración y el establecimiento de las diferentes conexiones entre muchos sistemas neuronales, entre los que se encuentran el eje HHA (Levine, 1994), y es el periodo en el que ocurre el pico máximo de neurogénesis y crecimiento de las fibras musgosas que provienen de las células granulares del Giro Dentado del hipocampo (Huot *et al.*, 2002),

entre otros. Por lo que el establecimiento y mantenimiento de unos bajos niveles de glucocorticoides cuando mayor es la frecuencia de eventos relacionados con la neurogénesis y la sinaptogénesis, protege y facilita la consecución de estos procesos esenciales para la correcta maduración del sistema nervioso. Si se tiene en cuenta lo anterior, cualquier tipo de tratamiento o manipulación que provoque una elevación de los niveles de glucocorticoides durante el SHRP puede tener consecuencias perjudiciales.

Se ha demostrado que la separación materna neonatal durante 24 horas es un tipo de manipulación capaz de provocar un significativo aumento de los glucocorticoides (Suchecki *et al.*, 1993; Viveros *et al.*, 2010a), y los efectos neurodegenerativos de este aumento pueden formar parte del origen de las alteraciones observadas, tanto a corto como a largo plazo, en los animales sometidos a separación materna, evidenciando la validez de este modelo en el marco de la hipótesis del neurodesarrollo.

El hipocampo es un área cerebral con una elevada densidad de receptores para glucocorticoides, GR (receptor glucocorticoide) y MR (receptor mineralocorticoide) y por lo tanto, es particularmente sensible a las alteraciones en los niveles de estas hormonas (Gould, 1994; Sapolsky *et al.*, 1988; Suchecki *et al.*, 1993). Por ello se puede considerar una región de gran interés para estudiar los efectos que pueden provocar el incremento de los niveles de glucocorticoides como consecuencia del protocolo de separación materna. Otros autores usando un modelo de separación materna similar al nuestro observaron a largo plazo, que los animales sometidos a separación muestran un descenso en los niveles hipocampales de la molécula de adhesión celular polisializada (PSA-NCAM, *polysialylated-neural cell adhesion molecule*), y del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic-factor*), así como una reducción en los niveles de ARN mensajero para las subunidades NR-2A y NR-2B del receptor glutamatérgico de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Ellenbroek, 2003; Roceri *et al.*, 2002). Estos cambios sugieren una pérdida de plasticidad sináptica y una hipofuncionalidad del sistema glutamatérgico, que son considerados como alteraciones presentes en enfermos esquizofrénicos [ver revisión de (Ellenbroek *et al.*, 2004; Ellenbroek y Riva, 2003)]. A corto plazo también han sido descritas alteraciones causadas por la separación materna en esta estructura. Por ejemplo, empleando un modelo de separación entre los días 11 y 12 postnatal, se analizaron en ciertas áreas cerebrales las consecuencias del protocolo nada más finalizar éste (día 12 postnatal), observándose un aumento de la apoptosis celular en el hipocampo, así como un

aumento de factores proapoptóticos en otras áreas cerebrales, como la corteza frontal (Zhang *et al.*, 2002a).

Las células de glía desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la función cerebral, y está demostrada su implicación en diversas patologías neurológicas y psiquiátricas, incluida la esquizofrenia (Kondziella *et al.*, 2007; Perea y Araque, 2005; Rajkowska y Miguel-Hidalgo, 2007). Los astrocitos realizan importantes funciones homeostáticas, tanto en lo que respecta al equilibrio iónico, como en lo referente al metabolismo de neurotransmisores y la homeostasis metabólica en el cerebro, de hecho, las alteraciones en la funcionalidad de estas células o en el equilibrio neurona-glía, pueden tener graves consecuencias para el correcto desarrollo del sistema nervioso. En numerosos estudios se ha demostrado que cambios en el número o morfología de las células gliales (gliosis reactiva) están relacionadas con respuestas frente a fenómenos de neurotoxicidad, inflamación o dolor crónico. Recientemente se ha sugerido que estos cambios podrían al menos en parte ejercer una función neuroprotectora, beneficiosa (Sofroniew, 2009). Si la separación materna es capaz de provocar alteraciones deletéreas sobre el sistema nervioso, más concretamente en el hipocampo, no sería extraño esperar que las células de glía estuviesen afectadas, y por lo tanto resulta muy interesante su estudio en este modelo de estrés neonatal.

El sistema endocannabinoide está implicado en el desarrollo cerebral, en concreto en la proliferación celular, la migración neuronal, la elongación axonal y la sinaptogénesis (Berghuis *et al.*, 2007; Harkany *et al.*, 2007). La señalización retrógrada mediada por el sistema endocannabinoide parece ser responsable en el hipocampo inmaduro del control homeostático de la transmisión sináptica, y de los patrones de sinaptogénesis que se establecen (Bernard *et al.*, 2005). El sistema endocannabinoide es un importante sistema regulador, que actúa como un tampón frente a la respuesta al estrés (Viveros *et al.*, 2007), mediando incluso en el mecanismo de autorregulación del eje HHA por parte de los glucocorticoides (Cota, 2008). Este sistema parece tener un papel neuroprotector en determinadas circunstancias, así, en algunos modelos de neurotoxicidad se produce, invariablemente, un aumento en los niveles de anandamida (AEA) y en ratones a los que genéticamente se les ha eliminado el receptor CB1 después de someterlos a isquemia o a excitotoxicidad elevada, se han observado daños mayores y más severos que en los ratones normales. Otros trabajos en los que se

incrementó el nivel de endocannabinoides usando un inhibidor del transportador de endocannabinoides, el AM404, se redujo el daño neuronal causado por la oclusión bilateral de la arteria carótida, y esta reducción estuvo mediada por el receptor CB1 (Bahr *et al.*, 2006; van der Stelt y Di Marzo, 2005; Zani *et al.*, 2007). En conjunto, las anteriores evidencias sugieren que el tono endocannabinoide puede estar aumentado como un mecanismo homeostático neuroprotector para contrarrestar diversos tipos de daños o alteraciones que puedan sufrir las células del sistema nervioso. Puesto que la separación materna representa un claro estrés en una etapa crítica del sistema nervioso, durante la cual el sistema endocannabinoide también está en pleno desarrollo y juega un papel en la propia maduración del sistema nervioso central. Nos pareció interesante abordar el estudio de interacciones entre separación materna y sistema endocannabinoide abordando este análisis desde diferentes aproximaciones experimentales. Las respuestas alteradas de los animales separados de la madre al agonista cannabinoide WIN 55,212-2, abonaba también nuestra hipótesis de que la separación materna podría interactuar de manera importante con el desarrollo del sistema endocannabinoide.

En el capítulo 1, se ha descrito una interacción entre la separación materna y la administración de un fármaco cannabinoide (WIN 55,212-2) justo después de su finalización (día 10 postnatal), pero también se ha observado que, *per se*, ese tratamiento tiene consecuencias adversas a largo plazo. En otro trabajo en el que se realizó un protocolo de separación materna neonatal y un tratamiento posterior, durante la adolescencia, con un fármaco cannabinoide, el URB597 (inhibidor de la enzima responsable de la hidrólisis de la anandamida), se demostró como, de forma dosis-dependiente, el aumento del tono endógeno cannabinoide provoca una reversión de los efectos comportamentales inducidos por la separación materna (Marco *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta los anteriores resultados, decidimos buscar una aproximación más fisiológica durante la etapa neonatal que la del empleo del agonista directo, para lo cual, en este experimento se ha trabajado con dos compuestos moduladores del tono endocannabinoide: la araquidonoilserotonina (AA-5-HT) que es un inhibidor de una de las enzimas responsables de la degradación de los cannabinoides endógenos, la hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*), y el OMDM-2, que es un inhibidor del transportador de endocannabinoides, con el objetivo de conseguir un aumento en los niveles de endocannabinoides.

Los principales objetivos de este capítulo fueron investigar los **efectos a corto plazo de la separación materna sobre las células de glía hipocampales**, tratando de establecer una relación entre los cambios celulares y los niveles plasmáticos de **corticosterona**. Estudiar el efecto de la separación materna sobre **el sistema cannabinoide endógeno, evaluando los niveles de endocannabinoides endógenos (2-AG y AEA)**. Estudiar la posible modulación de los efectos de la separación materna por **el incremento del tono endocannabinoide por dos tipos de fármacos diferentes (inhibidores de la inactivación de los endocannabinoides)**. Como en los anteriores capítulos prestamos especial atención a las diferencias sexuales que pudiéramos encontrar.

Parte de los experimentos donde se encuentran descritos estos resultados están reflejados en el artículo:
Llorente R et al (2008) Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: A possible role for the endocannabinoid system. *Dev Neurobiol* 68: 1334-4
Publicado on-line: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dneu.20666/abstract?sessionid=7A13D78EA912556DB7D5E4E42AAFCF9B.d03t03>

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

Con este trabajo se ha demostrado por primera vez que el modelo de separación materna utilizado en la presente Tesis Doctoral puede provocar alteraciones a corto plazo (3 días después) tanto celulares como neuroquímicas (afectación del sistema endocannabinoide) en el hipocampo.

Respecto a los cambios celulares, en el hipocampo de los machos separados se encontró un aumento del número de células de glía marcadas con GFAP (proteína glial fibrilar ácida). Este efecto es revertido por el tratamiento farmacológico, siendo más eficaz la acción del inhibidor del transportador (OMDM-2) que el de la enzima responsable de la degradación de los endocannabinoides (AA-5-HT), lo cual demuestra la interacción entre la separación materna y el sistema cannabinoide endógeno. El protocolo de estrés neonatal también provocó un aumento en los machos separados del agonista endocannabinoide 2-AG.

El aumento del número de células gliales marcadas con GFAP y el 2-AG están acompañados por un incremento en los niveles de corticosterona en estos machos separados, mientras que en los que además habían sido tratados con los fármacos no se observaba este aumento en el nivel de corticosterona circulante. En las hembras, la separación materna sólo provocó un aumento en los niveles de corticosterona circulante que también se vio revertido por el tratamiento farmacológico, pero no se han encontrado alteraciones gliales, ni en el sistema endocannabinoide.

Los fármacos *per se* (en los animales no separados) también tuvieron efectos dependientes del sexo. En los machos provocan un aumento en los niveles de corticosterona circulante, mientras que en las hembras inducen una reducción, especialmente en las tratadas con AA-5-HT. Ambos fármacos tuvieron también efectos celulares en las hembras, ya que reducen significativamente el número de células gliales GFAP+ en el hipocampo. Respecto al nivel de endocannabinoides ambos fármacos *per se* indujeron un aumento en los niveles de anandamida en los machos no separados.

Las diferencias encontradas en el número de células de glía GFAP+ entre machos y hembras control revelan ya diferencias sexuales de base a edades neonatales,

es decir, durante el desarrollo, presentando las hembras no separadas de forma basal mayor número de células GFAP+ que los machos del mismo grupo experimental.

En conclusión, hemos hallado pruebas concluyentes de que la separación materna provoca cambios sobre los niveles circulantes de corticosterona, los cuales se mantienen durante cierto tiempo (al menos 3 días después de finalizar el tratamiento), pudiéndose establecer una relación entre el incremento de glucocorticoides y la aparición de cambios que afectan al neurodesarrollo, como el aumento en el número de las células gliales GFAP +. Se ha demostrado también el efecto que ejerce este tipo de estrés neonatal sobre los niveles de endocannabinoides hipocampales. Los cambios inducidos por la separación materna tanto a nivel celular (número de células GFAP +) como sobre los niveles de corticosterona fueron contrarrestados mediante la administración de fármacos que elevan el tono endocannabinoide. Por último, es importante señalar las diferencias sexuales encontradas tanto a nivel basal (entre animales controles) como en cuanto a la respuesta a los fármacos y a la separación materna.

Efectos de la separación materna sobre neuronas y células gliales en hipocampo y cerebelo, así como sobre los niveles circulantes de leptina y ACTH durante el desarrollo.

En el anterior capítulo hemos descrito cómo un protocolo de separación materna durante 24 horas en edad neonatal (día 9 postnatal) producía efectos sólo tres días después en el hipocampo a nivel celular (aumento de células GFAP+) y bioquímico (aumento del nivel de los endocannabinoides). Hay que tener en cuenta que todos los cambios anteriormente descritos son consecuencia de un diseño experimental que conlleva una manipulación mayor que el simple hecho de separar las crías de la madre, pues se realizaron inyecciones subcutáneas diarias (desde el día 7 al 12 postnatal) de fármaco o vehículo (ver capítulo 3). Esto implica que los resultados obtenidos no puedan ser considerados como un efecto exclusivo de la separación materna, aunque todos los animales han tenido la misma manipulación. Por ello, para confirmar los efectos *per se* de la separación materna neonatal planteamos un experimento que no implicara la administración de inyecciones de forma que el efecto de la separación materna pudiera interpretarse de forma más clara.

El cerebelo muestra un nivel de receptores para glucocorticoides elevado durante el desarrollo, superando incluso al que presenta el hipocampo (Lawson *et al.*, 1992; Pavlik y Buresova, 1984) y podría ser, por lo tanto, una región muy sensible a la elevación de los niveles de estas hormonas (McEwen, 1999; Sapolsky *et al.*, 1988). Esta estructura, a parte de su conocida implicación en la coordinación motora, desempeña un importante papel en funciones corticales superiores y hay estudios que indican que puede estar involucrado en desórdenes neuropsiquiátricos relacionados con el neurodesarrollo, tales como el autismo y la esquizofrenia (Baldaçara *et al.*, 2008; Fatemi *et al.*, 2008). Por lo tanto, si la separación materna es considerada como un modelo animal para el estudio de ciertos aspectos de enfermedades neuropsiquiátricas, y hemos demostrado como nuestro modelo induce un aumento de glucocorticoides circulantes (capítulo 3), el análisis de las posibles alteraciones a nivel cerebelar asociadas con este procedimiento estresante podría aportar nuevos datos sobre la implicación del cerebelo en este tipo de desórdenes. Experimentos de nuestro grupo, así

como de otros investigadores, muestran algunas alteraciones comportamentales en ratas sometidas a separación materna, tanto cuando son estudiadas durante el periodo adolescente como cuando lo son en un periodo más juvenil, que sugieren un posible retraso en el desarrollo de la coordinación motora dependiente de la actividad cerebelar inducido por la separación materna [ver capítulo 1 de esta Tesis Doctoral y (Ellenbroek *et al.*, 2005)]. A corto plazo hemos demostrado un efecto directo de este protocolo de separación materna sobre el cerebelo, donde, de forma similar a lo que sucedía en el hipocampo, aumentaba el número de células GFAP+ en machos separados, y el aumento se revertía gracias a la acción de los fármacos inhibidores de la inactivación de los endocannabinoides (López-Gallardo *et al.*, 2008). En este estudio también analizamos si los diferentes tratamientos provocaban algún tipo de efecto sobre la muerte o degeneración neuronal. Empleamos un protocolo inmunohistoquímico de fluorescencia que nos permitía ver las células en proceso de degeneración, el método del Fluoro-jade-C (Fj-C) (Schmued *et al.*, 2005). Demostramos que la separación materna inducía en los machos un incremento en células marcadas con Fj-C y, por lo tanto, en degeneración, que era revertido por el tratamiento farmacológico. Con métodos de doble tinción demostramos que las células Fj-C+ eran neuronas y no células de glía (López-Gallardo *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta todo lo anterior decidimos estudiar el efecto de la separación materna *per se*, sin ningún otro tipo de manipulación asociada, sobre el hipocampo y el cerebelo, analizando los cambios tanto de células de glía (marcadas con GFAP), como en los niveles de células en degeneración (marcadas con Fj-C).

Es importante considerar que durante la separación materna, además de la falta de la atención materna respecto a la limpieza de las crías y a la ausencia de un mecanismo eficiente para el mantenimiento del calor corporal, también existe un periodo de 24 horas de restricción de leche materna. La carencia de alimentos durante este periodo parece ser la responsable del descenso de peso que se ha detectado en estos animales separados comparados con los controles (ver capítulo 1). Sin embargo, el mantenimiento de este bajo nivel de masa corporal hasta estadios más avanzados del desarrollo, sugiere que puede no ser sólo debido a la restricción de leche materna durante esas 24 horas, sino que puede contribuir a ello alteraciones en la relación crías-madre durante el periodo posterior a la separación y/o cambios a nivel del control

metabólico del peso y la ingesta de estos animales, existiendo alteraciones en la modulación de la homeostasis del balance energético.

La leptina es una hormona que se produce sobre todo en el tejido adiposo, y es muy importante para la regulación central del balance energético (Coll *et al.*, 2007). Esta hormona, además de su papel metabólico, tiene implicaciones adicionales a nivel fisiológico (Robertson *et al.*, 2008). Los receptores de la leptina están presentes en el hipotálamo, donde interviene en el control del balance energético, y en otras áreas cerebrales, entre ellas en el hipocampo y el cerebelo (Elmqvist *et al.*, 1998; Shanley *et al.*, 2002), lo cual apoya la idea de que la leptina puede ejercer otras acciones en el sistema nervioso central. También existen evidencias aportadas, tanto por experimentos en modelos animales como por ensayos clínicos en humanos, del papel que podría desempeñar la leptina modulando reacciones inmunes (Fantuzzi, 2008), de hecho, se han descrito alteraciones en los niveles de esta hormona, entre otras, en enfermedades auto-inmunes, en la susceptibilidad a infecciones y en el correcto funcionamiento de las respuestas inmunes mediadas por células. Se ha llegado a proponer que la leptina sea el “conector perdido” (del inglés, *missing link*), entre la respuesta inmune, la función metabólica, y el estatus nutricional (Farooqi *et al.*, 2002; La Cava y Matarese, 2004; Matarese *et al.*, 2008). En los últimos años también se acepta que la leptina tiene un papel neuroprotector (Tang, 2008), por ejemplo, protegiendo a las neuronas hipocampales frente a la ausencia en el medio de factores de crecimiento, y protegiéndolos de los daños provocados por excitotoxicidad y estrés oxidativo (Guo *et al.*, 2008). Por último, es importante destacar la implicación de esta molécula en el desarrollo neuronal como se ha demostrado en ratones obesos con defectos en el gen de la leptina, los cuales presentan importantes alteraciones en el desarrollo cerebral (Ahima *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta la alteración nutricional que sufren los animales separados durante 24 horas, los efectos encontrados en el sistema inmune (ver capítulo 1) y los efectos celulares encontrados en el hipocampo y en el cerebelo, consideramos importante averiguar como este fenómeno de estrés neonatal *per se* afectaría a los niveles de la leptina.

En los diferentes experimentos presentados en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que la separación materna provoca alteraciones en los niveles de corticosterona a corto plazo [ver capítulo 4 y (Viveros *et al.*, 2010a)] y a largo plazo (capítulo 1). Otros autores han observado que el eje HHA, responsable de la liberación

de glucocorticoides ante situaciones de estrés, también se ve afectado por este protocolo de separación materna, existiendo una deficiente autorregulación. Se ha demostrado que esta alteración funcional del eje está mediada, al menos en parte, por una expresión genética alterada de ciertos elementos del mismo. La separación materna provoca una reducción en la expresión de los receptores para glucocorticoides GR, y el factor liberador de corticotropina (CRF, *corticotropin releasing factor*) en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), así como en el hipocampo. El CRF liberado desde el PVN es el responsable de la activación del eje frente al estrés (activando la liberación de ACTH desde la hipófisis), y el GR, tanto en el PVN como en el hipocampo, es responsable de los procesos de retroalimentación negativa para su detención (Schmidt *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2006; Suchecki *et al.*, 1993; Suchecki y Tufik, 1997; van Oers *et al.*, 1997, 1999; van Oers *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta lo anterior, consideramos importante estudiar si el efecto observado en la modificación de los niveles de corticosterona debido a la separación materna tenía también consecuencias sobre estructuras superiores en el eje, y decidimos analizar niveles de ACTH, que es la hormona responsable de la liberación de corticosterona. Si los niveles de ésta se encuentran elevados debido a la separación materna, nos indicaría una hiperactividad del eje todavía dentro del periodo SHRP (este termina alrededor del día 14 postnatal), y un problema de autorregulación, ya que estaría fallando la inhibición del eje que deberían estar provocando los glucocorticoides.

Por lo tanto, los principales objetivos de los experimentos recogidos en este capítulo fueron estudiar los **efectos del protocolo de separación materna *per se*** y a corto plazo (PN 13), **sobre hipocampo y cerebelo así como sobre los niveles de leptina y ACTH**. Como se ha hecho en los anteriores capítulos prestamos especial atención a las posibles diferencias que puedan existir entre machos y hembras.

Parte de los experimentos donde se encuentran descritos estos resultados están reflejados en el artículo:

Llorente R et al (2009) Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. **Int J Dev Neurosci** 27: 233-41.

Publicado on-line: [http://www.sciencedirect.com/science?](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T01-4VDS8D7-2&_user=144492&_coverDate=05%2F31%2F2009&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000012038&_version=1&_urlVersion=0&_userid=144492&md5=890fa816d87268eff91e1c7115a66e50&searchtype=a)

[_ob=ArticleURL&_udi=B6T01-4VDS8D7-2&_user=144492&_coverDate=05%2F31%2F2009&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000012038&_version=1&_urlVersion=0&_userid=144492&md5=890fa816d87268eff91e1c7115a66e50&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T01-4VDS8D7-2&_user=144492&_coverDate=05%2F31%2F2009&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000012038&_version=1&_urlVersion=0&_userid=144492&md5=890fa816d87268eff91e1c7115a66e50&searchtype=a)

Effects of maternal deprivation on leptin and ACTH levels

Data reported bellow were included, as original findings, in the review article by Viveros et al., 2009. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S217-26. Please find the complete version of this review article in the “ANEXO I” of this present Doctoral Thesis.

Efectos de la separación materna sobre la leptina y los niveles de ACTH

Los datos aquí descritos se incluyeron, como datos originales, en el artículo de revisión: Viveros M.P. et al. 2009. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S217-26 que aparece completo en el ANEXO I de la presente Tesis Doctoral.

Abstract

We review here our latest results regarding short- and long-term effects of a neonatal maternal deprivation (MD) stress [24 h at postnatal day (PND) 9] on diverse psychoneuroimmunoendocrine parameters, pointing out the existence of numerous sexual dimorphisms. Behavioral changes observed in MD animals might be at least in part attributable to neurodevelopmental effects of MD-induced elevated corticosterone levels. Our findings of short-term effects of MD on hippocampal and cerebellar neurons and glial cells appear to support this hypothesis. However, it is important to note that these cellular effects were more marked in males than in females. Moreover, in analyzing the effects of this neonatal stress on the endocannabinoid system (hippocampal endocannabinoid levels and CB1 receptors) we have also found that males were more affected by MD. Since all these sexual dimorphisms were found at an early neonatal age (PND 13), they are attributable to organizational effects of gonadal steroids. We discuss the potential implications of the elevated corticosterone and decreased leptin levels shown by MD animals in their diverse functional alterations, including the above mentioned neural effects as well as the intriguing persistent deficit in their immunological system. We also emphasize the necessity of analyzing the important influence of sex as regards the specific consequences of early life stress.

Material & Methods

The experiments performed in this study were approved by our institutional committee and are in compliance with the Royal Decree 1201/2005, October 21, 2005

(BOE n° 252) on protection of experimental animals, as well as with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Animals

Albino *Wistar* rats of both sexes were used. Experimental subjects were the offspring of rats purchased from Harlan Laboratories S.L. (Barcelona, Spain) that were mated (one male x two females) in our animal facilities approximately 2 weeks after their arrival. All animals were maintained at a constant temperature (22 ± 1 °C) and humidity ($50 \pm 1\%$) in a reverse 12-h dark-light cycle (lights on at 20:00 h), with free access to food (commercial diet for rodents A04/A03; Panlab, Barcelona, Spain) and water.

On the day of birth (postnatal day, PND 0), litters were sex-balanced, weighed and culled to 8 pups (4 males and 4 females) per dam. The litters were randomly assigned to the different experimental groups: control or maternal deprived rat pups. On PND 9 Maternal deprivation took place. In brief, mothers from the deprived groups were removed from their offspring early in the morning of PND 9 (beginning at 09:00h). Pups were weighed and remained undisturbed without the dam in their home-cage for 24 hours (in the same animal room). On PND 10 pups were weighed again and the corresponding dam was returned back to the corresponding home-cage. Mothers from the control groups were briefly removed from their home cages on PND 9 and PND 10 and pups weighed.

At PND 13 (n= 8-10 per experimental group), the animals were sacrificed and blood samples obtained and centrifuged (3000 rpm for 15 min) for plasma collection. ACTH and leptin levels were measured by ELISA. In all experimental groups, rats of at least three litters were used in order to reduce litter effect.

Results

The two-way ANOVA (factors being sex and neonatal treatment) revealed an overall effect of MD on ACTH circulating levels [$F(1,31) = 5.49$, $P < 0.05$]. MD induced a significant increase in ACTH levels in both males and females, being this effect more evident in males (Fig. 8a, upper panel). Similarly, the ANOVA rendered a significant overall effect of MD on leptin levels [$F(1,31) = 41.34$, $P < 0.001$]. MD reduced plasma leptin levels in both sexes (Fig. 8b, bottom panel).

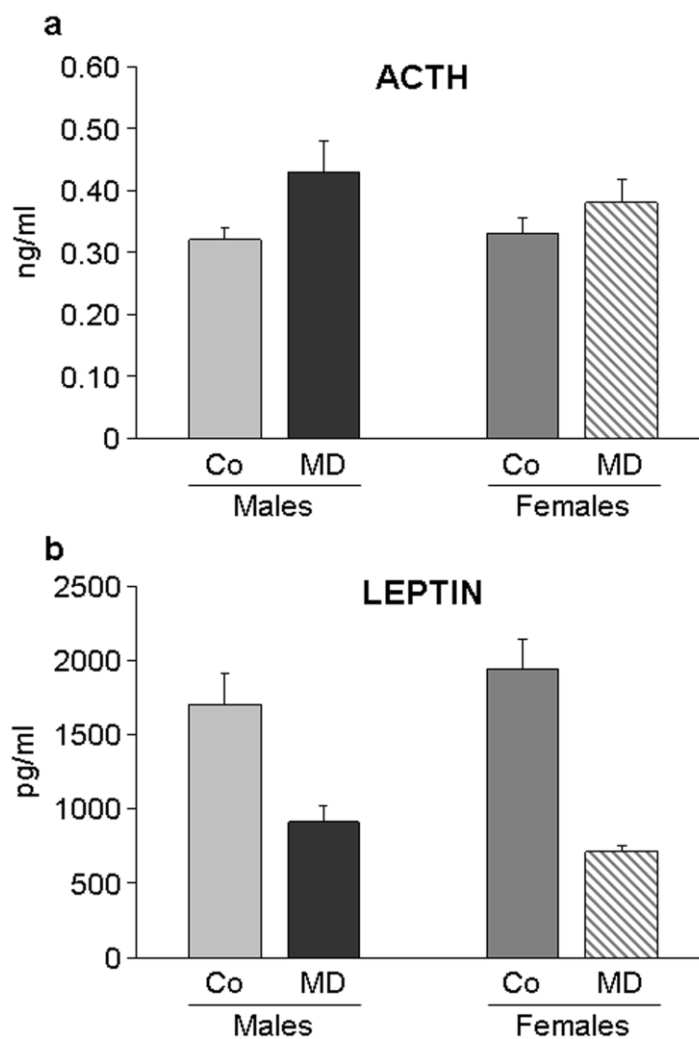


Figure 8. Effects of early maternal deprivation (MD, 24h, PND 9-10) on the plasmatic levels of ACTH and leptin on rat pups of 13 days old. Histograms represent the mean \pm S.E.M. of ACTH (a) and leptin (b) levels. N = 8-10 animals per experimental group.

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

Con estos trabajos demostramos la existencia de efectos a corto plazo de la separación materna *per se*, tanto a nivel celular en hipocampo y cerebelo como en lo que se refiere a los niveles circulantes de ACTH y leptina. Estos resultados confirmaban hallazgos previos del presente trabajo de Tesis, clarificándolos, y aportaban información adicional relevante para la interpretación de los mismos.

A nivel celular hay un mayor número de células marcadas con Fluoro-jade-C (Fj-C) en el Asta de Ammon y en el Giro Dentado, tanto en machos como en hembras separados, lo que sugiere un aumento de células en degeneración (Schmued et al., 2005) debido al estrés neonatal provocado por la separación materna. En la corteza cerebelar los machos separados también mostraron un aumento del número de células marcadas con Fj-C, pero sin llegar a alcanzar la significación estadística. El estudio de co-localización del Fj-C con el marcador neuronal NeuN y el marcador glial GFAP, reveló además que las células marcadas con Fj-C eran siempre células NeuN positivas y nunca células GFAP positivas.

La separación materna también provocó un aumento del número de células GFAP+ en las áreas hipocampales CA1 y CA3 en machos y en el Giro Dentado en ambos sexos. El número de células GFAP + en la capa granular interna y la sustancia blanca del cerebelo de los machos separados aumentó, mientras que en las hembras separadas no hubo efecto o fue el opuesto, indicando una vez más diferencias sexuales en las acciones de la separación materna. Estas diferencias parecen indicar una menor susceptibilidad de las hembras a los efectos deletéreos del estrés neonatal, aunque puede tener relación con un diferente estado de desarrollo del hipocampo y el cerebelo de los machos y las hembras en el día 13 postnatal.

Es interesante destacar que existen diferencias entre machos y hembras no separados en el número de células de glía marcadas con GFAP (lo cual fue ya descrito en el experimento del capítulo 3), tanto en el hipocampo como en el cerebelo, así como en el número de células marcadas con Fj-C en el hipocampo, indicando, de nuevo, posibles diferencias en el grado de desarrollo del sistema nervioso de ambos sexos.

A nivel endocrino se ha encontrado una disminución en los niveles plasmáticos de leptina a PND 13 (ver figura 8 perteneciente al anexo 2 de la presente Tesis Doctoral), tanto en machos como en hembras separadas 24 horas de la madre, dejando constancia de que el efecto de esta manipulación se extiende a un sistema de control del balance energético relacionado con otra serie de funciones fisiológicas.

Respecto al eje HHA se produce un aumento de los niveles de ACTH en los animales que han sido separados, que es más evidente en los machos que en las hembras.

En conclusión, la separación materna *per se* (sin ningún tipo de manipulación más asociada) provoca alteraciones neuronales y gliales que dependen del sexo del animal, tanto en el hipocampo como en el cerebelo y que, generalmente, son más notables en los machos. Asociados a estos cambios se observan alteraciones en los niveles de la leptina (que es una molécula muy importante en el control del balance energético, y desempeña papeles destacados durante el desarrollo del sistema nervioso central y del sistema inmune). También existen cambios en el eje HHA referidos a los niveles de ACTH, reforzando la idea de una alteración profunda de eje HHA y su regulación debido a este protocolo de estrés neonatal.

Efectos de la separación materna en animales neonatales sobre los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ y sobre las enzimas implicadas en el metabolismo de los endocannabinoides, en el hipocampo en desarrollo.

En los capítulos 1 y 3 hemos demostrado la existencia de una interacción importante entre los efectos de la separación materna y el sistema endocannabinoide por lo que consideramos esencial profundizar en el estudio de los efectos que este protocolo experimental tiene sobre el sistema cannabinoide endógeno.

El sistema endocannabinoide, como ya indicamos, desempeña un papel muy importante durante el desarrollo cerebral, en procesos tales como la proliferación de los progenitores neurales, la segregación de los diferentes linajes celulares, la migración y la especificación fenotípica de neuronas inmaduras, la elongación axonal y la sinaptogénesis [ver (Berghuis *et al.*, 2007; Fernández-Ruiz *et al.*, 2000; Harkany *et al.*, 2008)]. La señalización retrograda en la que está implicado este sistema parece ser responsable del control de la homeostasis de la transmisión sináptica entre las células inmaduras hipocampales (Bernard *et al.*, 2005). La mayoría de los estudios sobre esta función del sistema endocannabinoide se han centrado en el receptor cannabinoide de tipo 1 (CB1). El receptor CB2 se ha asociado siempre a tejidos periféricos y tradicionalmente se pensaba que, en condiciones fisiológicas normales, no se encontraba en tejido cerebral. Sin embargo, recientes datos inmunohistoquímicos y moleculares han demostrado la existencia del receptor CB2 en procesos neuronales y gliales de roedores adultos en condiciones normales (Brusco *et al.*, 2008; Onaivi y Hari Shanker, 2009; Onaivi *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2008; Van Sickle *et al.*, 2005). Por lo tanto, ambos receptores, CB1 y CB2, podrían mediar las diferentes acciones del sistema cannabinoide en el sistema nervioso central, incluidas aquellas relacionadas con la maduración y migración neuronal.

Existen evidencias que indican la importancia del sistema cannabinoide en ciertos trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, o en alteraciones relacionadas

con la ansiedad o la depresión. En pacientes esquizofrénicos se ha observado un incremento en la expresión tanto del receptor cannabinoide de tipo 1 (CB1) en la corteza prefrontal (Dean *et al.*, 2001) y la corteza cingulada (Zavitsanou *et al.*, 2004), como de los niveles de endocannabinoides, como la anandamida (Giuffrida *et al.*, 2004; Leweke *et al.*, 2007; Leweke *et al.*, 1999). En individuos que son consumidores habituales de cannabis también se ha descrito un aumento del riesgo de padecer ataques psicóticos y esquizofrenia [para más detalles consultar (Di Forti *et al.*, 2007; Leweke y Koethe, 2008)], remarcando la importancia de este sistema en estas alteraciones. Su implicación en desórdenes como la ansiedad también ha sido ampliamente estudiada [ver para más detalles (Crippa *et al.*, 2009; van der Stelt y Di Marzo, 2003; Viveros *et al.*, 2005b)], por ejemplo, en la amígdala los endocannabinoides son los responsables de la extinción de recuerdos de tipo adverso como se ha demostrado en modelos animales de miedo condicionado, ya que tanto el bloqueo genético (ratones *knock out*) como farmacológico del receptor CB1 impide la extinción de la memoria provocada previamente por algún fenómeno adverso o traumático (Marsicano *et al.*, 2002). En otros modelos, el incremento del tono endógeno cannabinoide, a través del bloqueo de su inactivación, da como resultado comportamientos de tipo ansiolítico en la prueba del laberinto en cruz elevado, confirmando la importancia de este sistema en los trastornos relacionados con la ansiedad [ver para revisión (Lafenetre *et al.*, 2007)]. En cuanto a la depresión, existen también evidencias de la implicación de este sistema (Hill y Gorzalka, 2005, 2009; Onaivi y Hari Shanker, 2009), así en cerebros de pacientes que sufrían depresión y que fueron analizados después de que estos se suicidaran, se han descrito incrementos en la densidad de receptores CB1 en la corteza prefrontal (Hungund *et al.*, 2004). También se considera que la depresión puede ser debida en parte a una deficiencia en la actividad endocannabinoide y se ha demostrado, en modelos animales, que su incremento tiene efectos antidepresivos (Hill y Gorzalka, 2005). En un modelo de depresión basado en un protocolo de estrés crónico impredecible (CUS/CMS, *chronic unpredictable stress*) se ha observado una reducción de AEA en varias estructuras cerebrales, tales como el hipocampo, corteza frontal, hipotálamo, estriado ventral, amígdala y mesencéfalo (Hill *et al.*, 2008a) relacionadas con el comportamiento emocional, la ansiedad y la motivación.

El sistema endocannabinoide interviene como modulador de una gran cantidad de sistemas de neurotransmisión y en algunos sistemas endocrinos, por ejemplo, ejerce una papel en la regulación de la respuesta al estrés (Cota, 2008) y está demostrado que

el nivel de glucocorticoides circulantes controla tanto la expresión de receptores cannabinoides en el cerebro (Mailleux y Vanderhaeghen, 1993), como la liberación de endocannabinoides (Cota, 2008). Se ha demostrado que el protocolo de separación materna empleado provoca el aumento de los niveles de glucocorticoides (Viveros *et al.*, 2010a) y que este incremento se mantiene al menos 3 días después, así como que este aumento va acompañando de unos niveles elevados de ACTH que sugieren una regulación alterada del eje HHA (capítulos 3 y 4), por todo ello parece lógico pensar que este modelo de estrés neonatal pueda estar afectando al sistema endocannabinoide. Una primera prueba de ello la obtuvimos en el experimento presentado en el capítulo 3 de la presente Tesis Doctoral, en el que observamos un aumento de los niveles de corticosterona acompañado de un aumento en el hipocampo de los niveles del endocannabinoide 2-AG, tres días después de la aplicación de este protocolo de separación materna. Decidimos profundizar más en el análisis y nos planteamos estudiar en el hipocampo los posibles efectos que la separación materna tiene sobre algunos componentes del sistema cannabinoide endógeno, tales como los receptores cannabinoides CB1 y CB2 y las enzimas responsables de la síntesis del endocannabinoide 2-AG, la diacilglicerol lipasa (DAGL) α y β , así como de su destrucción, la monoacilglicerol lipasa (MAGL).

El principal objetivo de los experimentos correspondientes a este capítulo fue estudiar **el efecto de la separación materna *per se* a corto plazo sobre diversos componentes del sistema endocannabinoide en el hipocampo**, tanto sobre la distribución de sus **receptores**, como sobre los **sistemas enzimáticos asociados a la síntesis y degradación** del 2-AG, cuyos niveles habíamos visto en experimentos anteriores que se veían aumentados por la separación materna.

Parte de los experimentos donde se encuentran descritos estos resultados están reflejados en el artículo:

Suárez J et al (2009) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. **Hippocampus 19: 623-32**

Publicado on-line: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.20537/abstract>

Suárez J et al (2010) Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. **Brain Res 1349: 162-73**

Publicado on-line: [http://www.sciencedirect.com/science?](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6SYR-50CV81V-2&_user=144492&_coverDate=08%2F19%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000012038&_version=1&_urlVersion=0&_userid=144492&md5=c76ce5645783fb71a6279f6797adc62b&searchtype=at)

[_ob=ArticleURL&_udi=B6SYR-50CV81V-2&_user=144492&_coverDate=08%2F19%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000012038&_version=1&_urlVersion=0&_userid=144492&md5=c76ce5645783fb71a6279f6797adc62b&searchtype=at](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6SYR-50CV81V-2&_user=144492&_coverDate=08%2F19%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000012038&_version=1&_urlVersion=0&_userid=144492&md5=c76ce5645783fb71a6279f6797adc62b&searchtype=at)

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

El efecto de la separación materna *per se* sobre el sistema cannabinoide queda demostrado por los resultados obtenidos. Este trabajo es, además, el primero en el que se muestra la distribución inmunohistoquímica de los receptores CB1 y CB2 del sistema endocannabinoide, así como la distribución de las enzimas responsables de la síntesis y la degradación del agonista endógeno cannabinoide 2-AG, en el hipocampo de ratas neonatales.

Respecto a la distribución de los receptores del sistema endocannabinoide hipocampal en ratas neonatales (tanto no separadas como separadas), el receptor CB1 se localiza en los axones que parten de células del Giro Dentado y del Asta de Ammon, siguiendo el mismo patrón que se ha descrito en el hipocampo de animales en edad adulta (Egertova y Elphick, 2000). Esto indica que en el día 13 postnatal (PN) este receptor ya ha alcanzado la distribución definitiva que perdurará hasta la vida adulta en ambas zonas del hipocampo. La distribución del receptor CB2 en el día 13 PN no es la misma que se ha encontrado en animales adultos (Gong *et al.*, 2006), indicando que, en este caso, aún no se ha alcanzado el patrón de marcaje definitivo. La distribución desigual de ambos receptores parece indicar que tienen funciones diferentes, el receptor CB2 está localizado en posiciones postsinápticas (terminales dendríticos) por lo que podría contribuir a modular el flujo de información en el hipocampo, mientras que el receptor CB1 se localiza en axones, por lo que podría modular las señales que salen desde este área cerebral.

La localización e identificación de los lugares en los que se encuentran las enzimas de síntesis y degradación del 2-AG pueden proporcionar una información muy valiosa para comprender su mecanismo de regulación en el cerebro. La distribución de DAGL α en los terminales dendríticos de las células hipocampales de nuestros animales coincide con la observada en animales adultos (Katona *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006), y la presencia de MAGL en los axones, también coincide con la descrita en animales adultos (Dinh *et al.*, 2002; Gulyas *et al.*, 2004). Estos resultados muestran que este sistema ya presenta una distribución en el día 13 postnatal que es la que definitivamente tendrá en la vida adulta, como en el caso del receptor CB1.

Respecto a los efectos de la separación materna sobre los componentes del sistema endocannabinoide, este modelo de estrés neonatal indujo una reducción de forma significativa del nivel de marcaje (expresión de la proteína) de los receptores CB1 hipocampales. Estos cambios fueron más marcados en los machos, mostrando de nuevo una diferencia sexodimórfica en los efectos a corto plazo de la separación materna. En el caso del receptor CB2, la separación materna provocó un aumento de su expresión tanto en machos como en hembras.

En cuanto a las enzimas relacionadas con la síntesis y degradación del 2-AG, se obtuvieron cambios a nivel de expresión, tanto en el análisis inmunohistoquímico como en el molecular (expresión de ARN mensajero). La expresión a nivel de marcaje inmunohistoquímico de la enzima DAGL α , responsable de la síntesis del 2-AG, aumenta en los animales que fueron separados en las áreas CA1, CA3 y en el Giro Dentado, salvo en la capa molecular del mismo, donde se observa una reducción respecto a los animales no separados. Molecularmente no se ha encontrado un aumento en su expresión génica (ARN mensajero para DAGL α), ni en machos ni en hembras. En relación a la enzima DAGL β , otra de las enzimas responsables del metabolismo del 2-AG, no se hallaron diferencias entre los diferentes grupos experimentales. Respecto a la enzima responsable de la degradación de 2-AG, la MAGL, se ha detectado una reducción en la expresión génica y en los niveles de la proteína en los animales separados, siendo este efecto más marcado en los machos.

En conclusión, en este capítulo se ha presentado la primera evidencia que indica que la separación materna provoca cambios tanto en los niveles de los receptores como en el de las enzimas implicadas en la síntesis y degradación del 2-AG, demostrando que una experiencia estresante en las primeras fases del desarrollo neonatal provoca cambios en un sistema con una importante implicación en el neurodesarrollo. También hemos aportado, por primera vez, una detallada descripción de la distribución y expresión en el hipocampo de diferentes componentes del sistema cannabinoide endógeno, tanto de los receptores CB1 y CB2, como de las enzimas responsables del metabolismo de los agonistas endógenos (más concretamente del 2-AG) en una etapa muy temprana del desarrollo en ratas de ambos sexos.

Cambios metabólicos a corto plazo inducidos por la separación materna en hipocampo y corteza prefrontal. Estudio de espectroscopía por resonancia magnética nuclear.

En los últimos años se han dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de las técnicas de neuroimagen y espectroscopia, así como a su posible aplicación en el campo de las enfermedades del sistema nervioso, incluyendo el estudio de los trastornos neuropsiquiátricos. Entre estas técnicas se encuentra la espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN). La RMN es una técnica espectroscópica utilizada para obtener información física y química a nivel microscópico de las moléculas. Esta técnica se basa en el principio de que todas las partículas poseen lo que se denomina *spin*, que es una propiedad natural de las partículas como la masa o la carga eléctrica. Gracias a esta propiedad estas partículas se comportan como pequeñas barras magnéticas cuando se les introduce en un campo magnético, situándose éstas paralelamente a dicho campo magnético. En este campo magnético las partículas pueden encontrarse en dos estados de energía diferente, un estado de baja energía o un estado de elevada energía, requiriéndose para pasar de un estado a otro la absorción de un fotón (bajo a elevado nivel energético), o por la emisión de energía (elevado a bajo nivel de energía). Este intercambio de energía entre los diferentes estados a una determinada frecuencia es lo que se conoce como resonancia, y es lo que detecta y mide la técnica de RMN. Existen diferencias en la frecuencia a la cual las diferentes partículas o átomos entran en resonancia, y estas diferencias dependen del ambiente electrónico que las rodea. De esta manera, se pueden distinguir los diferentes metabolitos en función de la frecuencia a la cual resuenan sus átomos ya que las estructuras químicas que rodea a estos átomos difieren entre los diferentes metabolitos (Hornak, 1996). En definitiva la RMN es una técnica no invasiva que permite obtener el perfil metabólico de determinadas zonas, como diferentes áreas cerebrales, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, lo cual confiere a esta técnica una elevada utilidad diagnóstica. Esta técnica permite además estudiar la evolución de una determinada patología, así como la eficacia terapéutica de una diversidad de fármacos (Agarwal *et al.*, 2010; Blüml *et al.*, 1999; Burlina *et al.*, 2000; Bustillo *et al.*, 2008; Pilatus *et al.*, 2009).

El desarrollo de nuevas técnicas de resonancia magnética *ex vivo* han permitido obtener una mayor resolución en los espectros metabólicos, sobre todo en el estudio de muestras semisólidas como es el caso de los tejidos, haciendo posible ampliar el número de metabolitos estudiados y aumentando, del mismo modo, la sensibilidad de la técnica. Un ejemplo de estas técnicas *ex vivo* es la espectroscopia por HR-MAS (del inglés, *high-resolution magic angle spinning*) protón (^1H), RMN que en humanos ha sido aplicada mayoritariamente en el estudio de tumores cerebrales (Barton *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2000; DeFeo y Cheng, 2010; Tzika *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2008). En los últimos años, esta técnica ha sido también aplicada al estudio de modelos animales, destacando los estudios en modelos de Alzheimer o SIDA (Cheng *et al.*, 2002; González *et al.*, 2000). Su uso ha ayudado a entender el comportamiento químico de los priones, proteínas responsables de importantes enfermedades neurológicas (Andrey *et al.*, 2010; Lange *et al.*, 2009), y en el estudio de los daños provocados por diferentes agentes neurotóxicos (Fauvelle *et al.*, 2010). Se ha utilizado esta técnica para la descripción de los perfiles metabólicos característicos de las diferentes regiones cerebrales en ratas (Tsang *et al.*, 2005), de modo que se puedan emplear estos perfiles para su comparación con otros modelos animales de condiciones patológicas.

En nuestro modelo de separación materna temprana hemos descrito cambios celulares, endocrinos y neuroquímicos (capítulos anteriores del 2 al 5) que podrían estar asociados y/o ser consecuencia de alteraciones metabólicas en las diferentes regiones cerebrales estudiadas. Por lo tanto, en este experimento nos planteamos **el estudio de los posibles cambios metabólicos** provocados **por la separación materna a corto plazo (día 13 postnatal)** mediante el empleo de la técnica de espectroscopia por resonancia magnética, **HR-MAS ^1H NMR**, en el **hipocampo y la corteza prefrontal** de ratas macho y hembra.

Los experimentos donde se encuentran descritos estos resultado están reflejados en el artículo:

Parte de los experimentos donde se encuentran descritos estos resultado están reflejados en el artículo:

Llorente R et al (2011) Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain, a proton NMR spectroscopy study. Artículo aún bajo revision enviado a **NMR Biomed.**

Title: Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain, a proton NMR spectroscopy study.

Authors: Ricardo Llorente¹, Palmira Villa², Eva M Marco^{1*}, Maria-Paz Viveros^{1*}

Affiliation: ¹DEPT. FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II), FACULTAD²DE BIOLOGÍA. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, MADRID (S

* CORRESPONDING AUTHORS:

MARIA-PAZ VIVEROS AND EVA M. MARCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II),

FACULTAD DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

C/ JOSE ANTONIO NOVAIS 2

28040- MADRID, SPAIN.

PHONE: +34 91 3944993; FAX: +34 91 3944935

E-MAIL ADDRESS: PAZVIVER@BIOCMARCSO@BIO.UCM.ES

THIS RESEARCH HAS BEEN SPONSORED BY MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN (BFU2009

RED DE TRASTORNOS ADICTIVOS (RD06/0001/1013) AND UCM-BSCH (951579).

Running title: Effects of maternal deprivation on brain metabolite profiles.

Keywords: MATERNAL DEPRIVATION, MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY, DEVELOPME

STRESS, HIPPOCAMPUS, PREFRONTAL CORTEX.

Abstract

IN THE LAST DECADES, CONSISTENT EVIDENCES FOR AN INCREASED VULNERABILITY OF T
TO ENVIRONMENTAL FACTORS HAVE BEEN ASSOCIATED WITH NEUROPHYSIOLOGICAL
IMPAIRMENTS THAT MAY RESEMBLE THE AETIOLOGY OF MAJOR PSYCHIATRIC DISC
SCHZOPHRENIA. IN THIS REGARD, MATERNAL DEPRIVATION (MD) IN NEONATAL RATS [MATERNAL DEPRIVATION
(MD), 24H ON POST-NATAL DAY (PND) 9] HAS BEEN PROPOSED AS AN ANIMAL MODEL
INVESTIGATION OF PSYCHIATRIC DISORDERS WITH A NEURODEVELOPMENTAL ORIGIN.
MAGNETIC RESONANCE (MR) TECHNIQUES HAVE BEEN APPLIED TO THE FIELD OF BIOME
ACTUALLY, METABOLIC CHANGES IN HIPPOCAMPAL PREFRONTAL CORTEX HAVE BEEN
DESCRIBED AMONG SCHIZOPHRENIC PATIENTS BY HIGH-RESOLUTION MAGIC ANGLE
SPINNING PROTON NUCLEAR MR SPECTROSCOPY (HR-MAS). THEREFORE, THE PRESENT STUDY
AIMED TO INVESTIGATE WHETHER SIMILAR CHANGES IN THE BRAIN METABOLIC PROFILE
USING *ex vivo* HR-MAS, COULD BE DESCRIBED IN OUR MD ANIMAL MODEL. IN THE SHORT-TERM
APPLIED TO HAVE CRITICALLY INFLUENCED THE METABOLIC PROFILE OF BOTH HIPPOCAMPAL
MATERNALLY DEPRIVED MALE AND FEMALE RAT PUPS (PND 13) COMPARED TO CONTROL
ANIMALS. GLUTAMINE AND GLUTAMATE (GLX) WERE FOUND TO BE REDUCED WITHIN THE
AMONG MALE AND FEMALE RAT PUPS WHEREAS TAURINE CONTENT SEEMED TO HAVE
DIFFERENCES IN HIPPOCAMPAL PHOSPHORILETHANOLAMINE HAVE ALSO BEEN FOUND AS
MD PROTOCOL. IN ADDITION, MD INDUCED SOME OTHER REGION- AND SEX-DEPENDENT EFFECTS
FOR DECREASED PREFRONTAL N-ACETYL ASPARTATE SIGNAL WAS OBSERVED TOGETHER WITH
INCREASE IN THE TOTAL CHOLINE SIGNAL IN THE HIPPOCAMPI OF MALE PUPS. PRESENT FINDINGS
DIFFERENT BRAIN METABOLIC PROFILE IN OUR ANIMAL MODEL OF EARLY LIFE STRESS,
POTENTIAL UTILITY IN THE IMPLEMENTATION OF TRANSLATIONAL NEUROPSYCHIATRIC RESEARCH

Abbreviations:**2-AG**, 2-ARAQUIDONOIL GLYCEROL**Cre**, CREATINE**Fj-C**, FLUORO-JADE C**GFAP**, GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN**Gln**, GLUTAMINE**Glu**, GLUTAMATE**Glx**, GLUTAMINE AND GLUTAMATE**Lac**, LACTATE**MD**, MATERNAL DEPRIVATION**NAA**, N-ACETYL ASPARTATE**PCA**, PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS**PEA**, PHOSPHORYLETHANOLAMINE**PND**, POSTNATAL DAY**Tau**, TAURINE**tCho**, TOTAL CHOLINE

1
2
3
4 **Title: Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on**
5 **metabolite profiles in rat brain, a proton NMR spectroscopy study.**
6
7

8
9 **Authors: Ricardo Llorente, Palmira Villa, Eva M Marco, Maria-Paz Viveros**
10
11

12 13 14 **Graphical abstract**

15
16 EARLY MATERNAL DEPRIVATION (MD) IN NEONATAL RATS HAS BEEN PROPOSED AS AN A
17
18 THE INVESTIGATION OF CERTAIN NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS WE STUDIED
19
20 THE EFFECTS OF MD ON THE METABOLITE PROFILES OF THE DEVELOPING BRAIN BY US
21
22 RESONANCE SPECTROSCOPY TECHNIQUES. MD SIGNIFICANTLY ALTERED CORTICAL
23
24 METABOLIC PROFILES IN NEONATAL RATS IN A SEX DEPENDENT MANNER. THESE FINDINGS SUGGEST MD AS
25
26 A USEFUL TOOL FOR THE INVESTIGATION OF PSYCHIATRIC ILLNESSES OF DEVELOPMENTAL ORIGIN.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

THE EARLY NEONATAL AGE CONSTITUTES A SENSITIVE PERIOD FOR RESPONSIVENESS TO ENVIRONMENTAL FACTORS. A LARGE BODY OF EVIDENCE SUPPORTS THE FACT THAT IMPAIRED MATURATION MAY LEAD TO NEUROPHYSIOLOGICAL AND BEHAVIOURAL IMPAIRMENTS ASSOCIATED WITH THE AETIOLOGY OF MAJOR PSYCHIATRIC DISORDERS (1-4). ACCORDINGLY, A 'NEUROBIOLOGICAL HYPOTHESES' FOR NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS WAS PROPOSED IN THE LAST DECADE WHICH POSTULATES THAT INSULTS DURING BRAIN MATURATION MAY LEAD TO THE ACTIVATION OF NEURAL CIRCUITS LATER IN LIFE THAT MIGHT BE FOLLOWED BY THE EMERGENCE OF PSYCHOPATHOLOGY DURING ADOLESCENCE OR YOUNG ADULTHOOD. IN THE LAST DECADES, STUDIES IN RODENTS HAVE PROVIDED FURTHER SUPPORT TO THIS HYPOTHESIS. RESEARCH HAS LARGELY FOCUSED ON THE EFFECTS OF DISRUPTIONS IN MOTHER-INFANT INTERACTIONS, AND ON THE RELEVANCE OF SUCH MANIPULATIONS IN THE CONTEXT OF MOOD DISORDERS INCLUDING DEPRESSION AND SCHIZOPHRENIA [SEE (1,7)]

A SINGLE AND PROLONGED EPISODE (24 HOURS) OF MATERNAL DEPRIVATION DURING EARLY DEVELOPMENT, ON POSTNATAL DAY 9, HAS BEEN REPORTED TO PRODUCE REMARKABLE BEHAVIOURAL IMPAIRMENTS IN RATS. ABNORMALITIES THAT RESEMBLE PSYCHOTIC-LIKE SYMPTOMS AND DISTURBANCES IN PRE-PULSE INHIBITION, LATENT INHIBITION AND AUDITORY SENSORY GATING HAVE BEEN REPORTED. SHORT AND LONG TERM ALTERATIONS IN THE STRESS REACTIVITY SYSTEMS HAVE ALSO BEEN REPORTED. WELL ESTABLISHED AS A DEPRESSIVE-LIKE PHENOTYPE IN MATERNALLY DEPRIVED RATS, THE MD (8-12). ACTUALLY, RESEARCH ON THIS ANIMAL MODEL HAS OPENED NEW AVENUES FOR THE INVESTIGATION OF PUTATIVE NEUROBIOLOGICAL SUBSTRATES UNDERLYING THE DETRIORAL EFFECTS OF THIS EARLY LIFE STRESS. IN SYNAPTIC PLASTICITY AND A DECREASE IN GLUTAMATE NEUROTRANSMISSION HAVE BEEN SUGGESTED AS A CONSEQUENCE OF THE MD (13). SHORT-TERM NEURODEGENERATIVE PROCESSES HAVE BEEN RECENTLY REPORTED IN THE HIPPOCAMPUS AND CEREBELLUM OF MATERNALLY DEPRIVED RATS (14). AMINOACETYLCHOLINE AND SEROTONIN

1
2
3
4 HAVE BEEN REPORTED AS A CONSEQUENCE OF THE (15,16) MORE RECENTLY,
5
6 THE ENDOCANNABINOID SYSTEM HAS BEEN IDENTIFIED AS A NEUROMODULATORY SYSTEM MEDIATING
7
8
9 MD-INDUCED IMPAIRMENT (8,17).

10
11 THE APPLICATION OF MAGNETIC RESONANCE (MR) TECHNOLOGY IS RAPIDLY INCREASING IN THE
12
13 FIELD OF BIOMEDICAL RESEARCH, AND RECENT ADVANCES IN THIS FIELD HAVE FURTHER
14
15 ASSESSED THE AETIOLOGY AND PROGRESSION OF NEUROPSYCHIC DISORDERS. THE
16
17 HIGHER RESOLUTION NMR SPECTROSCOPY PERMITS THE DIRECT ANALYSIS OF
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

THE APPLICATION OF MAGNETIC RESONANCE (MR) TECHNOLOGY IS RAPIDLY INCREASING IN THE
FIELD OF BIOMEDICAL RESEARCH, AND RECENT ADVANCES IN THIS FIELD HAVE FURTHER
ASSESSED THE AETIOLOGY AND PROGRESSION OF NEUROPSYCHIC DISORDERS. THE
HIGHER RESOLUTION NMR SPECTROSCOPY PERMITS THE DIRECT ANALYSIS OF
TISSUES TO OBTAIN HIGHLY RESOLVED SPECTRA THAT CAN PROVIDE DETAILED AND COMPLETE
INFORMATION ON THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF BRAIN TISSUES. HR-MAS HAS BEEN SUCCESSFULLY APPLIED IN
STUDIES ON VARIOUS HUMAN TISSUES AND DISEASES, SUCH AS BRAIN TUMORS
AND NEURODEGENERATIVE DISEASES SINCE HUMAN STUDIES HAVE DESCRIBED METABOLIC CHANGES
AMONG SCHIZOPHRENIC PATIENTS BY USING EX-VIVO HR-MAS (24), IN THE PRESENT STUDY
WE WANTED TO INVESTIGATE WHETHER SIMILAR ALTERATIONS WOULD BE OBSERVED IN RAT PUPS
EXPOSED TO THE M PROTOCOL. THE HIPPOCAMPUS AND FRONTAL CORTICES WERE THE
BRAIN REGIONS SELECTED FOR THE ANALYSIS BECAUSE OF THEIR PARTICIPATION IN THE DEVELOPMENT
OF PSYCHIATRIC DISORDERS (25,26) AND BECAUSE OF CELLULAR CHANGES PREVIOUSLY
OBSERVED WITHIN THE HIPPOCAMPUS AS A CONSEQUENCE OF THE M PROTOCOL [SEE FOR REVIEW (27)].

51 MATERIALS AND METHODS

52 ALL THE EXPERIMENTS PERFORMED IN THIS STUDY ARE IN COMPLIANCE WITH THE
53
54
55
56
57
58
59
60

ALL THE EXPERIMENTS PERFORMED IN THIS STUDY ARE IN COMPLIANCE WITH THE
EUROPEAN DIRECTIVE 609/86 (1201/2005, OCTOBER 21, 2005 (BOE N° 252) ABOUT PROTECTION OF EXPERIMENTAL ANIMALS
AS WITH THE EUROPEAN COMMUNITIES COUNCIL DIRECTIVE OF 24 NOVEMBER 1986 (86/609/EEC).

Animals

WE USED WISTAR ALBINO RATS OF BOTH SEXES. SUBJECTS WERE THE OFFSPRING OF RA
HARLAN INTERFAUNA IBÉRICA S.A. (BARCELONA, SPAIN) WHICH WERE MATED (ONE
FEMALES) IN OUR LABORATORY APPROXIMATELY 2 WEEKS AFTER THEIR ARRIVAL. A
MAINTAINED AT A CONSTANT TEMPERATURE (22 ± 1 °C) AND IN A 12-H
DARK-LIGHT CYCLE (LIGHTS ON AT 20:00H), WITH FREE ACCESS TO FOOD (COMMERCIAL
A04/A03; PANLAB, BARCELONA, SPAIN) AND WATER. ON THE DAY OF BIRTH (POSTNATAL D
LITTERS WERE SEX-BALANCED, WEIGHTED AND CULLED TO 8 PUPS PER DAM (4 MALES
ONLY 2 MALE AND 2 FEMALE RAT PUPS FROM EACH LITTER WERE USED IN THE
TOTAL OF 16 LITTERS WERE USED, AND EACH EXPERIMENTAL GROUP INCLUDED 8 ANIMALS
DIFFERENT LITTERS.

Maternal deprivation

THE MATERNAL DEPRIVATION PROTOCOL (MD) TOOK PLACE ON PND 9 AS PREVIOUSLY DE
BRIEF, ON PND 9, HALF OF THE LITTERS WERE SUBMITTED TO 24 HOURS OF MATERNAL D
GROUP), I.E. DAMS REMOVED FROM THEIR HOME-CAGES IN THE MORNING (BEGINNING A
PUPS LEFT UNDISTURBED IN THEIR CORRESPONDING HOME-CAGE (IN THE SAME ROOM)
WHEN DAMS WERE RE-PLACED IN THEIR CORRESPONDING HOME-CAGES.

NMR data acquisition

ANIMALS WERE LEFT UNDISTURBED IN THEIR HOME CAGES FOR SOME DAYS TO ALLOW TH
THE PUTATIVE SHORT-TERM MATERNAL DEPRIVATION EFFECTS ON THE METABOLIC PRO
THEN SACRIFICED ON PND 13, BRAINS WERE RAPIDLY REMOVED, HIPPOCAMPUS AND PRE

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISSECTED AND FROZEN IN LIQUID NITROGEN. BRAIN TISSUES WERE THEREAFTER KEPT
ANALYSIS. INTACT CEREBRAL TISSUE WAS EXAMINED USING HR-MAS OPERATING AT 4°C
TISSUE DEGRADATION; ANALYSES WERE PERFORMED AT 500.13 MHz USING A BRUKER
SPECTROMETER OPERATING AT 11.7 T. THE SAMPLES WERE PLACED IN A ZR-CONTAINING
ROTOR WITH CYLINDRICAL INSERT AND SPUN AT 4000 HZ SPINNING RATE, TO REMOVE
SPINNING SIDE BANDS FROM THE SPECTRA ACQUIRED. SHIMMING AND NMR PREPARATION
TRIED TO KEEP TO A MINIMUM, BUT THROUGHOUT THIS THE NMR SAMPLE ANALYSIS WAS
TO MINIMIZE METABOLIC CHANGES. HR-MAS PROBE HAD BEEN PREVIOUSLY COOLED
TEMPERATURE WAS CONTROLLED DURING MEASUREMENTS (BRUKER VARIABLE TEMPERATURE
ADDITION, BEFORE ANALYSIS, INTERNAL MEASUREMENTS WERE DONE USING METHANOL-D₄
CONDITIONS NO NOTICEABLE DEGRADATION WAS OBSERVED DURING ACQUISITION.

STANDARD SOLVENT SUPPRESSED SPECTRA WERE ACQUIRED INTO 16 K DATA POINTS
OVER 256 ACQUISITIONS, TOTAL ACQUISITION TIME 100 MIN. USING A SEQUENCE BASED ON THE FIRST INCREMENT
OF THE NOESY PULSE SEQUENCE (RELAXATION DELAY ρ = 900 MS, DELAY ρ = 900 MS, ACQUIRE FREE INDUCTION
DECAY (FID) IN WHICH A SECONDARY RADIO FREQUENCY IRRADIATION FIELD IS APPLIED AT
RESONANCE FREQUENCY DURING THE RELAXATION DELAY OF 2 S AND DURING THE MIXING
MS), WITH A FIXED τ OF 1.5 S. A SPECTRAL WIDTH OF 8333.33 HZ WAS USED. ALL SPECTRA WERE PROCESSED
USING TOPSPIN SOFTWARE (VERSION 1.3, BRUKER RHEINSTETTEN, GERMANY). PRIOR TO
TRANSFORMATION, THE FIDS WERE MULTIPLIED BY AN EXPONENTIAL WEIGHT FUNCTION
A LINE BROADENING OF 0.3 HZ. SPECTRA WERE PHASED AND A FIFTH-ORDER POLYNOMIAL
CORRECTION WAS USED AS A TYPICAL FITTING FUNCTION. SPECTRA ARE REFERENCED TO
TRIMETHYLSILYL)-2,2,3,3-TETRADEUTERIOPROPIONATE (TSP) AT 0 PPM.

Pattern Recognition

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA) IS A TECHNIQUE THAT TRANSFORMS THE VARIATION INTO A SMALLER NUMBER OF NEW LATENT VARIABLES CALLED PRINCIPAL COMPONENTS UNCORRELATED WITH EACH OTHER AND ACCOUNT FOR DECREASING PROPORTIONS OF THE ORIGINAL VARIABLES. PCS ARE NEW VARIABLES, ORTHOGONAL TO EACH OTHER, WITH PROGRESSIVELY LESS VARIANCE IN THEM. DATA BASED DISPLAYED IN TWO- OR THREE-DIMENSIONAL "SCORES PLOTS," ALLOWING VISUALIZATION OF THE DISTRIBUTION AND GROUPING OF THE NEW VARIABLE SPACE. SINCE EACH PC IS A COMBINATION OF THE ORIGINAL INPUT VARIABLES, EACH ORIGINAL VARIABLE (OR NMR SIGNAL) IS GIVEN A WEIGHT (LOADING) THAT INDICATES THE INFLUENCE THAT VARIABLE HAS ON THE OVERALL DISTRIBUTION OF SAMPLES. THESE ARE DISPLAYED AS LOADINGS PLOTS THAT INDICATE WHICH SPECTRAL REGIONS ARE RESPONSIBLE FOR DIFFERENTIATION BETWEEN GROUPS OF SAMPLES (FIG. 2) [SEE (28,29)]. FOR PATTERN RECOGNITION ANALYSIS, NMR SPECTRA WERE DATA REDUCED USING THE SOFTWARE PROGRAM AMIX (A MIXTURES VERSION 3.6.8, BRUKER RHEINSTETTEN, GERMANY) BY SUBDIVISION INTO INTERVALS OF 0.04 PPM BETWEEN 0 AND 9 PPM (EXCEPT WATER REGION FROM 5.4 PPM TO 6.4 PPM). EACH INTEGRAL REGION WAS NORMALIZED USING THE TOTAL INTENSITY OF THE SPECTRUM. PCA WAS PERFORMED USING NO SCALING. LOADINGS PLOTS FROM THE PCA WERE USED TO IDENTIFY THE PEAKS RESPONSIBLE FOR THE SIGNIFICANT DIFFERENCES. PEAKS WERE THEREFORE ASSOCIATED WITH METABOLITES BASED UPON PREVIOUS EXISTING LITERATURE [FOR REVIEW CONSULT (30)] WITH OUR 2D COSY AND TOCSY EXPERIMENTS (SEE FIG. 1, AND TABLE 1 FOR DETAILS).

PLEASE INCLUDE TABLE 1 AROUND HERE

PLEASE INCLUDE FIG. 1 AROUND HERE

Statistical analysis

DATA WERE ANALYSE USING A MULTIVARIATE DATA ANALYSIS OF INDEPENDENT FACTORS BEING SEX (MALE OR FEMALE) AND NEONATAL TREATMENT (CONTROL OR MD RATS). INDEPENDENT ANALYSES WERE PERFORMED FOR EACH BRAIN REGION, I.E. HIPPOCAMPUS AND PREFRONTAL CORTEX. THE TUKEY'S TEST WAS EMPLOYED FOR POST-HOC COMPARISONS, WITH P<0.05 CONSIDERED AS THE LEVEL OF STATISTICAL SIGNIFICANCE. ANALYSES WERE PERFORMED USING SPSS 15.0.

RESULTS

PLEASE INCLUDE FIG. 2 AROUND HERE

Hippocampus

MULTIVARIATE DATA ANALYSIS OF HR-MAS SPECTRA FROM HIPPOCAMPUS SAMPLES REVEALED AN EFFECT OF THE NEONATAL TREATMENT [$F(1,27) = 55.96$, $P < 0.001$] (FIG. 2). INDIVIDUAL METABOLITES WERE INDEPENDENTLY ANALYSED BY A TWO-WAY MANOVA. THIS ANALYSIS RENDERED A SIGNIFICANT GLOBAL EFFECT OF MD [WILKS'S LAMBDA: $F(8,20) = 12.24$, $P < 0.001$], REFLECTING THE DIVERSITY OF METABOLITE PEAKS ACHIEVED WITHIN THE HIPPOCAMPUS. A SIGNIFICANT EFFECT OF MD WAS FOUND FOR THE TAU SIGNAL [$F(1,27) = 27.16$, $P < 0.001$], FOR THE GLX SIGNAL [$F(1,27) = 19.13$, $P < 0.001$] AND FOR PEA SIGNAL [$F(1,27) = 14.65$, $P = 0.001$]. THE NEONATAL TREATMENT SEEMED TO HAVE INDUCED A SIGNIFICANT QUALITATIVE CHANGE IN DIVERSITY OF METABOLITES AND PEA CONTENT SEEMED TO HAVE SUFFERED AN INCREASE DUE TO THE EXPOSURE TO THE MD PROTOCOL, WHEREAS GLX SIGNAL APPEARED TO HAVE DIMINISHED AMONG BOTH MALE AND FEMALE PUPS. MOREOVER, A SIGNIFICANT INTERACTION BETWEEN SEX AND NEONATAL TREATMENT WAS OBSERVED FOR THE TOTAL CHOLINE REPRESENTATIVE BUCKET [$F(1,27) = 7.35$, $P < 0.05$]. IN THIS CASE MD

1
2
3
4 INDUCED AN INCREASE IN THE TCHO SIGNAL EXCLUSIVELY AMONG IN THE ABSENCE
5
6
7 OF MD-INDUCED CHANGES AMONG FEMALES (FIG. 3). IT IS WORTH NOTING THAT NO
8
9 DIFFERENCES WERE FOUND FOR LAC, NAA, GLU, OR CRE REPRESENTATIVE BUCKETS.

11 PLEASE INCLUDE FIG. 3 AROUND HERE

15 *Prefrontal cortex*

17 THE PCA OF PREFRONTAL SAMPLES REVEALED AN EFFECT OF THE NEONATAL TREATMENT
18
19 $P < 0.001$] (FIG. 2). THEREAFTER, A TWO-WAY MANOVA WAS PERFORMED TO ANALYSE DIFFERENCES
20
21 IN THE METABOLIC SIGNAL PATTERN. A SIGNIFICANT OVERALL EFFECT OF SEX [WILKS'S LAMBDA: $F(8,18) =$
22
23 $2.64, P = 0.042$] AND NEONATAL MANIPULATION WAS FOUND [WILKS'S LAMBDA: $F(8,18) =$
24
25 $17.71, P < 0.001$]. A SIGNIFICANT OVERALL EFFECT OF SEX WAS FOUND FOR GLX LEVELS [$F(1,25)$
26
27 $= 43.27, P < 0.001$], HOWEVER SUCH AN EFFECT WAS ONLY EVIDENT AMONG CONTROL ANIMALS (NOT
28
29 HISTOGRAMS). PRESENT ANALYSIS ALSO INDICATED A SIGNIFICANT EFFECT OF THE MD
30
31 REPRESENTATIVE BUCKET [$F(1,25) = 17.71, P < 0.001$], FOR NAA [$F(1,25) = 11.13, P < 0.01$], FOR GLU
32
33 [$F(1,25) = 43.27, P < 0.001$] AND GLU [$F(1,25) = 7.23, P < 0.05$] REPRESENTATIVE BUCKETS. IN
34
35 ADDITION, THE LAC PEAK SIGNAL WAS ALSO AFFECTED BY THE MD PROTOCOL ALTHOUGH IT
36
37 DID NOT ACHIEVE A STATISTICAL LEVEL OF SIGNIFICANCE [$F(1,25) = 4.10, P = 0.054$] (SEE FIG. 3).
38
39 THE PREFRONTAL CORTEX, TAU SIGNAL SEEMED TO HAVE AUGMENTED AS A CONSEQUENCE OF THE MD
40
41 PROTOCOL AMONG BOTH MALE AND FEMALE RAT PUPS, WHILE THE GLX SIGNAL APPEARED TO UNDERGO
42
43 AN OPPOSITE MODIFICATION, I.E. A REDUCTION. POST-HOC COMPARISONS WAS NOT APPLIED TO
44
45 DIFFERENCES BETWEEN EXPERIMENTAL GROUPS FOR THE GLU SIGNAL WHILE FOR THE NAA SIGNAL
46
47 BUCKET A STRONG TENDENCY FOR A MD-INDUCED DECREASE WAS RENDERED EXCLUSIVE TO MALE
48
49 (P=0.054) PUPS. NO DIFFERENCES WERE FOUND FOR THE REPRESENTATIVE BUCKETS OF OTHER METABOLITES
50
51 ANALYSED.

59 PLEASE INCLUDE FIG. 4 AROUND HERE

DISCUSSION

TO THE BEST OF OUR KNOWLEDGE, THIS IS THE FIRST STUDY THAT INVESTIGATES THE MATERNAL DEPRIVATION BY MEANS OF MAS TECHNIQUE. OUR FINDINGS INDICATE THAT SINGLE EPISODE OF EARLY MATERNAL DEPRIVATION, 24 H ON PND 9, SIGNIFICANTLY ALTERED PROFILE OF BOTH HIPPOCAMPUS AND PREFRONTAL CORTEX IN THE SHORT TERM (PND 13) AMONG MATERNALLY DEPRIVED PUPS. GLX MIGHT BE PRESENT TOGETHER WITH AN AUGMENTED CONTENT WITHIN THESE TWO BRAIN REGIONS. THIS MATERNAL DEPRIVATION ALSO ASSOCIATED AN INCREASE IN PEA LEVELS WITHIN THE HIPPOCAMPUS OF MALE PUPS. SOME OTHER MD-INDUCED CHANGES SHOWED A SEX-SPECIFIC PROFILE, THAT IS, INCREMENTS IN TCHO WAS DESCRIBED ONLY FOR MALES, AND EXCLUSIVELY IN HIPPOCAMPUS WHILE A TREND FOR DECREASED PREFRONTAL N-ACETYL ASPARTATE SIGNAL AMONG MALE PUPS (CONSULT TABLE 2 FOR A SUMMARY OF MAIN RESULTS

PLEASE INCLUDE TABLE 2 AROUND HERE

PREVIOUS STUDIES HAVE ALREADY COMPROMISED THE GLUTAMATERGIC SYSTEM IN MATERNAL DEPRIVATION ANIMAL MODEL. IN PARTICULAR, CHANGES SUGGESTIVE OF A DYSREGULATION OF THE GLUTAMATERGIC SYSTEM HAVE BEEN REPORTED, I.E. A REDUCED EXPRESSION OF NMDA RECEPTORS WITHIN THE HIPPOCAMPUS (13). IN LINE WITH THIS PREVIOUS STUDY, OUR RESULTS INDICATE A DECREASE IN GLX LEVELS THAT MIGHT BE INDICATIVE OF A REDUCED GLUTAMATE SIGNALLING. THESE CHANGES IN GLX (GLUTAMINE AND GLUTAMATE) MIGHT ALSO AFFECT ASTROGLIAL-NEURON INTERACTIONS. GLUTAMINE-GLUTAMATE CYCLING IS CENTRAL IN NEURAL METABOLISM. GLUTAMINE (GNS) IS SYNTHESIZED IN GLIAL CELLS AND THEREAFTER TRANSPORTED TO NEURONS WHERE IT CAN BE TRANSFORMED INTO GLU, THUS ALLOWING THE COUPLING BETWEEN NEURONS AND GLIA THROUGH DIRECTIONAL EXCHANGES (30,31). THE REDUCED SIGNAL IN GLX OBSERVED IN OUR MATERNALLY

1
2
3
4 DEPRIVED RAT PUPS MIGHT BE INDICATIVE OF A DISTURBANCE IN NEURON-GLIAL
5
6 ACCORDINGLY, GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN (GFAP)-POSITIVE CELL NUMBER (ASTROCYTES)
7
8 BEEN REPORTED TO BE INCREASED BY MATERNAL DEPRIVATION. THEREFORE, A LINK BETWEEN
9
10 GLX LEVELS AND IMPAIRMENTS IN NEURON-GLIA INTERACTION COULD BE HYPOTHESIZED.
11
12 HOWEVER, DESPITE IMMUNOHISTOCHEMISTRY DATA FOR GFAP SHOWING CLEAR SEX-
13
14 (MALES BEING MORE AFFECTED), WE COULD NOT FIND SUCH A DIMORPHISM BY USING NMR.
15
16 THEREFORE, NEURON-GLIA INTERACTIONS DO NOT COMPLETELY EXPLAIN THE MD-INDUCED
17
18
19
20
21 LEVELS.

22
23 OUR DATA INDICATED HIGHER TAURINE LEVELS AS A CONSEQUENCE OF THE EARLY EXPOSURE
24
25 TO THE MD PROTOCOL IN MALE AND FEMALE RAT PUPS IN REGIONS ANALYSED, I.E. FRONTAL
26
27 CORTEX AND HIPPOCAMPUS. TAURINE IS A SEMI-ESSENTIAL AMINOACID, NOT INCORPORATED INTO
28
29 PROTEINS, THAT IS CRUCIAL FOR AN APPROPRIATE BRAIN DEVELOPMENT (33). MORE RECENTLY,
30
31 IT HAS BEEN SUGGESTED TO PLAY AN IMPORTANT DEFENSIVE ROLE DURING DEVELOPMENT. IN THE
32
33 RELEASE HAS BEEN REPORTED TO BE MODULATED BY GLUTATHIONE AND ITS DERIVATIVES AS A
34
35 NEUROPROTECTOR SUBSTANCE DURING DEVELOPMENT (33). IT HAS ALSO BEEN SHOWN THAT TAURINE
36
37 PROTECTS NEURONS AGAINST MANY HARMFUL AND TOXIC EFFECTS (34). MOREOVER, AN ASSOCIATION BETWEEN
38
39 ELEVATIONS IN TAURINE LEVELS AND INCREMENTS IN GFAP IMMUNOREACTIVITY HAS BEEN OBSERVED IN
40
41 *in vitro* STUDIES. ACTUALLY, ASTROCYTES MIGHT BE CRITICAL FOR THE CHANGES IN TAURINE LEVELS
42
43 BY NEURONAL DAMAGE (35). IN LINE WITH THIS HYPOTHESIS, WE HAVE PREVIOUSLY REPORTED THAT AT
44
45 PND 13, MD MALES SHOWED A SIGNIFICANTLY INCREASED NUMBER OF GFAP-POSITIVE CELLS IN THE
46
47 HIPPOCAMPUS (36). COMING BACK TO OUR PRESENT DATA, THE INCREASE IN TAU LEVELS IN THE
48
49 DEFENSIVE NEUROPROTECTIVE MECHANISM ACTIVATED IN RESPONSE TO THE DEVELOPMENT OF MD DURING
50
51 MATERNAL DEPRIVATION. INTERESTINGLY, WE HAVE PREVIOUSLY SHOWN THAT AT PND 13, MD MALES
52
53 ALSO SHOWED DIVERSE CHANGES IN THE ENDOCANNABINOID SYSTEM, WHICH IS A NEUROPROTECTIVE
54
55
56
57
58
59
60

PROPERTIES HAVE BEEN EXTENSIVELY EXPLORED (37,38) AND INDUCES DECREASE IN CB1 RECEPTOR EXPRESSION, INCREASE IN CB2 EXPRESSION (39), TOGETHER WITH INCREASE IN HIPPOCAMPAL 2-ARACHIDONIC ACID (ARA) LEVELS (36), CHANGES THAT REFLECT AN ADDITIONAL AND/OR ALTERNATIVE NEUROPROTECTIVE MECHANISM.

THE PRESENT RESULTS ALSO SHOW AN INCREASE IN PHOSPHORYLETHANOLAMINE WITHIN THE HIPPOCAMPUS OF MD PUPS OF BOTH SEXES. ABNORMALITIES IN PEAA LEVELS ASSOCIATED WITH AN ALTERED CELLULAR STATE OF THE BRAIN. HIGH LEVELS OF PEAA COULD LEAD TO IMPAIRMENTS IN BRAIN DEVELOPMENT SUCH AS ALTERED MYELINIZATION (40). OUR PREVIOUS STUDY INDICATED THAT EARLY MD INDUCES MORE PROFOUND HIPPOCAMPAL CHANGES IN 13-DAY-OLD MALES COMPARED TO FEMALES (27). ACCORDING TO AN INCREASING STUDY, THE CONTENT OF HIPPOCAMPAL TCHO WAS EXCLUSIVELY REPORTED IN FEMALES. TCHO HAS BEEN RELATED TO THE INTEGRITY OF CELL MEMBRANES, THUS REFLECTING PROCESSES OF CELLULAR MEMBRANE DESTRUCTION (41). IN THIS REGARD, CHANGES IN TCHO LEVELS HAVE BEEN REPORTED IN VARIOUS INVESTIGATING PATHOLOGICAL STATES IN WHICH CELLULAR MEMBRANE ALTERATIONS OCCUR, SUCH AS CANCER, ISCHEMIA, ALZHEIMER'S DISEASE AND MULTIPLE SCLEROSIS. ACTUALLY, INCREASES IN TCHO HAVE BEEN ASSOCIATED WITH INCREMENTS IN TCHO LEVELS UNDER CERTAIN CONDITIONS OF INFLAMMATION OR GLIOSIS (30,41). THESE CHANGES IN THE HIPPOCAMPUS MIGHT BE RELATED TO THE PROFOUND CHANGES IN 3-DAY-OLD MD ANIMALS IN THE SAME BRAIN AREA. FOR INSTANCE, MD RATS SHOWED A SIGNIFICANT INCREASE IN THE NUMBER OF CELLS STAINED WITH FLUOROJADON, A MARKER FOR DEGENERATIVE NEURONS (42), WITHIN THE HIPPOCAMPUS, TOGETHER WITH AN INCREMENT IN THE NUMBER OF GFAP-POSITIVE CELLS (14,36), A MARKER FOR ASTROGLIAL CELLS (43).

DESPITE THE LACK OF STATISTICAL SIGNIFICANCE, MDSS SHOWED WITHIN THE PREFRONTAL CORTEX, PARTICULARLY AMONG MALES, A DECREASE IN NAA LEVELS. DECREASES IN NAA LEVELS HAVE BEEN ASSOCIATED WITH LOSS OF NEURONAL INTEGRITY OR FUNCTIONALITY.

AND ALTERED MYELINATION (41,42). ACCORDINGLY, MD HAS ALSO BEEN REPORTED TO INDUCE
 INCREASE IN APOPTOTIC BIOMARKERS, INCLUDING BAX AND BCL-2 EXPRESSIONS (43).
 THE SHORT-TERM (45) WHETHER CHANGES IN PREFRONTAL NAA SIGNAL IN THIS ANIMAL MODEL
 RELATED TO AUGMENTED NEURODEGENERATIVE PROCESSES AND/OR TO AN ALTERED
 CORTICAL AREAS IS STILL A MATTER OF RESEARCH. FURTHER STUDIES CONSIDERING
 QUANTIFICATION AND ITS POSSIBLE CORRELATION WITH NEURODEGENERATIVE-LIKE PROCESSES
 BETTER UNDERSTAND THE SHORT-TERM CONSEQUENCE OF MD IN THIS BRAIN AREA.

IN RESUMM, MD SIGNIFICANTLY ALTERED THE CHEMICAL AND CORTICAL METABOLIC PROFILE
 NEONATAL RATS. TAKEN TOGETHER, THE AMINOACETIC ACID SIGNALING SEEMS TO BE CRITICALLY COMPROMISED
 MD, AND THE INCREASE IN GABA LEVELS MIGHT REFLECT AN ATTEMPT TO RESCUE THE NEONATAL
 MORE PROFOUND DAMAGES IN PEA AND TCHO MIGHT REFLECT ASTROCYTE PROLIFERATION
 AND CELLULAR PERTURBATION. PRESENT FINDINGS FURTHER SUPPORT PREVIOUS EVIDENCE IN
 CHANGES IN THE NUMBER OF ASTROGLIAL CELLS (GFAP-POSITIVE) AS A CONSEQUENCE OF
 DISRUPTION OF MOTHER-PUP INTERACTIONS (43). AS NRQ436) PLAY ESSENTIAL ROLES IN SYNAPTIC
 MECHANISMS, AND THERE IS GROWING EVIDENCE THAT ASTROCYTE FUNCTIONS AND DYSFUNCTIONS
 CONTRIBUTE TO BEHAVIOURAL MECHANISMS (46,47). CLINICAL STUDIES HAVE ALSO SHOWN THAT
 ASTROCYTES PLAY AN IMPORTANT ROLE IN NEUROPATHOLOGIES, SUCH AS SCHIZOPHRENIA (48-50)
 AND DEPRESSIVE DISORDERS (51,52). REACTIVE ASTROGLIOSIS HAS BEEN CLASSICALLY CONSIDERED A
 MALADAPTIVE PHENOMENON RELATED TO NEUROTOXICITY, INFLAMMATION OR CHRONIC STRESS (53).
 THIS NEGATIVE VIEWPOINT IS NO LONGER TENABLE AND IT IS CLEAR THAT THERE IS A
 REACTIVE ASTROGLIOSIS THAT EXERTS MANY BENEFICIAL FUNCTIONS AND DOES NOT DYSFUNCTION
 (53)]. PRESENT FINDINGS MAY SUGGEST THAT AN ENVIRONMENTAL INSULT DURING
 DEVELOPMENT (I.E. MD) MAY INITIATE NEURODEGENERATIVE PROCESSES THAT COULD BE
 BY THE PROMOTION OF REACTIVE ASTROGLIOSIS AND NEUROPROTECTIVE MECHANISMS.

References

1. BEYDOUN H, SAFTLAS AF. PHYSICAL AND MENTAL HEALTH OUTCOMES OF PRENATAL STRESS IN HUMAN AND ANIMAL STUDIES: A REVIEW OF RECENT EVIDENCE. *Epidemiol* 2008; **22**: 438-466.
2. MITTAL VA, ELLMAN LM, CANNON TD. GENE-ENVIRONMENT INTERACTION AND COMPLICATIONS IN SCHIZOPHRENIA: THE ROLE OF OBSTETRIC COMPLICATIONS. *Schizophr Bull* 2008; **34**: 1083-1094.
3. MORGAN C, KIRKBRIDE J, LEFF J, CRAIG T, HUTCHINSON G, MCKENZIE K, MORGAN C, DAZZAN P, DOODY GA, JONES P, MURRAY R, FEARON P. PARENTAL SEPARATION, PSYCHOSIS IN DIFFERENT ETHNIC GROUPS: A CASE-CONTROL STUDY. *Schizophr Bull* 2007; **33**: 495-503.
4. FATEMI SH, REUTIMAN TJ, FOLSOM TD, SIDWELL RW. THE ROLE OF CEREBELLAR PATHOLOGY OF AUTISM AND SCHIZOPHRENIA. *Schizophr Bull* 2008; **34**: 271-294.
5. FATEMI SH, FOLSOM TD. THE NEURODEVELOPMENTAL HYPOTHESIS OF SCHIZOPHRENIA REVISITED. *Schizophr Bull* 2009; **35**: 528-548.
6. MEYER U, FELDON J. EPIDEMIOLOGY-DRIVEN NEURODEVELOPMENTAL ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA. *Prog Neurobiol* 2010; **90**: 285-326.
7. TEICHER MH, TOMODA A, ANDERSEN SL. NEUROBIOLOGICAL CONSEQUENCES OF EARLY SEVERE DEPRIVATION AND CHILDHOOD MALTREATMENT: ARE RESULTS FROM HUMAN AND ANIMAL STUDIES CONCORDANT? *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1071**: 313-323.
8. MARCO EM, ADRIANI W, LLORENTE R, LAVIOLA G, VIVEROS MP. DETRIMENTAL PSYCHOPHYSIOLOGICAL EFFECTS OF EARLY MATERNAL DEPRIVATION IN ADOLESCENT RODENTS: ALTERED RESPONSES TO CANNABINOID EXPOSURE. *Neurosci Biobehav Rev* 2009; **33**: 498-507.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
9. ELLENBROEK BA, RIVA MA. EARLY MATERNAL DEPRIVATION AS AN ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA. *Clin Neurosci* 2003; **3**: 297-302.
10. LLORENTE R, ARRANZ L, MARCO EM, MORENO E, PUERTO M, GUAZA C, DE LA FM, VIVEROS MP. EARLY MATERNAL DEPRIVATION AND NEONATAL SINGLE ADMINISTRATION WITH DEXAMETHASONE AGONIST INDUCE LONG-TERM SEX-DEPENDENT PSYCHOIMMUNOENDOCRINE EFFECTS IN ADULT RATS. *Psychoneuroendocrinology* 2007; **32**: 636-650.
11. MACRI S, LAVIOLA G. SINGLE EPISODE OF MATERNAL DEPRIVATION AND ADULT CANNABINOID EXPOSURE: PROFILE IN MICE: INTERACTION WITH CANNABINOID EXPOSURE DURING ADULTHOOD. *BehavBrain Res* 2004; **154**: 231-238.
12. SCHMIDT M, ENTHOVEN L, VAN WOEZIK JH, LEVINE S, DE KLOET ER, OITZL MS. EFFECTS OF MATERNAL DEPRIVATION ON THE DYNAMICS OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS DURING MATERNAL DEPRIVATION. *Neuroendocrinol* 2004; **16**: 52-57.
13. ROCERI M, HENDRIKS W, RACAGNI G, ELLENBROEK BA, RIVA MA. EARLY MATERNAL DEPRIVATION REDUCES THE EXPRESSION OF BDNF AND NMDA RECEPTOR SUBUNIT NR2B IN THE HIPPOCAMPUS. *MolPsychiatry* 2002; **7**: 609-616.
14. LLORENTE R, GALLARDO ML, BERZAL AL, PRADA C, GARCIA-SEGURA LM, VIVEROS MP. EARLY MATERNAL DEPRIVATION IN RATS INDUCES GENDER-DEPENDENT EFFECTS ON THE EXPRESSION OF HIPPOCAMPAL AND CEREBELLAR CELLS. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; **17**: 233-241.
15. ELLENBROEK BA, DERKS N, PARK HJ. EARLY MATERNAL DEPRIVATION AFFECTS NEURODEVELOPMENT IN WISTAR-KOJIMA RATS. *Neurosci Lett* 2003; **347**: 247-257.
16. LLORENTE R, O'SHEA E, GUTIERREZ-LOPEZ MD, LLORENTE-BERZAL A, COLADO MI, VIVEROS MP. SEX-DEPENDENT MATERNAL DEPRIVATION EFFECTS ON BRAIN MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN ADOLESCENT RATS. *Neurosci Lett* 2010; **479**: 112-117.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
17. LLORENTE R, LLORENTE-BERZAL A, PETROSINO S, MARCO EM, GUAZA C, PRADA C, GALLARDO M, DI MARZO V, VIVEROS MP. GENDER-DEPENDENT CELLULAR AND MOLECULAR EFFECTS OF MATERNAL DEPRIVATION ON THE HIPPOCAMPUS OF NEONATAL RATS: ROLE FOR THE ENDOCANNABINOID SYSTEM. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; **32**: 1314-1347.
 18. LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. PATTERN RECOGNITION METHODS AND APPLICATIONS IN BIOMEDICAL MAGNETIC RESONANCE. *in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2001; **39**: 1-40.
 19. BARTON SJ, HOWE FA, TOMLINS AM, CUDLIP SA, NICHOLSON JK, BELL BA, GRIFFITHS PJ. COMPARISON OF IN VIVO ¹H MRS OF HUMAN BRAIN TUMOURS WITH ¹H HR-MAS SPECTROSCOPY OF INTACT BIOPSY SAMPLES IN *J Clin Neurosci* 1999; **12**: 1212-1218.
 20. CHENG LL, ANTHONY DC, COMITE AR, BLACK PM, TZIKA AA, GONZALEZ RG. QUANTIFICATION OF MICROHETEROGENEITY IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME WITH HIGH-RESOLUTION MAGIC-ANGLE SPINNING (HRMAS) PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. *Neuro Oncol* 2000; **2**: 87-95.
 21. TZIKA AA, CHENG LL, GOUMNEROVA L, MADSEN JR, ZURAKOWSKI D, ASTRAKAS LG, MCKAY MK, SCOTT RM, ANTHONY DC, GONZALEZ RG, BLACK PM. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF PEDIATRIC BRAIN TUMORS BY USING IN VIVO AND EX VIVO MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. *J Neurosurg* 2002; **96**: 1023-1031.
 22. GONZALEZ RG, CHENG LL, WESTMORELAND SV, SAKAIE KE, BECERRA LR, LEE JH, MASLIAH E, LACKNER AA. EARLY BRAIN INJURY IN THE SIV-MACAQUE MODEL OF ALZHEIMER DISEASE. *J Neurosci* 2000; **14**: 2841-2849.
 23. CHENG LL, NEWELL K, MALLORY AE, HYMAN BT, GONZALEZ RG. QUANTIFICATION OF CHOLINERGIC NEURONS IN ALZHEIMER AND CONTROL BRAINS WITH EX VIVO HIGH RESOLUTION HRMAS SPECTROSCOPY. *J Neurosci* 2002; **22**: 1023-1031.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- SPINNING PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY AND STEREOLOGY. *Magn Reson Imaging* 2002; **20**: 527-533.
24. PRABAKARAN S, SWATTON JE, RYAN MM, HUFFAKER SJ, HUANG JT, GRIFFIN JL, WAY FREEMAN T, DUDBRIDGE F, LILLEY KS, KARP NA, HESTER S, TKACHEV D, MIMMACK YOLKEN RH, WEBSTER MJ, TORREY EF, BAHN S. MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN SCHIZOPHRENIA: EVIDENCE FOR COMPROMISED BRAIN METABOLISM AND OXIDATIVE STRESS. *Psychiatry* 2004; **9**: 684-697, 643.
25. GOTO Y, YANG CR, OTANI S. FUNCTIONAL AND DYSFUNCTIONAL SYNAPTIC PLASTICITY IN THE PREFRONTAL CORTEX: ROLES IN PSYCHIATRIC DISORDERS. *Biol Psychiatry* 2009; **67**: 1199-307.
26. TSENG KY, CHAMBERS RA, LIPSKA BK. THE NEONATAL VENTRAL HIPPOCAMPAL LESION AS A HEURISTIC NEURODEVELOPMENTAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA. *Biol Psychiatry* 2009; **204**: 295-305.
27. VIVEROS MP, LLORENTE R, LOPEZ-GALLARDO M, SUAREZ J, BERMUDEZ-SILVA F, FUENTE M, RODRIGUEZ DE FONSECA F, GARCIA-SEGURA LM. SEX-DEPENDENT ALTERED RESPONSE TO MATERNAL DEPRIVATION IN RATS. *Psychoneuroendocrinology* 2009.
28. TSANG TM, GRIFFIN JL, HASELDEN J, FISH C, HOLMES E. METABOLIC CHARACTERIZATION OF DISTINCT NEUROANATOMICAL REGIONS IN RATS BY MAGIC ANGLE SPINNING ¹H NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. *Radiation Environ Biomed* 2005; **53**: 1018-1024.
29. STOYANOVA R, BROWN MR. *NMR spectral quantitation by principal component analysis. NMR Biomed* 2001; **14**: 271-277.
30. GOVINDARAJU V, YOUNG K, MAUDSLEY AA. PROTON NMR CHEMICAL SHIFTS AND COUPLING CONSTANTS FOR BRAIN METABOLITES. *NMR Biomed* 2000; **13**: 129-153.

- 1
2
3
4
5 31. CHOI IY, LEE SP, GUILFOYLE DN, HELPERN JA. IN VIVO NMR STUDIES OF
6 NEURODEGENERATIVE DISEASES IN TRANSGENIC AND RODENT MODELS. *Neurochem Res*
7 987-1001.
8
9
10
11 32. LÓPEZ-GALLARDO M, LLORENTE R, LLORENTE-BERZAL A, MARCO EM, PRADA C, DI MARZO V,
12 VIVEROS MP. NEURONAL AND GLIAL ALTERATIONS IN THE CEREBELLAR CORTEX OF
13 DEPRIVED RATS: GENDER DIFFERENCES AND MODULATORY EFFECTS OF TWO
14 ENDOCANNABINOID INACTIVATION. *Drugs* 2008; **68**: 1429-1440.
15
16
17
18 33. JANÁKY R, SHAW CA, OJA SS, SARANSAARI P. TAURINE RELEASE IN DEVELOPING
19 HIPPOCAMPUS IS MODULATED BY GLUTATHIONE AND GLUTATHIONE DERIVATIVE
20
21
22
23
24
25
26
27
28 34. OJA SS, SARANSAARI P. PHARMACOLOGY OF TAURINE. *Pharmacol Soc* 2007; **50**:
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40 35. FÈLIX J, LUISA DE L, JUANA U, SONIA P, FERNANDO A, ANTONI C, MERCÈ P, RAFAEL
41 CARME A. CONTENT AND TRAFFIC OF TAURINE IN HIPPOCAMPAL REACTIVE
42
43
44
45
46
47
48
49
50 36. LLORENTE R, LLORENTE-BERZAL A, PETROSINO S, MARCO EM, GUAZA C, PRADA C,
51 GALLARDO M, DI MARZO V, VIVEROS MP. GENDER-DEPENDENT CELLULAR AND
52 EFFECTS OF MATERNAL DEPRIVATION ON THE HIPPOCAMPUS OF NEONATAL RATS:
53
54
55
56
57
58
59
60 37. BAHR BA, KARANIAN DA, MAKANJI SS, MAKRIYANNIS A. TARGETING THE ENDOCANNABINOID
SYSTEM IN TREATING BRAIN DISORDERS. *Expert Opin Ther Targets* 2006; **15**: 351-365.
38. VAN DER STELT M, DI MARZO V. CANNABINOID RECEPTORS AND THEIR ROLE IN NEURODEGENERATION.
NeuromolecularMed 2005; **7**: 37-50.

- 1
2
3
4
5 39. SUÁREZ J, LLORENTE R, ROMERO-ZERBO SY, MATEOS B, BERMUDEZ-SILVA FJ, DE F
6 FR, VIVEROS MP. EARLY MATERNAL DEPRIVATION INDUCES GENDER-DEPENDENT CH
7 EXPRESSION OF HIPPOCAMPAL CB(1) AND CB(2) CANNABINOID RECEPTORS OF NEC
8
9
10
11 *Hippocampus* 2009; **19**: 623-632.
12
13
14 40. BLÜML S, SEYMOUR KJ, ROSS BD. DEVELOPMENTAL CHANGES IN CHOLINE
15
16 ETHANOLAMINE-CONTAINING COMPOUNDS MEASURED WITH PROTON-DECOUPLED
17
18 IN VIVO HUMAN BRAIN. *Magn Reson Med* 1999; **42**: 643-654.
19
20
21 41. IMAMURA K. PROTON MR SPECTROSCOPY OF THE BRAIN WITH A FOCUS ON CHEM
22
23 *Magn Reson Med Sci* 2003; **2**: 117-132.
24
25
26 42. SCHMUED LC, STOWERS CC, SCALLET AC, XU L. FLUORO-JADE C RESULTS IN UL
27
28 RESOLUTION AND CONTRAST LABELING OF DEGENERATING NEURONS.
29
30 31.
31
32
33 43. BIGNAMI A, ENG LF, DAHL D, UYEDA CT. LOCALIZATION OF THE GLIAL FIBRILLA
34
35 PROTEIN IN ASTROCYTES BY IMMUNOFLUORESCENCE. *J Neurosci* 1982; **2**: 129-142.
36
37
38 44. RAMAN L, TKAC I, ENNIS K, GEORGIEFF MK, GRUETTER R, RAO R. IN VIVO EFFECT OF
39
40 HYPOXIA ON THE NEUROCHEMICAL PROFILE OF THE DEVELOPING RAT HI
41
42 *Developmental Brain Research* 2005; **156**: 202-209.
43
44
45 45. ZHANG LX, LEVINE S, DENT G, ZHAN Y, XING G, OKIMOTO D, KATHLEEN GM, POST F
46
47 SMITH MA. MATERNAL DEPRIVATION INCREASES CELL DEATH IN THE INFANT RA
48
49 *ResDevBrain Res* 2002; **133**: 1-11.
50
51
52 46. HALASSA MM, FELLIN T, HAYDON PG. THE TRIPARTITE SYNAPSE: ROLES FOR GLIOT
53
54 IN HEALTH AND DISEASE. *Trends MolMed* 2007; **13**: 54-63.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5 47. HALASSA MM, FELLIN T, HAYDON PG. TRIPARTITE SYNAPSES: ROLES FOR ASTROCYTES
6
7 THE CONTROL OF SYNAPTIC PHYSIOLOGY AND BEHAVIOR. *Neuron* 2009; **57**: 343-
8
9 346.
10
11 48. BERNSTEIN HG, STEINER J, BOGERTS B. GLIAL CELLS IN SCHIZOPHRENIA: PATHOPHYSIOLOGICAL
12
13 SIGNIFICANCE AND POSSIBLE CONSEQUENCES FOR THERAPY. *Expert Opin Ther Targets* 2009; **9**:
14
15 1059-1071.
16
17 49. RAJKOWSKA G, MIGUEL-HIDALGO JJ, MAKKOS Z, MELTZER H, OVERHOLSER J, STOCKMEIER CA.
18
19 LAYER-SPECIFIC REDUCTIONS IN GFAP-REACTIVE ASTROGLIA IN THE DORSOLATERAL
20
21 CORTEX IN SCHIZOPHRENIA. *Schizophr Bull* 2002; **27**: 127-138.
22
23
24
25 50. MITTERAUER B. NONFUNCTIONAL GLIAL PROTEINS IN TRIPARTITE SYNAPSES: A PATHOPHYSIOLOGICAL
26
27 MODEL OF SCHIZOPHRENIA. *Neuroscientist* 2005; **11**: 192-198.
28
29
30 51. RAJKOWSKA G, MIGUEL-HIDALGO JJ. GLIOGENESIS AND GLIAL PATHOLOGY IN DEPRESSION. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; **31**: 219-233.
31
32
33
34 52. SI X, MIGUEL-HIDALGO JJ, O'DWYER G, STOCKMEIER CA, RAJKOWSKA G. AGE-DEPENDENT
35
36 REDUCTIONS IN THE LEVEL OF GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN IN THE PREFRONTAL CORTEX IN
37
38 DEPRESSION. *Neuropsychopharmacology* 2004; **29**: 2088-2096.
39
40
41
42 53. SOFRONIEW MV. MOLECULAR DISSECTION OF REACTIVE ASTROGLIOSIS AND GLIAL PATHOLOGY IN
43
44
45
46
47
48 54. SHIRAYAMA Y, OBATA T, MATSUZAWA D, NONAKA H, KANAZAWA Y, YOSHITOME E, YAMAMOTO
49
50 H, HASHIMOTO K, IYO M. SPECIFIC METABOLITES IN THE MEDIAL PREFRONTAL CORTEX
51
52 ASSOCIATED WITH THE NEUROCOGNITIVE DEFICITS IN SCHIZOPHRENIA: A PRELIMINARY STUDY.
53
54
55
56
57 55. THEBERGE J, BARTHA R, DROST DJ, MENON RS, MALLA A, TAKHAR J, NEUFELD RW, KAPUR S, JAVIER
58
59 J, PAVLOSKY W, SCHAEFER B, DENSMORE M, AL-SEMAAN Y, WILLIAMSON PC. GLUTAMATE
60

1
2
3
4 ANDGLUTAMINE MEASURED WITH 4.0 T PROTON MRS IN NEVER-TREATED PATIENTS
5
6 SCHIZOPHRENIA AND HEALTHY VOLUNTEERS. *Am J Psychiatry* 2002; **159**:1944-1946.

- 7
8
9 56. WOOD SJ, BERGER G, VELAKOULIS D, PHILLIPS LJ, MCGORRY PD, YUNG AR, DESMOND
10
11 PANTELIS C. PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY IN FIRST EPISODE PSYCHOTIC
12
13 ULTRA HIGH-RISK INDIVIDUALS. *Schizophr Bull* 2003; **29**:831-843.

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Peer Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Tables and Figure legends

Table 1. METABOLITES IDENTIFIED FROM THE LOADINGS PLOTS FROM THE PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA), RESPONSIBLE FOR THE SIGNIFICANT DIFFERENCES REPORTED

Metabolite	Chemical Shift H1 (ppm)
LACTATE (LAC)	1.34
N-ACETYTL-ASPARTATE (NAA)	2.02
GLUTAMINE AND GLUTAMATE (GLX)	2.14
GLUTAMATE (GLU)	2.34
CREATINE (CRE)	3.02
TOTAL CHOLINE (TCHO)	3.22
TAURINE (TAU)	3.42
PHOSPHORILETHANOLAMINE (PEA)	3.98

Table 2. MAIN RESULTS ACHIEVED BY HR-MAS ANALYSIS WHEN INVESTIGATING THE CONSEQUENCES OF EARLY MATERNAL DEPRIVATION IN THE BRAIN OF RAT PUPS OF 1 OF POSTNATAL AGE.

Metabolite	Hippocampus	Frontal cortex
LACTATE (LAC)	-----	-----
N-ACETYL ASPARTATE (NAA)	-----	TREND ↓ (MALES)
GLUTAMINE AND GLUTAMATE (GLX)	↓	↓
CREATINE (CRE)	-----	-----
TAURINE (TAU)	↑	↑
TOTAL CHOLINE (TCHO)	↑ (MALES)	-----
PHOSPHORILETHANOLAMINE (PEA)	↑	-----

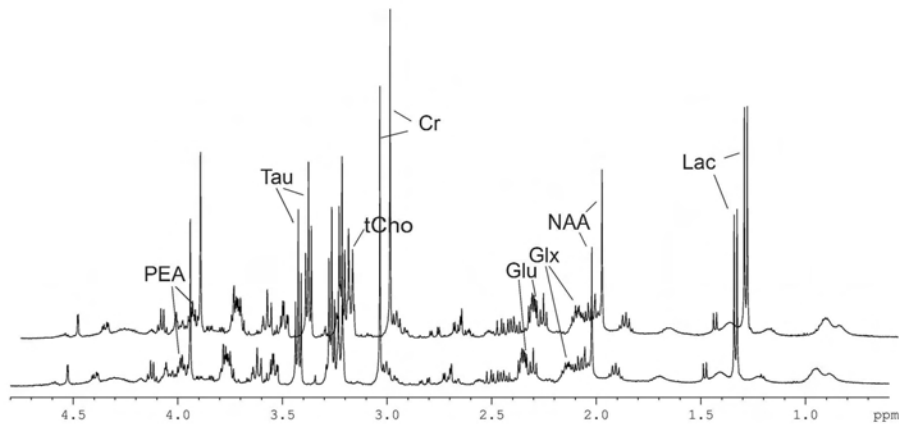
1
2
3
4
5 **Figure 1.** EXAMPLE OF REPRESENTATIVE HR-MAS SPECTRA FROM A CONTROL (ABOVE) AND
6
7 MATERNAL DEPRIVED (BELLOW) RAT HIPPOCAMPUS ACQUIRED AT 11.7 T. MAIN BRAIN METABOLITES
8
9 MEASURED WITHIN THE FRONTAL CORTEX AND THE HIPPOCAMPUS ARE REPORTED IN TABLE 1
10
11 RESPECTIVELY. LAC, LACTATE; NAA, N-ACETYL-ASPARTATE; GLX (GLUTAMINE + GLUTAMATE);
12
13 GLUTAMATE; CRE, CREATINE; TCHO, TOTAL CHOLINE; TAU, TAURINE AND PEA, PHOSPHOETHANOLAMINE
14
15
16
17

18
19 **Figure 2.** MULTIVARIATE DATA ANALYSIS OF HR-MAS SPECTRA FROM INTACT SAMPLES OF
20
21 AND PREFRONTAL CORTEX USING PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA). A) PC2 VS PC1
22
23 B) THE CORRESPONDING LOADING PLOTS OF PCA. BLACK AND BLUE POINTS REPRESENT
24
25 MALES AND FEMALES, RESPECTIVELY, WHILE GREEN AND RED MATERNALLY DEPRIVED MALES
26
27 AND FEMALES, RESPECTIVELY.
28
29
30
31
32

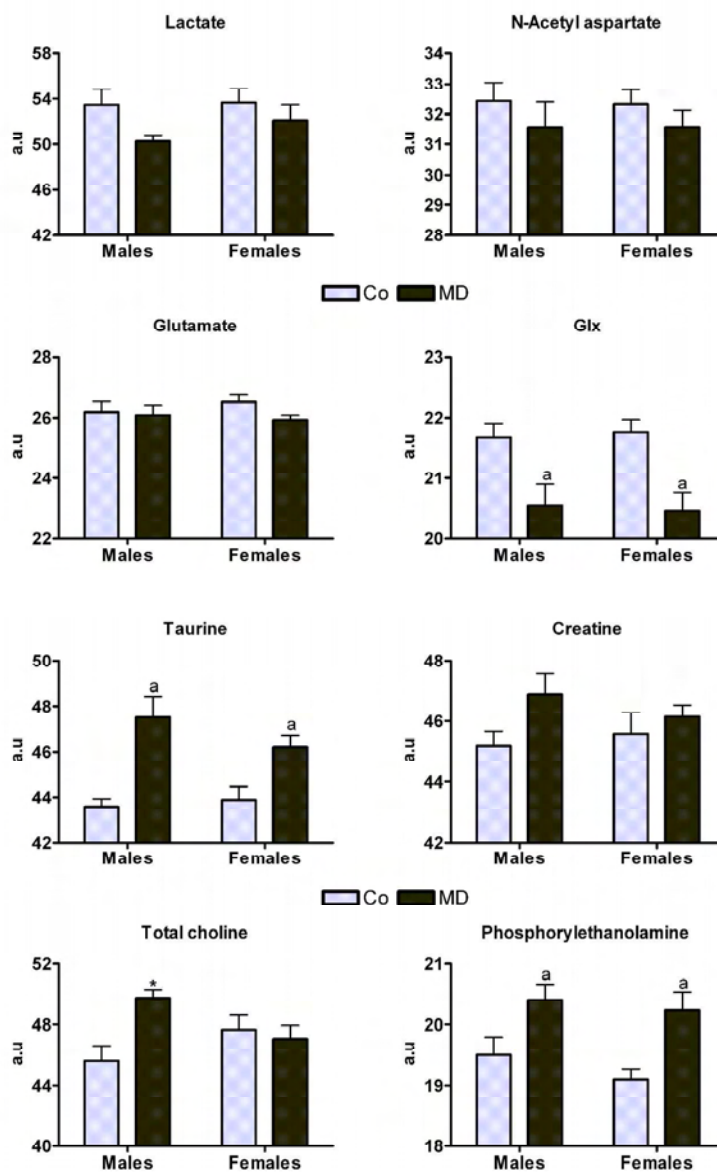
33 **Figure 3.** PRINCIPLE METABOLITES DETECTED BY HR-MAS IN THE HIPPOCAMPUS OF RAT
34
35 PND 13) FOLLOWING A SINGLE EPISODE OF MATERNAL DEPRIVATION (24 H ON PND 9). HISTOGRAMS SHOW
36
37 THE MEAN VALUE \pm STANDARD ERROR (N=8) OF REPRESENTATIVE BUCKET SIGNAL. CO, CONTROL
38
39 MATERNAL DEPRIVATION. MANOVA AND TUKEY POST-HOC COMPARISONS, (A) OVERALL
40
41 *vs* CO MALES.
42
43
44
45
46

47 **Figure 4.** PRINCIPLE METABOLITES DETECTED BY HR-MAS IN THE PREFRONTAL CORTEX OF
48
49 PND 13) FOLLOWING A SINGLE EPISODE OF MATERNAL DEPRIVATION (24 H ON PND 9). HISTOGRAMS SHOW
50
51 THE MEAN VALUE \pm STANDARD ERROR (N=8) OF REPRESENTATIVE BUCKET SIGNAL. CO, CONTROL
52
53 MATERNAL DEPRIVATION. MANOVA AND TUKEY POST-HOC COMPARISONS: (A) OVERALL M
54
55
56
57
58
59
60

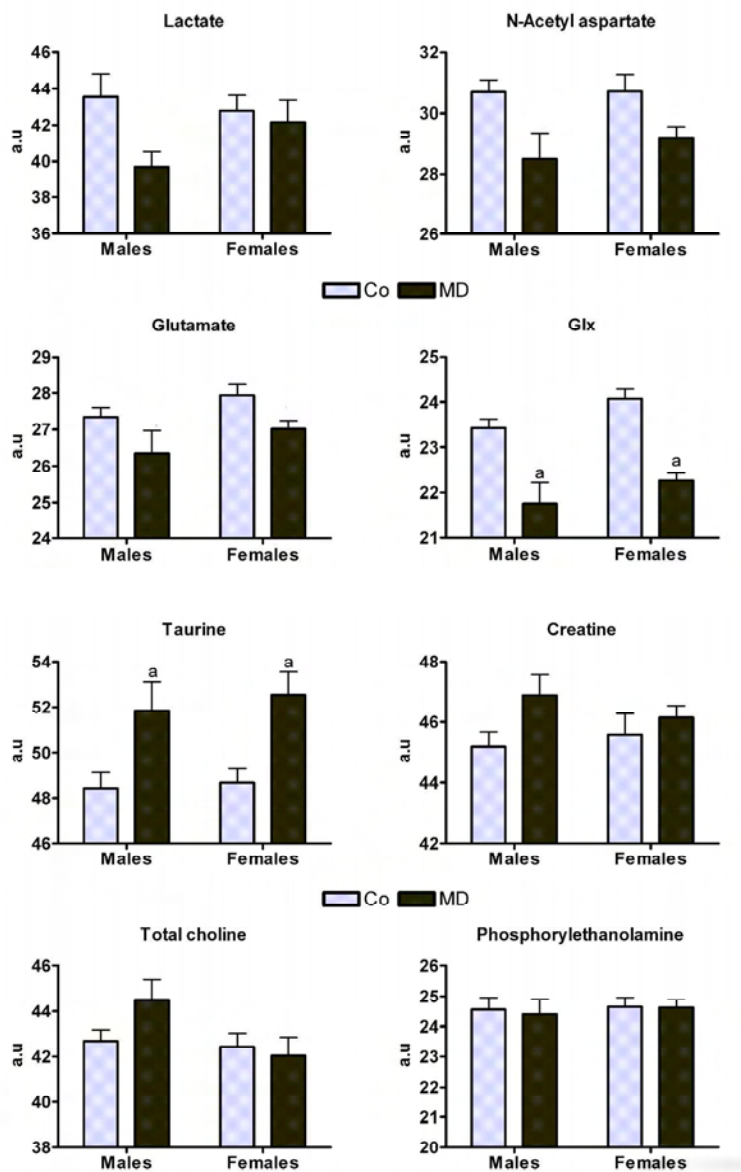
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



170x87mm (600 x 600 DPI)



Levels of the principle metabolites detected by HR-MAS in the hippocampus of rat pups (PND 13) following a single episode of maternal deprivation (24 h on PND 9). Levels of the metabolites are given in arbitrary relative units. Histograms represent the mean value \pm standard error (n=8). Co, control and MD, maternal deprivation. ANOVA and Tukey post-hoc comparisons, (a) overall MD effect; * vs Co males
170x266mm (600 x 600 DPI)



170x266mm (600 x 600 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES

Con este estudio, el primero que aplica la técnica de HR-MAS ^1H NMR a este modelo de separación materna, hemos podido comprobar como este estrés neonatal ha provocado cambios en el perfil metabólico de dos áreas cerebrales, hipocampo y corteza prefrontal, estrechamente relacionadas con la sintomatología observada en diversas enfermedades neuropsiquiátricas.

El patrón metabólico descrito para los animales sometidos al episodio de separación materna es significativamente diferente del observado en los animales control en las dos regiones estudiadas. En concreto, los animales separados de su madre durante el periodo neonatal mostraron, en hipocampo y corteza prefrontal, niveles reducidos de glutamato y glutamina (glx), así como un incremento en los niveles del aminoácido taurina. También se observó una reducción en los niveles de N-acetil aspartato (NAA) en la corteza prefrontal, así como un incremento de forforiletanolamina (PEA) en el hipocampo. Otros cambios inducidos por la separación materna mostraron un patrón sexodimórfico, observándose niveles mayores de colina (Cho) en el hipocampo de ratas machos sometidas al estrés de la separación materna neonatal. También fue encontrada una tendencia a presentar unos niveles reducidos de lactato sólo en los machos expuestos al protocolo de separación materna.

Estos cambios no sólo indican que un único episodio de separación materna durante 24 horas es capaz de cambiar el perfil metabólico en al menos dos áreas cerebrales, si no que sugieren la naturaleza de diversos procesos que pueden estar implicados. El aumento de NAA y PEA indica procesos de tipo neurodegenerativo; los cambios en los niveles de lactato sugieren alteraciones en el balance energético cerebral; mientras que las diferencias encontradas en los niveles de glutamato y glutamina apuntan a posibles alteraciones en el sistema de neurotransmisión glutamatérgica. Las diferencias encontradas en el perfil metabólico de hipocampo y corteza prefrontal en nuestro modelo de separación materna temprana podrían abrir nuevos caminos en la investigación translacional permitiendo la identificación de biomarcadores de utilidad en el diagnóstico precoz de las diversas enfermedades neuropsiquiátricas, así como la evaluación y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

**BLOQUE III. HIPÓTESIS DEL
"DOBLE IMPACTO"**

Efectos psiconeuroendocrinos a largo plazo de la separación materna y un protocolo de estrés crónico impredecible durante la edad juvenil. Implicaciones de la hipótesis del “doble impacto”.

En los anteriores bloques de la presente Tesis Doctoral hemos demostrado como nuestro modelo de separación materna neonatal es capaz de provocar alteraciones, tanto a largo plazo (ver Bloque I), como a corto plazo (ver Bloque II), a nivel comportamental, endocrino, inmunológico, metabólico y celular. Todos estos cambios apoyan nuestra hipótesis de la validez de este modelo en el ámbito de la hipótesis del neurodesarrollo de enfermedades psiquiátricas.

A largo plazo hemos descrito los efectos de este protocolo en animales que han alcanzado la adolescencia, uno de los periodos críticos del desarrollo, y que supone la transición desde la infancia a la vida adulta (ver Bloque I). Este periodo es muy importante para la maduración de diversas áreas cerebrales relacionadas con la motivación, la función cognitiva y la respuesta al estrés, tales como la corteza prefrontal y las estructuras límbicas (Crews *et al.*, 2007; Ernst *et al.*, 2009; García-Segura, 2009; Laviola *et al.*, 2003; McCormick y Mathews, 2010; Romeo, 2010; Spear, 2000) y representa una etapa de particular vulnerabilidad del cerebro, por ejemplo a los efectos de factores ambientales estresantes y drogas de abuso (Avital y Richter-Levin, 2005; Bazak *et al.*, 2009; Crews *et al.*, 2007; McCormick y Mathews, 2010; Romeo, 2010; Tsoory *et al.*, 2007). De hecho, el periodo adolescente parece ser una “ventana crítica de tiempo” en lo referente al desarrollo de ciertos trastornos neuropsiquiátricos (Adriani y Laviola, 2004). Se ha observado que el estrés crónico durante la adolescencia es capaz de provocar a largo plazo alteraciones cognitivas, especialmente en lo referente a la memoria espacial, como se ha descrito en pruebas como el laberinto de agua de Morris (Avital y Richter-Levin, 2005; Isgor *et al.*, 2004) y el laberinto en Y (Sterlemann *et al.*, 2010), asociadas, además, con déficits en el volumen hipocampal, una menor plasticidad sináptica y una menor expresión de los receptores hipocampales para los

glucocorticoides (Isgor *et al.*, 2004; McCormick y Mathews, 2010; Sterlemann *et al.*, 2010).

A finales de los años 90, principios de 2000, algunos autores plantearon la hipótesis del “doble impacto” (*Two Hits*) para tratar de explicar el origen multifactorial de la esquizofrenia (Bayer *et al.*, 1999; Maynard *et al.*, 2001), aunque actualmente se ha utilizado para modelizar otros tipos de trastornos, como aquellos relacionados con psicopatologías debidas al estrés, tales como desórdenes asociados a la ansiedad o la depresión [ver (Cirulli *et al.*, 2009; Kjør *et al.*, 2010)]. Según esta hipótesis alteraciones durante las primeras etapas del desarrollo, debidas a factores ambientales y/o genéticos, representarían un “primer impacto” que podría incrementar la susceptibilidad a desarrollar una enfermedad psiquiátrica cuando se añade un factor adicional estresante (“segundo impacto”) en una etapa posterior de la vida. En base a esta hipótesis, usando la separación materna (24 horas a día 9 postnatal) como un “primer impacto” y una administración crónica de corticosterona (2 semanas a partir de la semana 8 de vida) como “segundo impacto”, se han descrito alteraciones en la regulación dopaminérgica de la inhibición prepulso (PPI), -medida de la capacidad de filtrado de la información sensorial que es deficiente en enfermos esquizofrénicos- evaluada a las 12 semanas de edad postnatal (Choy y van den Buuse, 2008). Usando el mismo modelo también se han descrito alteraciones en la expresión de factores de crecimiento como el BDNF en el hipocampo, acompañadas de un aprendizaje retardado en la prueba del laberinto de Morris, y un clara deficiencia en la prueba del laberinto en Y, que mide memoria espacial a muy corto plazo (Choy *et al.*, 2008). La aparición de alteraciones cognitivas es una de las características comunes en varios desórdenes psiquiátricos (por ejemplo esquizofrenia), hasta el punto de considerarse éstas como un signo más del padecimiento de estos trastornos en humanos (Burdick *et al.*, 2009). Por lo tanto el uso de pruebas que evalúen la función cognitiva (por ejemplo, memoria de trabajo o memoria espacial) en los animales sometidos al “doble impacto”, puede representar una valiosa herramienta para analizar sus consecuencias.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, y los resultados obtenidos en los estudios previos de esta Tesis Doctoral, nos propusimos, como último objetivo particular, investigar, dentro del contexto de la **hipótesis del “doble impacto”**, las **consecuencias psiconeuroendocrinas a largo plazo (vida adulta) de nuestro protocolo de estrés**

neonatal (“primer impacto”) más un protocolo de estrés crónico impredecible (ECI), durante el periodo adolescente (desde el día postnatal 28 al 43). Considerando la relación entre ciertos trastornos psiquiátricos y las alteraciones cognitivas (Burdick et al., 2009) y la información previa sobre los efectos descritos en los protocolos de estrés crónico sobre el BDNF, así como sobre el aprendizaje y la memoria (Choy *et al.*, 2009; Isgor *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009), nos hemos centrado en estudiar **cambios en diferentes tipos de memoria**. Hemos profundizado en los cambios a nivel hipocampal de **moléculas de plasticidad sináptica estrechamente relacionadas con los procesos de memoria y aprendizaje**, tales como el BDNF, y proteínas de plasticidad sináptica como la sinaptofisina y NCAM, que se ven afectadas por el estrés neonatal (Aisa *et al.*, 2009; Law *et al.*, 2009) o crónico (Sterlemann *et al.*, 2010; Thome *et al.*, 2001). Pretendíamos establecer posibles correlaciones entre la alteración de la función cognitiva y modificaciones en la expresión de dichas moléculas. En relación a los datos obtenidos en experimentos anteriores que indicaban cambios inducidos por la separación materna, tanto a largo como a corto plazo a nivel hipocampal e hipotalámico, especialmente aquellos relacionados con el eje HHA, hormonas sexuales y control del balance energético [ver bloque 2 y (Viveros *et al.*, 2010a; Viveros *et al.*, 2010b)], analizamos en este experimento los siguientes parámetros: **expresión de receptores GR y el MR** hipocampales implicados en la regulación del eje HHA; **niveles circulantes de testosterona y estradiol** como medida del efecto de ambas experiencias estresantes sobre el eje gonadal y **evolución del peso corporal y niveles de leptina** como control de los mecanismos reguladores del balance energético. Utilizamos animales de ambos sexos, con el fin de analizar posibles dimorfismos sexuales.

Los experimentos donde se encuentran descritos estos resultados están reflejados en el artículo:

Llorente R et al (2011). Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. **J Neuroendocrinol. 23: 329-44**

Publicado on-line: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2826.2011.02109.x/abstract>

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos indicaron que tanto la separación materna neonatal durante 24 horas a día 9 postnatal, como un protocolo de estrés crónico impredecible en la adolescencia tienen consecuencias a nivel comportamental, endocrino y neuroquímico en los animales adultos (día 90 postnatal). Como detallamos más abajo, en los animales que recibieron ambos tipos de estrés se observó un potente efecto sobre las moléculas de plasticidad sináptica analizadas.

Principales efectos de la separación materna

1. Pruebas de comportamiento

1.1. En el día 44 postnatal no se apreciaron efectos significativos de la separación materna en el laberinto en cruz elevado.

1.2. A los 70 días de edad, en la prueba de alternancia espontánea se apreciaron las primeras diferencias provocadas por la separación materna *per se*, que además son dependientes del sexo. En los machos separados se observó un incremento en el número de entradas a los diferentes brazos comparado con los no separados, algo que no se apreció en las hembras. Este parámetro, además, fue diferente en machos y hembras controles, presentando estas últimas mayor número de entradas. En el índice de discriminación o alternancia (ID) no se observó ningún efecto de la separación materna.

1.3. En el test de reconocimiento de objeto se vio un claro efecto de la separación materna *per se* en los machos, tanto en el tiempo que tardan en explorar por primera vez el objeto durante la fase de entrenamiento, que se ve aumentado, como en el índice de discriminación (ID), que fue muy bajo en estos animales respecto a los no separados, indicando un importante deterioro de la memoria. Antes del test de reconocimiento de objeto los animales realizaron la prueba de localización de objeto con el mismo protocolo empleado por nosotros en un estudio anterior (Mateos *et al.*, 2010). Sin embargo, en este caso los animales en general invirtieron muy poco tiempo en la exploración de los

objetos, no alcanzando ningún animal del grupo control unos valores de ID normales. Por esta razón no pudimos validar los resultados de esta prueba.

2. Receptores de glucocorticoides hipocampales

Se vio un efecto de la separación materna, dependiente del sexo, en los receptores hipocampales para glucocorticoides GR. En los machos separados en el área CA1, en CA3 y en el Giro Dentado se observó una reducción de la expresión de ARNm para GR, aunque sólo alcanza la significación estadística en CA3. En las hembras no se apreció ninguna diferencia significativa debido a la separación. Respecto al receptor MR, no se encontró ningún efecto significativo de la separación materna *per se*.

3. Expresión de proteínas implicadas en plasticidad sináptica en hipocampo

La separación materna *per se* provocó una reducción significativa tanto de BDNF como de sinaptofisina en el Giro Dentado, independientemente del sexo de los animales. En los machos esta reducción afectó además a CA1 y CA3. La expresión de NCAM no se vio afectada por este tipo de estrés neonatal.

4. Hormonas

4.1. En la vida adulta (día 90 postnatal), y como ya había sido descrito para ratas de 75 días de edad (Viveros et al., 2010b), se observó una reducción en los niveles de leptina circulante en los machos debido al protocolo de separación materna. También se encontró una diferencia sexual en los niveles de leptina circulante de los animales controles, siendo ésta significativamente más baja en hembras que en machos.

4.2. Respecto a los niveles circulantes de hormonas sexuales, los machos separados mostraron menores niveles de testosterona que los controles, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística. Sí se observó un efecto significativo en los niveles de estrógenos, claramente más bajos en los machos que habían sido separados el día 9 postnatal al compararlos con los no separados.

5. La separación materna indujo una notable reducción del peso corporal. Como se ha visto en el capítulo 1, este descenso se aprecia desde el momento final de la

separación materna (día 10 de vida postnatal) hasta bien avanzada la adolescencia (aproximadamente el día 34), tanto en machos como en hembras.

Efectos del estrés crónico impredecible (ECI)

1. Comportamiento

1.1. Se observó que este protocolo causaba, 24 horas después de su finalización (día 44 postnatal), un aumento en el porcentaje de entradas y tiempo en brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado, tanto en machos como en hembras.

1.2. En cuanto a efectos sobre la función cognitiva a largo plazo, el ECI provocó una reducción significativa del índice de discriminación (ID) en el test de reconocimiento de objeto, tanto en los machos como en las hembras, y en el caso de los primeros, independientemente de si estos fueron separados de la madre o no.

2. Receptores de glucocorticoides hipocampales

El ECI pareció tener un claro efecto sexodimórfico sobre los niveles de ARNm para el MR, ya que tendía a aumentarlo en los machos y a provocar su reducción en las hembras, tanto en el Asta de Ammon, como en el Giro Dentado.

3. Expresión de proteínas implicadas en plasticidad sináptica en hipocampo

El ECI *per se* provocó una reducción de la expresión de sinaptofisina en el hipocampo de machos y hembras. En el caso de la NCAM esta reducción fue sólo significativa en los machos, no existiendo efecto en las hembras o siendo éste el opuesto (como ocurre en el Giro Dentado). En este caso la expresión de BDNF no se vio afectada.

4. Hormonas

Respecto a los efectos a nivel endocrino, se observó una reducción de estradiol circulante en los machos debido a este protocolo de estrés crónico, que se da tanto en machos separados como en los que no lo fueron. En las hembras no se apreció ninguna diferencia.

Interacciones entre la separación materna y el estrés crónico impredecible en período adolescente

1. Comportamiento

1.1. En el laberinto en cruz elevado el efecto sobre el porcentaje de entradas a brazos abiertos que provocaba el ECI fue revertido parcialmente por la separación materna en los machos, en los que también se vio incrementada la frecuencia de entrada a brazos cerrados debido a la combinación de ambos protocolos.

1.2. En la prueba de alternancia espontánea la combinación de ambos protocolos de estrés provocó un incremento del ID en las hembras, mientras que no se apreciaron diferencias significativas en los machos.

1.3. En el test de reconocimiento de objeto la combinación de ambos tratamientos indujo una reducción en el ID de los machos. En las hembras se observó también una reducción, aunque ésta no alcanzó la significación estadística.

2. Receptores de glucocorticoides hipocampales

El ECI revirtió la reducción de ARNm de GR que se observó en el área hipocampal CA1 de los machos separados.

3. Expresión de proteínas implicadas en plasticidad sináptica en hipocampo

Es en la expresión de las proteínas relacionadas con neurogénesis y sinaptogénesis donde los efectos de la combinación de ambos tratamientos se hacen más patentes. Así, en los machos sometidos primero a separación materna neonatal y al ECI después, se observa una clara reducción de la expresión de BDNF tanto en CA3 como en Giro Dentado, donde la combinación de ambos efectos provocó una reducción mayor de la que provocaba la separación materna *per se*. En el caso de las hembras, la combinación de ambos tratamientos reduce los niveles de este factor de crecimiento de forma significativa cuando es comparado con el grupo que ha sido sometido al protocolo de estrés crónico pero no separado. Respecto a la sinaptofisina y la NCAM, la combinación de ambos

protocolos también indujo una reducción significativa en todas las áreas hipocampales estudiadas, independientemente del sexo del animal.

4. Hormonas

La combinación de ambos protocolos revierte la reducción de leptina observada en los machos separados, pero provoca una reducción significativa tanto en los niveles de estradiol como de testosterona circulante en este mismo sexo.

5. Los machos separados y sometidos a ECI fueron los que mostraron un menor peso corporal a lo largo de todo el periodo experimental.

En resumen, la separación materna durante la etapa neonatal y/o la exposición a un estrés crónico impredecible durante el periodo periadolescente indujeron alteraciones deletéreas en la memoria (prueba de reconocimiento de objeto), así como una reducción en la plasticidad hipocampal y unos niveles plasmáticos alterados de leptina, estradiol y testosterona. Estos cambios hormonales, junto con la modificación en el peso corporal, podrían reflejar alteraciones metabólicas crónicas así como una función reproductora deficiente. Los machos mostraron una mayor vulnerabilidad que las hembras en lo referente a los cambios endocrinos como consecuencia de los protocolos de estrés. La combinación de ambas experiencias estresantes tuvo un importante y negativo impacto sobre la expresión de moléculas relacionadas con la plasticidad sináptica en ambos sexos. Los modelos animales de desórdenes neuropsiquiátricos raramente contemplan la existencia de dimorfismos sexuales. Los datos aquí presentados enfatizan la necesidad de analizar el efecto del sexo para tener una visión más completa en relación al impacto de factores estresantes en períodos críticos del desarrollo temprano sobre la psicofisiología del animal en etapas posteriores de la vida.

DISCUSIÓN

Los estudios recogidos en la presente Tesis Doctoral proporcionan una amplia y detallada caracterización psiconeuroendocrina del modelo de separación materna y avalan su validez para investigar aspectos concretos de la hipótesis del neurodesarrollo. Hemos empleado un enfoque multidisciplinar y analizado los efectos de la separación materna temprana durante periodos críticos del neurodesarrollo. De manera específica, nos hemos centrado en los posibles efectos a corto plazo, durante la edad neonatal, y en las consecuencias de la separación materna en edad adolescente. Durante este período el cerebro, aún en pleno desarrollo, muestra aún una plasticidad única y experimenta importantes cambios estructurales y funcionales. Más aún, la adolescencia representa una etapa de la vida en la que se manifiestan por primera vez algunos signos y síntomas asociados a determinadas enfermedades neuropsiquiátricas [ver para revisión (Adriani y Laviola, 2004; Spear, 2000)], lo que hace aún más interesante su estudio desde el enfoque de la hipótesis del neurodesarrollo. Así mismo, hemos analizado el impacto de la separación materna a más largo plazo, una vez que los animales alcanzaron la edad adulta

A lo largo de este estudio se ha intentado dilucidar algunos de los substratos neurobiológicos que subyacen a las alteraciones neuroendocrinas y comportamentales asociadas a la separación materna temprana. Para ello se han realizado diversos estudios inmunohistoquímicos con el fin de conocer el status neuronal y de las células de glía, y se ha analizado el estado funcional de sistemas de neurotransmisión relevantes para el mantenimiento de la homeostasis emocional, y con un importante papel en ciertos trastornos psiquiátricos. De modo particular nos hemos centrado en el estudio de los sistemas endocannabinoide, serotoninérgico, y dopaminérgico. El sistema más extensamente investigado ha sido el sistema cannabinoide endógeno (SCE). Por un lado, se ha analizado la incidencia de nuestro modelo de separación materna temprana en el desarrollo de este sistema. Por otro, se han evaluado las interacciones entre nuestro protocolo de estrés y la acción de diversos fármacos de naturaleza cannabinoide. A este respecto se ha empleado un agonista cannabinoide directo, WIN 55,212-2, así como inhibidores de la recaptura y degradación de ligandos endocannabinoides, araquidonoil serotonina (AA-5-HT) y OMDM-2, respectivamente (consúltese el capítulo 3). De este modo se ha probado que la alteración del SCE, tanto de forma directa (con un agonista),

como indirecta (aumentando el tono endógeno de los agonistas endocannabinoides) es capaz de alterar los efectos de la separación materna.

Por último, se han evaluado los efectos a largo plazo de dos manipulaciones ambientales de tipo estresante durante periodos críticos del desarrollo: una de tipo agudo en la edad neonatal (separación materna temprana) y otra de carácter crónico durante la adolescencia (estrés crónico impredecible). Se estudiaron sus posibles efectos psiconeuroendocrinos en la edad adulta como modelo de la “Hipótesis del doble impacto” en el desarrollo de diversas enfermedades neuropsiquiátricas. Estos experimentos contemplaron la exposición a cada una de las manipulaciones de forma independiente, así como la combinación de ambos protocolos estresantes.

En todos los experimentos se han estudiado posibles diferencias sexuales, cuestión que es, a nuestro juicio, uno de los puntos fuertes de esta Tesis Doctoral, ya que el análisis de los dimorfismos sexuales ha venido siendo un aspecto poco estudiado en el ámbito de la salud mental, tanto a nivel clínico como epidemiológico y también en experimentación con animales. Si bien en los últimos años se observa una mayor concienciación en este aspecto.

1. RESPECTO AL MODELO DE SEPARACIÓN MATERNA NEONATAL

En este trabajo hemos descrito una gran variedad de alteraciones como consecuencia de un único episodio, de larga duración (24h), de separación materna en el periodo neonatal temprano (el día 9 de vida postnatal). Los resultados obtenidos han incrementado significativamente nuestro conocimiento sobre las consecuencias de este estrés neonatal desde el nivel molecular hasta el pisofisiológico (ver tablas 3 y 4).

Tabla 3. Principales efectos psiconeuroinmunoendocrinos de la separación materna temprana (9-10 postnatal) en ratas adolescentes (28-43 postnatal) de ambos sexos

	Machos	Hembras
<i>Efectos sobre la masa corporal</i>		
	Reducción de masa corporal desde el día 10 postnatal hasta la adolescencia (día 36-40 postnatal), siendo los machos más susceptibles a este efecto.	
<i>Efectos comportamentales</i>		
	Reducción de la actividad motora horizontal y vertical (30 postnatal)	
	Aumento del tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada, indicativo de un fenotipo de tipo depresivo (34-35 postnatal)	
<i>Efectos neuroquímicos</i>		
	Incremento de los niveles de 5-HT en la corteza prefrontal, el hipocampo, el estriado y el mesencéfalo	
	Incremento significativo de los niveles de DA en la corteza prefrontal y el estriado	

5-HT, serotonina; DA, dopamina,

Tabla 4. Principales efectos psiconeuroinmunoendocrinos de la separación materna temprana en ratas adultas (≥ 70 postnatal) de ambos sexos.

	Machos	Hembras
<i>Efectos comportamentales</i>		
	Incremento de la actividad locomotora	
	Déficit cognitivo evaluado en la prueba de reconocimiento de objeto.	
<i>Efectos moleculares</i>		
	Reducción de la expresión de ARNm para GR en CA1 y CA3 hipocampal.	
	Descenso significativo en la expresión de sinaptofisina, en CA1 y giro dentado. En CA3 esta reducción es sólo significativa en machos.	
	Decremento en la expresión de ARNm para BDNF en el giro dentado	
<i>Efectos endocrinos</i>		
	Reducción en los niveles de leptina plasmática	
	Reducción de los niveles circulantes de estradiol y testosterona	

ARNm; ácido ribonucleico mensajero; GR, receptor glucocorticoide; BDNF; factor neurotrófico derivado del cerebro.

1.1. EFECTOS COMPORTAMENTALES Y METABÓLICOS

La separación materna indujo una clara reducción del peso corporal que era evidente ya el día 10 de vida postnatal, inmediatamente después del episodio de separación materna. Este efecto sobre el peso corporal se prolongó durante la edad adolescente, siendo más marcado en machos. Este resultado ha sido encontrado de forma consistente a lo largo de esta Tesis Doctoral así como en otros estudios de nuestro grupo [capítulos 1, 7 y (Viveros *et al.*, 2010b)], y corrobora los datos encontrados previamente por otros autores (Ellenbroek *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 1999). La

reducción en el peso corporal inmediatamente después de la separación materna puede considerarse una consecuencia lógica de la falta de alimento durante un tiempo prolongado, consecuentemente, a corto plazo también se observa una importante reducción en los niveles circulantes de glucosa y leptina en relación a los animales controles no separados (Viveros *et al.*, 2010a). Los niveles de glucosa circulante se normalizaron con relativa rapidez sin embargo el peso de los animales separados siguió siendo menor hasta bien entrada la edad adolescente, lo que sugiere la inducción de cambios metabólicos a largo plazo.

El episodio de separación materna temprana suprime las tareas de cuidado materno de limpieza y atusamiento de las crías y, según hemos podido constatar en otros trabajos, parece alterar el patrón de cuidados parentales en los momentos posteriores al episodio de separación materna (Llorente-Berzal *et al.*, 2010). En experimentos previos considerando que cada madre criaba media camada de individuos control y otra media de individuos separados, se demostró la importancia de las interacciones madre-cría ya que el efecto de la separación materna pareció afectar no sólo a las crías sino también a las madres (Ellenbroek y Cools, 2002).

La separación materna afectó a los niveles circulantes de leptina, hormona esencial en el control del balance energético. La leptina es una citoquina que se produce principalmente en el tejido adiposo (Coll *et al.*, 2007) y cuyos niveles en sangre están estrechamente relacionados con la masa corporal (Argente *et al.*, 1997; Smith y Waddell, 2003). La leptina presenta funciones a nivel periférico, modulando el metabolismo lipídico, y a nivel hipotalámico, donde promueve la expresión de factores anorexigénicos (Coll *et al.*, 2007). En nuestros experimentos se ha observado que la separación materna induce una reducción drástica en los niveles plasmáticos de leptina durante el período de separación materna que se mantiene varias horas tras la reunión con la madre (Viveros *et al.*, 2010a) y al día 13 postnatal. Este efecto sobre los niveles de leptina presenta un curioso perfil ya que el efecto desaparece durante la adolescencia (día 35 postnatal) pero vuelve a hacerse evidente en la edad adulta (día 75 y 90 postnatal) [ver capítulo 7 y (Viveros *et al.*, 2010b)]. Estos datos indican importantes alteraciones metabólicas en los animales separados de la madre. La adiponectina es otra citoquina producida mayoritariamente en el tejido adiposo y que parece proteger del acumulo de grasa en tejido muscular e hígado (Mullen *et al.*, 2009; Shklyayev *et al.*, 2003; You *et al.*, 2005). Esta hormona presenta niveles mayores en animales delgados en relación con animales obesos, y sus niveles aumentan al producirse una importante

pérdida de peso (Donoso *et al.*, 2010; Milan *et al.*, 2002). De forma similar a lo observado para los niveles de leptina, los niveles de adiponectina no se ven alterados en los animales sometidos a la separación materna adolescentes (día 35 postnatal), mientras que sí se observa una reducción en los niveles de esta hormona en los separados de la madre de ambos sexos cuando alcanzan la edad adulta (Viveros *et al.*, 2010b). Los cambios endocrinos en los niveles de leptina y adiponectina a largo plazo parecen confirmar el hecho de que la separación materna afecta importantes mecanismos relacionados con los procesos reguladores del balance energético. Así pues, el efecto de la separación materna sobre la evolución de peso corporal no es únicamente consecuencia del ayuno forzado al cual los animales son sometidos en edad neonatal (24h el día 9 de vida postnatal), sino también a cambios en los niveles de hormonas, como la leptina y la adiponectina, implicados en la regulación energética. Los resultados obtenidos en este trabajo nos han llevado a continuar analizando los efectos de la separación materna sobre el desarrollo del hipotálamo y a continuar la línea de sus efectos a nivel metabólico.

A lo largo de esta Tesis Doctoral hemos demostrado cómo tras un periodo de separación materna de 24 horas a día postnatal 9, se producen importantes cambios en el comportamiento tanto en edad adolescente como en edad adulta. En la prueba del tablero con agujeros, se ha observado como la separación materna neonatal provoca una reducción en la frecuencia de postura erguida, índice relacionado con la actividad motora vertical en los animales adolescentes. En esta misma línea encontramos resultados previos del grupo de Ellenbroek donde, en edad neonatal (12-18 días de edad), ya observaba este efecto hipo-locomotor debido a la separación materna temprana (Ellenbroek *et al.*, 2005). Estas alteraciones de la actividad vertical de los animales podrían relacionarse con las alteraciones que hemos encontrado tanto en neuronas como en células de glía del cerebelo en desarrollo de los animales separados de la madre (capítulo 4). Cabe destacar el marcado perfil sexodimórfico de este efecto donde los animales macho parecen más vulnerables que las hembras a los efectos de la separación materna sobre los parámetros de actividad motora.

También observamos un fenotipo de carácter depresivo en los animales adolescentes sometidos en edad neonatal al episodio de separación materna, tal y como indica el aumento en el tiempo de inmovilidad registrado en el test de natación forzada. Este comportamiento podría estar relacionado con una inadecuada adaptación a

situaciones de estrés. En consonancia con nuestros resultados, previamente se había demostrado que ratones separados de su madre el día 12 de vida postnatal mostraban un aumento del tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada, así como una reducción en diversos parámetros relacionados con la interacción social. De este modo, los autores propusieron la separación materna temprana como un modelo animal capaz de precipitar la aparición de ciertos síntomas de tipo depresivo (Macri y Laviola, 2004).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican además que la separación materna produce a largo plazo (en esta ocasión nos referimos a resultados obtenidos en la edad adulta) un notable deterioro de las funciones cognitivas. Los animales separados neonatalmente de sus madres presentaron una clara reducción del índice de discriminación (es decir una reducción de memoria) en la prueba de reconocimiento de objetos (capítulo 7), (Ennaceur y Delacour, 1988). Una vez más, los machos parecen ser más sensibles que las hembras a los efectos deletéreos de la separación materna, en este caso sobre la función cognitiva. Sin embargo, este protocolo de separación materna no parece afectar de igual manera todas las dimensiones de dicha función, ya que los animales separados no mostraron diferencias en la realización de la prueba de alternancia espontánea, que podría considerarse como una medida de memoria espacial a muy corto plazo (Hughes, 2004). El déficit cognitivo detectado a largo plazo en la prueba de reconocimiento de objetos podría relacionarse con la reducción en los elementos de plasticidad sináptica observados en el hipocampo a edad adulta, a saber, niveles menores de sinaptofisina y de BDNF (ver capítulo 7). Los niveles de sinaptofisina han sido relacionados de forma directa con la densidad sináptica, y se ha descrito una reducción de sus niveles en la esquizofrenia, el trastorno bipolar y la depresión (Eastwood y Harrison, 2001). La reducción de BDNF observada en respuesta a la exposición temprana a nuestro protocolo de separación materna había sido ya descrita anteriormente (Roceri *et al.*, 2002). De forma análoga ha sido descrito reducciones en los niveles de BDNF en pacientes diagnosticados de depresión (Pandey *et al.*, 2010), y esquizofrenia (Issa *et al.*, 2010). Las reducciones observadas en estos marcadores de plasticidad sináptica en el hipocampo junto con la reducciones descritas para otras moléculas como algunas subunidades del receptor NMDA para glutamato como consecuencia de la exposición neonatal a un episodio de separación materna (Roceri *et al.*, 2002), podrían mediar una menor plasticidad comportamental en estos animales cuando se encuentran ante situaciones nuevas y/o estresantes tal y como ha

sido descrito en enfermos esquizofrénicos o depresivos (de Kloet, 2003; de Kloet *et al.*, 2007; Oitzl *et al.*, 2010).

Las alteraciones comportamentales encontradas a lo largo de la vida adolescente y adulta como consecuencia de la separación materna temprana son indicativas de sintomatología neuropsiquiátrica de diversa índole, incluidos signos de tipo depresivo, psicótico e impulsivo (Marco *et al.*, 2007).

1.2. EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISIS ADRENAL Y SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS

El eje HHA parece desempeñar un papel crítico en los efectos de la separación materna neonatal (de Kloet, 2003; Ellenbroek y Riva, 2003; Jöels y de Kloet, 1994; Levine, 1994; van Oers *et al.*, 1999). Efectivamente, un episodio de separación materna temprana provoca un aumento inmediato en los niveles circulantes de corticosterona (Viveros *et al.*, 2010a), que se prolonga, al menos, hasta el día 13 de vida postnatal, y que se ve acompañado de un incremento similar en los niveles circulantes de ACTH (capítulos 3 y 4). El aumento en los niveles de corticosterona durante esta etapa crítica del desarrollo del cerebro puede tener un impacto muy importante sobre estructuras cerebrales con una alta densidad de receptores para glucocorticoides tales como el hipocampo (McEwen *et al.*, 1986) y la corteza prefrontal (Chao *et al.*, 1989; Herman, 1993). Estas áreas cerebrales, particularmente el hipocampo, parecen especialmente sensibles a los efectos deletéreos de los glucocorticoides (Cerqueira *et al.*, 2005; Gould, 1994; Sapolsky, 2000; Sapolsky *et al.*, 1988; Zhu *et al.*, 2007) y tienen una implicación muy importante en el desarrollo de patologías neuropsiquiátricas [para revisión (Artigas, 2010; Goto *et al.*, 2010; Harrison, 1999; Kobayashi, 2009; Tseng *et al.*, 2009; Weinberger, 1999)]. El cerebelo, estructura fundamental en el control de la coordinación motora, también presenta una gran densidad de receptores de glucocorticoides durante el desarrollo (Lawson *et al.*, 1992; Pavlik y Buresova, 1984), y por lo tanto, también, puede considerarse potencialmente sensible al aumento de los glucocorticoides (McEwen, 1999; Sapolsky *et al.*, 1988). Esta estructura cerebral desempeña además un papel importante en la transmisión cortical superior y en los últimos años se la ha relacionado con desórdenes neuropsiquiátricos (Fatemi *et al.*,

2008). Es importante recalcar que el protocolo de separación materna que hemos utilizado es claramente capaz de “superar el freno” que supone el período de hiporrespuesta adrenocortical que ocurre en las crías durante aproximadamente las dos primeras semanas de vida postnatal (Viveros *et al.*, 2010a). Así pues, es muy probable que las alteraciones celulares que hemos visto tanto a nivel del hipocampo como del cerebelo en los animales separados (capítulos 3 y 4), estén estrechamente relacionadas con este aumento de corticosterona en la etapa neonatal.

Más allá del período neonatal, observamos que los niveles de corticosterona en los animales sometidos a un episodio de separación materna varían en función del sexo y de la edad. Así, la separación materna no parece afectar los niveles basales de corticosterona en machos ni durante la adolescencia ni en edad adulta, mientras que en hembras se observa una reducción en los niveles de corticosterona en la edad adolescente en ausencia de efectos durante la edad adulta (capítulo 1 y datos no publicados, ver Tabla 5).

Tabla 5. Evolución de los niveles circulantes basales de corticosterona y ACTH en animales de ambos sexos sometidos a un episodio de separación materna temprana (9 postnatal, 24h.).

	10 PN	13 PN	30 – 40 PN	> 70 PN
ACTH	n.d	↑	n.d	—
Corticosterona	↑	↑	(*) ↓	—

PN, día postnatal; ACTH, hormona adrenocorticotropa; n.d., no determinado.

(*) Efecto sólo descrito en hembras.

Tras un episodio prolongado de separación materna el eje HHA de estos animales debe adaptarse y alcanzar un nuevo equilibrio, lo cual podría explicar las fluctuaciones encontradas en los niveles basales de corticosterona. Además, cabe destacar que los efectos de la separación materna sobre el eje HHA también parecen depender de la edad neonatal a la cual se produce dicho episodio de estrés. Así, si la separación materna tiene lugar el día 3 de vida postnatal, los niveles basales de

corticosterona se encuentran elevados aún a los tres meses de edad mientras que la respuesta de corticosterona al estrés de un ambiente nuevo se encuentra atenuada (Rots *et al.*, 1996; Workel *et al.*, 2001). De forma similar, si la separación materna tenía lugar el día 11 de vida postnatal, la respuesta del eje HHA a un estímulo estresante (inyección de salino) también se encontraba reducida en edad juvenil y adulta (corticosterona), aunque a corto plazo dicha respuesta aparecía incrementada (Suchecki y Tufik, 1997) tal y como se observa en animales separados a día postnatal 9 (ACTH y/o corticosterona) (Levine, 1994; Suchecki *et al.*, 1993).

En el presente trabajo hemos investigado también posibles alteraciones en los niveles de expresión de los receptores de glucocorticoides GR y MR en el hipocampo (capítulo 7). Estos receptores son los responsables de la regulación, mediante fenómenos de retroalimentación negativa, de los niveles circulantes de glucocorticoides. Además, mantener un equilibrio en la expresión de ambos receptores en el sistema límbico parece ser un punto crucial en el mantenimiento de la homeostasis emocional y en el correcto desarrollo de los mecanismos de respuesta y adaptación a situaciones de estrés (Oitzl *et al.*, 2010). En nuestro estudio, los receptores de glucocorticoides más afectados por la separación materna han sido los GR, los máximos responsable de la autorregulación del eje ante estímulos estresantes (de Kloet, 2003). En efecto, la separación materna redujo de forma significativa la expresión de GR en hipocampo, resultado que está en consonancia con estudios previos en los que se observó una menor expresión de GR tanto 24 horas después del episodio de separación materna a día 11 postnatal (van Oers *et al.*, 1999; van Oers *et al.*, 1998), como el día 20 de vida postnatal (van Oers *et al.*, 1997). Los GR están implicados en los mecanismos de respuesta y adaptación a situaciones de estrés (de Kloet, 2003; de Kloet *et al.*, 1998). Una menor expresión de estos receptores podría contribuir a explicar una reacción alterada ante un estímulo estresante así como una inadecuada adaptación posterior a una situación similar. Así, el efecto de la separación materna sobre los niveles de expresión de GR podría mediar en el déficit de adaptación comportamental observado en estos animales cuando fueron expuestos al test de natación forzada donde exhibieron los mayores tiempos de inmovilidad (capítulo 1). En suma, hemos demostrado que la separación materna provoca cambios inmediatos en los niveles circulantes de corticosterona así como una alteración persistente en los mecanismos de regulación del eje HHA (capítulo 7).

En relación al análisis de los sistemas monoaminérgicos, hemos observado que la separación materna es capaz de alterar los niveles de dopamina y serotonina en ciertas áreas cerebrales. Se han descrito alteraciones en la expresión de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH), responsable de la síntesis de dopamina, en sustancia negra, así como una mayor susceptibilidad a los efectos de la apomorfina en los animales adultos expuestos neonatalmente a un episodio de separación materna (Ellenbroek y Cools, 1995, 2002). Respecto al sistema serotoninérgico, en otros modelos diferentes que implican separación materna repetida se han observado alteraciones tanto en los niveles de serotonina como en expresión de receptores serotoninérgicos (Arborelius y Eklund, 2007; Vázquez *et al.*, 2000). En la presente Tesis Doctoral se presentan por primera vez los efectos de nuestro protocolo de separación materna sobre los niveles de estos neurotransmisores, dopamina y serotonina, durante la edad adolescente. La serotonina se ve más afectada por la separación materna, encontrándose sus niveles significativamente elevados en todas las áreas estudiadas, a excepción del cerebelo (capítulo 2). Este aumento en los niveles de serotonina podría ser una consecuencia indirecta de la exposición al estrés de la separación materna durante el periodo neonatal. El estrés asociado a la separación materna incrementa de manera significativa los niveles circulantes de corticosterona (Viveros *et al.*, 2010a), y la corticosterona es capaz de incrementar los niveles de serotonina en áreas tales como mesencéfalo, hipocampo y amígdala (Telegdy y Vermes, 1975). Así, este incremento en los niveles circulantes de corticosterona durante el periodo neonatal podría producir de manera directa o indirecta una incorrecta maduración del sistema serotoninérgico y/o de sus interacciones con el eje HHA. Este aumento en los niveles de serotonina podría también estar relacionado con la falta de alimento que sufren los animales durante las 24 h de separación de la madre, ya que se han descrito importantes alteraciones del sistema serotoninérgico como consecuencia de la desnutrición sufrida durante periodos críticos del desarrollo (Medeiros *et al.*, 2001). A su vez, las alteraciones que hemos encontrado en los niveles de serotonina podrían estar relacionadas con los efectos de la separación materna sobre la masa corporal. La serotonina presenta un importante papel anorexigénico. Desde los núcleos mesencefálicos del rafe se proyectan importantes eferencias serotoninérgicas a núcleos hipotalámicos (Heisler *et al.*, 2006), y al núcleo del tracto solitario responsables del control metabólico y de la ingesta (Lam *et al.*, 2009).

Las alteraciones motoras observadas en la edad adolescente como consecuencia de la separación materna podrían estar mediadas por los cambios observados en los

niveles de dopamina y serotonina en el estriado de los animales separados a esa misma edad (capítulo 1 y 2). En el caso del déficit en la actividad vertical datos precedentes señalan al sistema dopaminérgico como principal responsable (Ellenbroek *et al.*, 2005), aunque no se puede descartar la participación del sistema serotoninérgico. De hecho, a pesar de que la separación materna aumenta los niveles de dopamina en machos y hembras (capítulo 2), el efecto de la separación materna sobre la actividad motora queda restringido a los machos (capítulo 1). Así, los niveles de serotonina, implicados en el control de la actividad motora vertical [ver para revisión (Sari, 2004)], y que se ven más incrementados entre los animales macho tras la separación materna, podrían estar en la base de estas alteraciones en el comportamiento motor. De igual manera, estas alteraciones en los niveles de dopamina y serotonina podrían también explicar otros efectos comportamentales tales como el incremento en los niveles de impulsividad (Marco *et al.*, 2007) o el comportamiento de tipo depresivo [capítulo 1, (Macri y Laviola, 2004)] ya que ambos sistemas han sido implicados en la regulación de dichos comportamientos (Dalley *et al.*, 2008).

1.3. EFECTOS A CORTO PLAZO SOBRE EL DESARROLLO DE ESTRUCTURAS CEREBRALES Y NIVELES DE HORMONAS

Este modelo animal representa una herramienta muy útil para el estudio de la teoría del neurodesarrollo, ya que permite investigar de forma directa alteraciones estructurales, metabólicas y neuroendocrinas durante distintas etapas del desarrollo temprano del cerebro que, muy probablemente, guardan una relación con las alteraciones comportamentales (principalmente de tipo emocional y cognitivo) y neuroendocrinas que se encuentran en etapas posteriores de la vida del individuo. En la tabla 6 se muestra un resumen de las modificaciones estructurales, neuroendocrinas y metabólicas observadas.

Tabla 6. Efectos a corto plazo (día 13 postnatal) de la separación maternal (24 h., día 9 a 10 postnatal)

	Machos	Hembras
Efectos inmunohistoquímicos		
<i>Hipocampo</i>	Incremento de células marcadas con Fj-C y GFAP. En hembras este efecto sólo se observa en zonas más restringidas, siendo en machos más general.	
<i>Cerebelo</i>	Incremento de células GFAP +. Tendencia a aumentar el número de células Fj-C +.	Reducción de células de GFAP en la capa granular interna.
Efectos endocrinos		
Aumento de los niveles basales plasmáticos de ACTH y corticosterona.		
Reducción de los niveles de leptina plasmática.		
Efectos metabólicos		
Alteración del perfil metabólico tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo. Principalmente existe una reducción de Glx y un aumento de taurina. También se observaron otros metabolitos afectados de forma sexodimórfica y región-específicos (N-acetil aspartato, fosforiletanolamina, colina y lactato).		

Fj-C, Fluoro-jade C; GFAP, proteína glial fibrilar ácida; ACTH, hormona adrenocorticotropa; Glx, pico formado por glutamina y glutamato.

En este modelo de separación materna temprana hemos descrito diversos cambios celulares en el neurodesarrollo. A este respecto, hemos observado a corto plazo (día 13 postnatal) tanto en hipocampo como en corteza cerebelosa, un aumento en los niveles de expresión de células marcadas con Fluoro-jade C (FJ-C+), conocido marcador de células en degeneración (Schmued *et al.*, 2005), y con anti-GFAP (GFAP+), que es el anticuerpo que se une a la proteína glial fibrilar ácida, principal filamento intermedio de las células de astrogliá [capítulos 3 y 4, (García-Segura *et al.*, 1988; López-Gallardo *et al.*, 2008)].

Como ya hemos mencionado, la separación materna produce un incremento en los niveles circulantes de corticosterona, que comienza horas después del episodio de separación materna (Viveros *et al.*, 2010a) y que se prolonga hasta, al menos, el día 13 de vida postnatal (capítulo 3). Es plausible que este aumento en los niveles circulantes de glucocorticoides sea responsable de estos cambios a nivel celular en áreas cerebrales

con un alto contenido en receptores GR y MR [(Lucassen *et al.*, 2010; Nichols *et al.*, 2005; Sapolsky *et al.*, 1986) y ver para revisión (Viveros *et al.*, 2009)]. Proponemos además que la reducción de los niveles de leptina observada en los animales separados [ver capítulo 4 y (Viveros *et al.*, 2010a)] podría contribuir de manera importante a la afectación del desarrollo de estas áreas cerebrales dado el importante papel que se le está atribuyendo a esta hormona en relación a funciones cerebrales extrahipotalámicas (Paz-Filho *et al.*, 2010). Esta es una de las hipótesis más interesantes que plantea esta Tesis Doctoral y a la que estamos actualmente intentando responder mediante experimentos adicionales en nuestro equipo de investigación.

Como mencionamos anteriormente la leptina es una hormona producida fundamentalmente en el tejido adiposo, que juega un papel principal en la regulación de la ingesta y en el control del gasto energético. Se ha descrito una elevación en los niveles plasmáticos de leptina durante el periodo neonatal, desde el día 4 al 14 postnatal, encontrándose los niveles máximos a día 10 (Delahaye *et al.*, 2008). Sin embargo, los efectos de la leptina sobre la ingesta de alimento no comienzan hasta después de la segunda semana de vida postnatal, presentando durante los primeros días de desarrollo neonatal un importante papel neurotrófico. De hecho la leptina parece desempeñar un papel crítico en el desarrollo de los circuitos hipotalámicos implicados en la regulación central del balance energético (Bouret y Simerly, 2006; Cottrell y Ozanne, 2008). Los receptores de la leptina también se encuentran presentes en otras áreas cerebrales, tales como el hipocampo y el cerebelo (Elmqvist *et al.*, 1998; Shanley *et al.*, 2002). Los ratones con alteraciones en el gen que codifica para la leptina, extensamente empleados como un modelo animal de obesidad, presentan un desarrollo cerebral anormal, de manera que la leptina parece tener una importante implicación en el desarrollo normal del cerebro (Ahima *et al.*, 1999).

La separación materna produce, a corto plazo, una marcada reducción en los niveles plasmáticos de leptina desde horas después del comienzo de la separación (Viveros *et al.*, 2010a) hasta días más tarde, afectando por igual a machos y hembras (capítulo 5). Dado que los niveles de leptina aumentan en situación de sobrealimentación mientras que sus niveles se reducen en condiciones de ayuno (Coll *et al.*, 2007), parece lógico pensar que tras el ayuno de 24h, sufrido durante el episodio de separación materna, los niveles de esta hormona se encuentren disminuidos. Sin embargo, es más difícil explicar que los niveles de leptina se mantengan bajos tras la reunión con la madre y la posterior ingesta de alimento (leche materna) que parece ser

la principal fuente de leptina durante el periodo neonatal (Oliver *et al.*, 2002). Cabe destacar que el episodio de separación materna coincide con el pico de leptina, de manera que este episodio de estrés podría interferir con las acciones tróficas de esta hormona afectando de forma permanente en el desarrollo de los circuitos hipotalámicos implicados en el control de la ingesta y en el balance energético (Bouret y Simerly, 2006). Este punto resulta de gran interés, y ha abierto nuevas cuestiones que deberán ser analizadas en futuros experimentos. En el caso de que efectivamente la separación materna produzca una desregulación de los circuitos hipotalámicos implicados en el control de la ingesta y en la regulación de la homeostasis energética (Viveros *et al.*, 2010a), este sería un mecanismo plausible en los efectos a largo plazo observados en relación a la evolución de peso corporal.

El análisis de espectroscopía por resonancia magnética llevado a cabo en el hipocampo y en la corteza prefrontal desveló notables diferencias en el perfil metabólico de estas dos regiones en los animales expuestos neonatalmente a un episodio de separación materna comparados con animales control. En particular, la separación materna parece producir una disminución en los niveles de glutamato (Glu) y glutamina (Gln) en los cerebros de los animales separados con respecto a los animales control no separados (Glx, ver capítulo 6). Estos cambios podrían estar relacionados con una alteración en las interacciones neurona-glía, ya que el ciclo metabólico de ambos neurotransmisores depende de estos dos tipos celulares (Choi *et al.*, 2003; Govindaraju *et al.*, 2000). Esto, al menos en el hipocampo, se halla en consonancia con los resultados observados en relación a los niveles de células marcadas con GFAP, cuyo número se ve incrementado en los animales separados, especialmente en los machos (capítulos 3 y 4). En animales adultos sometidos al protocolo de separación materna se encontraron alteraciones de receptores NMDA indicativos de una posible hipofuncionalidad del sistema glutamatérgico (Roceri *et al.*, 2002). Cabe destacar, respecto a la validez del modelo para el estudio de sintomatología neuropsiquiátrica, que una función glutamatérgica disminuida ha sido ampliamente relacionada con el desarrollo de enfermedades psiquiátricas tales como la esquizofrenia (Ellenbroek *et al.*, 2004; Ellenbroek y Riva, 2003; Paz *et al.*, 2008).

Las células de glía son muy importantes en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, y han sido implicadas en varias enfermedades de tipo neurológico y psiquiátrico (Kondziella *et al.*, 2007; Perea y Araque, 2005; Rajkowska y Miguel-

Hidalgo, 2007). Las diferencias encontradas en el marcaje de GFAP podrían ser debidas a las interferencias de la separación materna sobre los procesos de diferenciación y proliferación de los astrocitos durante el neurodesarrollo y/o a un cambio en la reactividad de éstos como consecuencia de la muerte o degeneración neuronal. En relación con estos efectos, en el estudio de espectroscopia por resonancia magnética hemos encontrado, en el hipocampo, un aumento en los niveles de diversos metabolitos, entre ellos la colina, la fosforiletanolamina (PEA) y la taurina, así como un descenso en los niveles de Glx (Glu + Gln) (capítulo 6). Metabolitos todos ellos alterados en situaciones en las que la relación neurona-glía se ve afectada (ver discusión capítulo 6 para más detalles). En relación al incremento de colina y PEA, estos metabolitos podrían estar relacionados con un aumento en el número de células de glía ya que ambos se encuentran relacionados, entre otros, con procesos de síntesis y destrucción de membranas celulares. (Govindaraju *et al.*, 2000; Imamura, 2003).

Otro dato importante obtenido a partir de los estudios de resonancia magnética, es que los cambios en el perfil metabólico de los animales separados frente a los animales control también se observan en otras regiones cerebrales relacionadas con enfermedades mentales con un origen en el neurodesarrollo, como la corteza prefrontal. En este área observamos ciertos cambios en el perfil de metabolitos cerebrales similares a los descritos para el hipocampo. Se encuentran alteraciones significativas en diversos metabolitos como la taurina y Glx (Glu + Gln). Además, en esta región encontramos un marcado descenso en los niveles de NAA como consecuencia del episodio de separación materna (capítulo 6). Esto indica, en primer lugar, que la separación materna podría afectar, al igual que en hipocampo, a las relaciones neurona-glía. En segundo lugar, el descenso en los niveles de NAA, conocido marcador de neurodegeneración (Imamura, 2003; Raman *et al.*, 2005), podría también indicar que la separación materna, posiblemente debido al aumento de glucocorticoides, provoca alteraciones en este área cerebral, de forma similar a lo encontrado en hipocampo y en cerebelo. También en este caso, nuestros resultados han dado pie a que realicemos un estudio más profundo de cambios en la corteza cerebral inducidos por la separación materna tanto en el desarrollo (estudios actualmente en marcha) como en cuanto a efectos a largo plazo (capítulo 7).

La separación materna temprana produjo además una notable alteración de los niveles de taurina, en ambos sexos, tanto en el hipocampo como en la corteza frontal. La taurina es un aminoácido que no se encuentra formando parte de las proteínas y que es

crucial para el correcto desarrollo del cerebro (Janáky *et al.*, 2008). Actualmente se le atribuye un importante papel protector durante el desarrollo del sistema nervioso (Janáky *et al.*, 2008). La taurina es capaz de defender a las células frente a las acciones de varias sustancias perniciosas y tóxicas (Oja y Saransaari, 2007), y en estudios *in vitro* se ha visto que incrementan sus niveles cuando se observa aumento en el número de células marcadas con GFAP (Fèlix *et al.*, 2010). De esta manera, el aumento de glucocorticoides inducido por la separación materna podría provocar los efectos neurotóxicos descritos (ver Capítulos 3 y 4) y como consecuencia activar diversos mecanismos protectores, entre ellos los mediados por taurina, este aumento a su vez podría relacionarse con el aumento en el número de células de glía GFAP+, al menos en el hipocampo de los animales macho.

En los animales separados, tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal, también se ha observado una ligera reducción en los niveles lactato. Esta alteración podría estar reflejando alteraciones en el metabolismo energético de estas dos regiones cerebrales. Apoyando esta afirmación encontramos que en animales poco después de haber sido separados de la madre una reducción significativa de los niveles de glucosa circulante (Viveros *et al.*, 2010a), hipoglucemia que indica una falta de sustrato energético a las 24 h del episodio de separación materna.

En conjunto, las diferentes alteraciones neuroendocrinas observadas, tanto a corto, como a largo plazo, en respuesta a la exposición a un episodio de separación materna temprana podrían mediar las consecuencias comportamentales descritas a las diversas edades. Sin embargo, parece aún más plausible pensar que este episodio de estrés neonatal haya interferido en el normal neurodesarrollo de los animales, alterando no sólo los diversos sistemas de neurotransmisión aún inmaduros, sino modificando el equilibrio de los mismos y provocando, en consecuencia, diversas alteraciones a nivel comportamental que parecen tener una cierta relación con la sintomatología presente en diversas neuropatologías.

1.4. OTROS CAMBIOS ENDOCRINOS Y ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

En la presente Tesis Doctoral hemos descrito que la separación materna neonatal también afecta al eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Tanto este eje hormonal, como el comportamiento sexual por él regulado, se ven afectados de forma crítica por episodios de estrés neonatal (Camozzato *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2005; Léonhardt *et al.*, 2003; Padoin *et al.*, 2001). En nuestros experimentos, la separación materna temprana mostró una marcada tendencia a reducir los niveles plasmáticos de testosterona en animales macho adultos (90 días de edad, ver capítulo 7), efecto que se confirmó en animales de menor edad, 75 días de edad (Viveros *et al.*, 2010b). De forma similar, los niveles de estradiol también se vieron reducidos tras un episodio de separación materna temprana en animales macho (capítulo 7). Entre las hembras no encontramos ningún efecto de nuestro protocolo de separación materna sobre estas hormonas, sin embargo, no podemos descartar el hecho de que las fluctuaciones hormonales debidas al ciclo estral hayan enmascarado dichos efectos.

Los efectos de la separación materna sobre los niveles de hormonas sexuales podrían explicarse, al menos parcialmente, por las interacciones recíprocas existentes entre los esteroides sexuales y el eje HHA (Handa *et al.*, 1994; Rivier *et al.*, 1986). De esta manera, las alteraciones endocrinas observadas en estos animales podrían ser en parte resultado de complejas interacciones entre glucocorticoides y esteroides sexuales durante el desarrollo. La leptina también podría representar un papel importante a este respecto, ya que participa notablemente en la fisiología de la reproducción (Roa *et al.*, 2010). La leptina tiene un efecto directo sobre la producción de las hormonas sexuales, siendo el mantenimiento de sus niveles un punto crítico en el correcto desarrollo sexual durante la pubertad, tanto en machos como en hembras [ver para revisión (Tena-Sempere y Barreiro, 2002)]. De forma recíproca, las hormonas sexuales parecen modular la producción de leptina (Alonso *et al.*, 2007; Meli *et al.*, 2004). Los estrógenos parecen activar su producción, mientras que los niveles de testosterona la inhiben [ver para revisión (Tena-Sempere y Barreiro, 2002)]. En consecuencia, parece existir una importante interacción entre ambos sistemas endocrinos, que bien podría iniciarse en etapas tempranas del desarrollo, de manera que los bajos niveles de leptina encontrados en los animales poco después de haber sido separados neonatalmente de su

madre podrían haber afectado el desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y, en consecuencia, a los niveles de hormonas sexuales de los animales adultos.

En el presente trabajo hemos descrito alteraciones en los niveles plasmáticos de glucocorticoides, de hormonas sexuales y de leptina, sistemas endocrinos cuya regulación reside de manera fundamental en el hipotálamo. Por tanto, cabe hipotetizar que la separación materna temprana haya producido un desarrollo inadecuado de los correspondientes circuitos hipotalámicos, y que este fallo en el neurodesarrollo del hipotálamo haya comprometido la funcionalidad de estos sistemas hormonales, y de los comportamientos a ellos asociados.

Son cada vez más numerosos los estudios que han descrito notables alteraciones del sistema inmunitario en patologías psiquiátricas tales como la esquizofrenia o la depresión (Leonard y Myint, 2009; Muller *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2001; Strous y Shoenfeld, 2006). Por ejemplo, en pacientes esquizofrénicos se han descrito alteraciones en los procesos de linfoproliferación activada por mitógeno y en la capacidad de migración de los linfocitos, también conocida como quimiotaxis (Moises *et al.*, 1985). De ahí que nos interesara el análisis de estos parámetros inmunitarios en nuestro modelo de separación materna en el que, de hecho, hemos observado importantes alteraciones en el sistema inmune. Los efectos inmunológicos de la separación materna aparecen en edad neonatal, así como en la adolescencia y en la edad adulta, afectando a diversos órganos linfoides (ver Tabla 7). En resumen, la separación materna es capaz de provocar una importante y persistente reducción de la respuesta inmune en animales de ambos sexos (capítulo 1). En este contexto es importante citar un estudio anterior en el que los animales separados de su madre durante el periodo neonatal presentaban una mayor susceptibilidad que los animales no separados a sufrir los efectos de una encefalomiелitis autoinmune inducida (Teunis *et al.*, 2002). En su conjunto, estas alteraciones representan una prueba más de la validez de nuestro modelo animal de separación materna temprana en el estudio de las psicopatologías con origen en el neurodesarrollo.

Tabla 7. Alteraciones inmunológicas a corto y largo plazo inducidas por la separación materna neonatal.

	Machos	Hembras
Alteraciones a corto plazo (ratas neonatales, día 13 postnatal)		
<i>Bazo</i>	Decremento de la lifoproliferación inducida por LPS y del índice de quimiotaxis	
<i>Timo</i>	Reducción de la actividad de células NK, de la lifoproliferación inducida por LPS y el índice de quimiotaxis	
Alteraciones a largo plazo (ratas adolescentes, día 40 postnatal)		
<i>Bazo</i>	Decremento de la lifoproliferación inducida por ConA	
<i>G. axilares</i>	Decremento de la lifoproliferación inducida por ConA y el índice de quimiotaxis	
<i>Timo</i>	Decremento de la lifoproliferación inducida por ConA y el índice de quimiotaxis	
Alteraciones a largo plazo (ratas adultas, día 75 postnatal)		
<i>Bazo</i>	Reducción de la actividad de las células NK	
<i>Timo</i>	Reducción de la actividad de células NK, de la lifoproliferación inducida por LPS	
	Decremento de la lifoproliferación inducida por ConA y la quimiotaxis	

G., ganglios; NK, *natural killer*; LPS, lipopolisacaridasa; ConA, concavalina A.

Los sistemas endocrino e inmune interaccionan de manera bidireccional (Gaillard, 2001). En este contexto, el eje HHA es la vía neuroendocrina principal por la que el sistema nervioso controla el sistema inmune (Eskandari y Sternberg, 2002), y esta interacción es particularmente importante durante periodos críticos del desarrollo, como por ejemplo durante el periodo neonatal (Bjorksten, 2008; Charmandari *et al.*, 2003). Los glucocorticoides (corticosterona) circulantes presentan una marcada actividad inmunosupresora (Marchetti *et al.*, 2001), de manera que el aumento en los niveles de corticosterona observados como consecuencia del episodio de separación materna neonatal [capítulo 4 y (Viveros *et al.*, 2010a)] podría interferir de forma crítica en el correcto desarrollo del sistema inmune. Los efectos de la separación materna sobre el sistema inmune podrían estar mediados también por otros factores. Por un lado, el

ayuno de 24 h que sufren las crías durante el episodio de separación materna podría contribuir al inadecuado desarrollo del sistema inmune. Durante los primeros días del desarrollo la nutrición es muy importante para la correcta maduración de este sistema, tanto para la elaboración de una respuesta apropiada frente a una infección, como para el reconocimiento de antígenos propios y ambientales [ver para revisión (Calder *et al.*, 2006)]. Por otro lado, hemos descrito que la separación materna temprana es capaz de reducir de forma significativa los niveles plasmáticos de leptina (capítulo 2), y la leptina juega un importante papel en la modulación de la respuesta inmune (Fantuzzi, 2008; Zhang *et al.*, 2002b). Por ello, tanto la falta de alimento (leche materna), durante 24 horas, como los bajos niveles de leptina producidos por la separación materna en una etapa crítica del desarrollo podrían tener importantes consecuencias en el correcto desarrollo del sistema inmune (Cunningham-Rundles *et al.*, 2005).

En conclusión, la separación materna temprana produce importantes alteraciones comportamentales, neuroendocrinas e inmunológicas a corto y a largo plazo. Algunos de estos cambios son de tipo permanente, como es el caso de los cambios a nivel del sistema inmune, mientras que otros siguen una evolución diferente en función de la edad y del sexo. En cualquier caso, los resultados alcanzados en nuestro modelo animal no hacen sino confirmar la hipótesis propuesta al inicio de este trabajo. La exposición a este modelo de separación materna interfiere con el normal desarrollo del cerebro afectando a diferentes aspectos de la psicofisiología de los individuos.

2. INTERACCIÓN CON EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

El sistema endocannabinoide desempeña un papel muy importante en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) (Berghuis *et al.*, 2007; Fernández-Ruiz *et al.*, 2000; Harkany *et al.*, 2008), como ha quedado recogido en la introducción de la presente Tesis Doctoral. Por otro lado, en estos experimentos hemos demostrado que la exposición a un protocolo de separación materna neonatal es capaz de provocar notables cambios en el sistema cannabinoide endógeno (ver tabla 8).

Tabla 8. Resumen de los efectos provocados a corto plazo (PND 13) por la separación materna en el sistema endocannabinoide hipocampal.

Machos	Hembras
Aumento de los niveles de 2-AG	
Reducción de los receptores CB1	
	Aumento de los receptores CB2
Incremento de DAGL α en el Asta de Ammón y reducción en la capa molecular del giro dentado.	
Reducción de la expresión de ARNm y la proteína MAGL	Reducción de los niveles de proteína MAGL

2-AG, 2-araquidonoil glicerol; DAGL, Di-acilglicerol lipasa; MAGL, Mono-acilglicerol lipasa; ARNm, ácido ribonucleico mensajero.

La separación materna disminuye los niveles de expresión del receptor CB1 en el hipocampo (capítulo 5). Esta reducción puede deberse, una vez más, al aumento de los niveles de corticosterona provocados por la separación materna [ver capítulo 3 y (Viveros *et al.*, 2010a)]. A este respecto, los glucocorticoides son capaces de reducir la expresión de los receptores CB1 (Hill *et al.*, 2008a), posiblemente a través de un mecanismo directo de represión y/o promoción génica como ocurre con otros sistemas (Malcher-Lopes *et al.*, 2008). En cuanto al receptor CB2, en este trabajo se demuestra por primera su presencia en el hipocampo de las ratas en edad neonatal, presentando una

distribución diferente a la descrita para el receptor CB1 (capítulo 5). Además, este receptor también se ve afectado por la separación materna, aunque de forma opuesta; la separación materna produce un aumento en los niveles de expresión del receptor CB2 en machos y en hembras. Quizás, este aumento en los niveles de expresión de los receptores CB2 sea el resultado de un mecanismo compensatorio ante el descenso en los niveles de expresión de los receptores CB1. Los receptores CB2 presentan importantes acciones neuroprotectoras en modelos animales de isquemia (Murikinati *et al.*, 2010) y de la enfermedad de Huntington (Palazuelos *et al.*, 2009) entre otros, de manera que existe la posibilidad de que el aumento en los niveles de expresión de los receptores CB2 como consecuencia de la separación materna temprana sea un mecanismo de defensa del cerebro en respuesta a dicho estrés neonatal.

En la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que la separación materna induce un aumento en los niveles del agonista endocannabinoide 2-AG en el hipocampo de los machos (capítulo 3). Se ha descrito un incremento similar en diversos modelos animales de lesiones cerebrales y neurotoxicidad, por lo que se ha postulado que este aumento en los niveles de 2-AG medie acciones neuroprotectoras frente a estos ataques [ver para revisión (Di Marzo y Petrosino, 2007; Mechoulam y Shohami, 2007)]. Encontramos también, como era de esperar, que este aumento en los niveles de 2-AG aparece acompañado de cambios en los niveles de sus enzimas de síntesis y degradación. En concreto, se ha observado un incremento en los niveles de la diacilglicerol lipasa α , enzima encargada de la síntesis de este endocannabinoide (detectable sólo mediante técnicas de inmunohistoquímica y no a nivel del ARNm), junto con una reducción en los niveles de expresión génica y proteica de la monoacil glicerol lipasa (MAGL), enzima responsable de su catabolismo (capítulo 5). Algunos estudios han sugerido que los glucocorticoides son capaces de promover la síntesis de compuestos endocannabinoides a partir del ácido araquidónico, es decir la anandamida y el 2-AG (Hill *et al.*, 2010; Malcher-Lopes *et al.*, 2008), por lo que el aumento encontrado en 2-AG en los animales que han sufrido el estrés neonatal podría estar relacionado con el aumento de glucocorticoides que provoca la separación materna (capítulo 3). Sin embargo, la ausencia de cambios en los niveles de AEA y el hecho de que el aumento en 2-AG afecte a los machos mientras que los niveles de corticosterona a esta edad (PND 13) están aumentados en ambos sexos, sugiere mecanismos complejos que probablemente estén afectados por interacciones entre el eje HHA, los esteroides gonadales que actúan en el período crítico de diferenciación sexual del cerebro

(perinatal en la rata) y el sistema endocannabinoide que a estas edades está en pleno desarrollo.

Dado el notable papel que desempeña el sistema endocannabinoide en el control del eje HHA [ver para revisión (Cota, 2008)], en la modulación del balance energético [ver para revisión (Bermudez-Silva *et al.*, 2010)], y en la actividad del sistema inmune (Pandey *et al.*, 2009; Tanasescu y Constantinescu, 2010), parece plausible pensar que, al menos algunos de los efectos observados tras la exposición temprana a un episodio de separación materna se encuentren mediados por los cambios observados en este sistema. Es más, el sistema cannabinoide endógeno es necesario para el correcto desarrollo de otros sistemas de neurotransmisión [ver por ejemplo (Berrendero *et al.*, 1999; Fernández-Ruiz *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 1997)] y ejerce importantes acciones neuroprotectoras sobre el sistema nervioso (Mechoulam y Shohami, 2007). Por ello, los cambios encontrados a nivel del sistema cannabinoide endógeno podrían participar, de forma directa o indirecta, mediante interacciones con el normal desarrollo del cerebro, en algunos de los efectos descritos como consecuencia de la separación materna temprana. La desregulación del sistema cannabinoide endógeno, cuya implicación en diversos trastornos neuropsiquiátricos ha sido descrita (Adamczyk *et al.*, 2008; Giuffrida *et al.*, 2004; Gorzalka *et al.*, 2008; Leweke *et al.*, 2007; Zavitsanou *et al.*, 2004), podría estar implicada en los efectos comportamentales de la separación materna observados en animales adolescentes y adultos. Por ejemplo, comportamiento de tipo depresivo (capítulo 1) y déficit cognitivo (capítulo 7).

En la presente Tesis Doctoral se han investigado además posibles interacciones entre un episodio de separación materna temprana y la administración de diversos fármacos cannabinoideos. En un primer lugar se estudiaron los efectos de la administración de una dosis única de WIN 55,212-2 en edad neonatal y su interacción con la separación materna (capítulo 1). Discutiremos primero los efectos del fármaco sobre los animales controles no separados. La administración neonatal de este agonista cannabinoide, que consistió en una única inyección a una dosis relativamente baja (de 0,1 mg/kg) el día 10 de vida postnatal, provocó unos sorprendentes efectos deletéreos en los animales adolescentes. Indujo una marcada reducción de la actividad locomotora y exploratoria en los animales machos, así como un aumento en sus niveles de ansiedad. Tanto en machos como en hembras se observó un comportamiento de tipo depresivo en

el test de natación forzada, así como niveles basales de corticosterona superiores a los encontrados en los animales no tratados con el agonista cannabinoide (capítulo 1). En trabajos anteriores, se ha observado cómo la administración repetida de un agonista cannabinoide durante la etapa perinatal produce notables alteraciones a largo plazo sobre la actividad locomotora, los mecanismos de respuesta al estrés, el aprendizaje y la conducta sexual, entre otros [para revisión consultad (Fernández-Ruiz *et al.*, 1999)]. Sin embargo conviene recalcar que los efectos encontrados por nosotros ocurren como consecuencia de una única inyección del agonista cannabinoide. La edad neonatal es un periodo crítico del neurodesarrollo durante el cual los receptores CB1 presentan una distribución atípica, transitoria, en ciertas zonas de sustancia blanca. Durante el periodo neonatal el sistema endocannabinoide no sólo se encuentra en pleno desarrollo, sino que está implicado claramente en el desarrollo del cerebro y parece participar de forma activa en el desarrollo de otros sistemas de neurotransmisión (Fernández-Ruiz *et al.*, 2000; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 1997). Así pues, las alteraciones comportamentales observadas en el presente trabajo podrían ser consecuencia de la alteración directa del sistema endocannabinoide aún en desarrollo y/o de la disrupción del normal desarrollo de otros sistemas de neurotransmisión tales como el sistema dopaminérgico, serotoninérgico, GABAérgico y/o opioide, cuya alteración ha sido propuesta como posible mecanismo subyacente a los efectos a largo plazo de la administración de agonistas cannabinoides durante el periodo neonatal (Fernández-Ruiz *et al.*, 2000; Fernández-Ruiz *et al.*, 1999; Harkany *et al.*, 2007; Viveros *et al.*, 2005a). Además, como ya se ha mencionado, el sistema endocannabinoide (receptores CB1) se sabe que participa en la regulación del eje HHA en edad adulta (Cota, 2008). En edades tempranas del desarrollo, podría hipotetizarse una implicación del sistema endocannabinoide en el desarrollo del eje HHA y/o en el mantenimiento del periodo de baja reactividad al estrés (SHRP). Por tanto, la administración del agonista cannabinoide en este periodo temprano del desarrollo podría haber alterado el normal desarrollo de dicho eje de estrés, mediando de esta manera las alteraciones a largo plazo observadas en los niveles circulantes de corticosterona de los animales tratados con el fármaco.

Diversos agonistas cannabinoides han demostrado su capacidad inmunomoduladora tanto en estudios en humanos como en animales de experimentación (Klein *et al.*, 2003; Tanasescu y Constantinescu, 2010). Son diversos

los mecanismos descritos a este respecto: los cannabinoides pueden actuar sobre las células T modulando su número y su capacidad de proliferación, pueden modificar la secreción de diversas citoquinas específicas como el TGF- β , el interferón gamma, así como una gran variedad de interleuquinas [para revisión ver (Croxford y Yamamura, 2005)]. En nuestro estudio, la administración temprana del agonista cannabinoide ha provocado a largo plazo alteraciones en diversos parámetros inmunológicos de los animales adolescentes (capítulo 1). Observamos diferentes efectos dependiendo del órgano analizado. Así, en timo y ganglios axilares, la actividad inmune parece encontrarse inhibida, y en el bazo se ha observado una activación de la actividad inmune (ver capítulo 1). Esta dualidad no sorprende ya que los efectos de los agonistas cannabinoides parecen depender de forma crítica del agonista cannabinoide empleado y de la dosis utilizada, así como del órgano inmune analizado [ver para revisión (Croxford y Yamamura, 2005; Tanasescu y Constantinescu, 2010)]. Dada la estrecha relación descrita entre la función inmune y la actividad del eje HHA (Gaillard, 2001), no debemos descartar que parte de los efectos a largo plazo observados sobre el sistema inmune tras la administración neonatal de WIN 55,212-2 estén relacionados con las alteraciones que también produjo en los niveles de corticosterona.

En el estudio de las consecuencias de la manipulación farmacológica del sistema endocannabinoide durante el periodo neonatal observamos que gran parte de los efectos de los compuestos cannabinoides dependen, en gran medida, del tipo de manipulación neonatal a la cual fueron sometidos. De hecho, la separación materna temprana parece revertir algunos de los efectos provocados por el WIN 55,212-2, tales como la reducción de la actividad locomotora, la tendencia a presentar una menor frecuencia exploratoria, así como los efectos inducidos por el WIN 55,212-2 en el laberinto en cruz elevado, es decir, la reducción en los parámetros de exploración de los brazos abiertos (capítulo 1).

Respecto a la interacción entre el protocolo de separación materna temprana y el tratamiento con el agonista cannabinoide sobre la función inmune, los efectos observados dependieron del tejido analizado. En el bazo y los ganglios axilares la combinación de ambos tratamientos provocó una reducción de la quimiotaxis, y exacerbó el efecto reductor sobre la respuesta linfoproliferativa observada en los ganglios axilares, mientras que en el timo la combinación de ambos tratamientos previno los efectos de cada uno de los tratamientos *per se*. A este nivel, las diferencias

observadas podrían ser debidas al estado de desarrollo de los diferentes órganos linfoides tanto primarios (timo) como secundarios (bazo y ganglios axilares) en el momento de los tratamientos (edad neonatal). En resumen, los efectos deletéreos a largo plazo del tratamiento neonatal con WIN 55,212-2 (el día 10 de vida postnatal) solo fueron descritos entre los animales control no separados, pero no entre los animales sometidos al protocolo de separación materna neonatal.

Como se ha mencionado anteriormente, este tipo de protocolo de estrés neonatal afecta al correcto desarrollo del sistema endocannabinoide (ver tabla 8). Estas alteraciones pueden ser las responsables de que los cambios a largo plazo provocados por el WIN 55,212-2 sean diferentes en los animales separados y en los animales control no separados. De hecho, la separación materna temprana provoca una importante reducción en los niveles de expresión del receptor CB1 en el hipocampo (ver capítulo 5). Esta reducción fue observada 3 días después de la exposición al protocolo de separación materna en el hipocampo, sin embargo, no podemos descartar un efecto similar en otras regiones del cerebro, y tampoco conocemos el patrón temporal de cambios en la expresión de estos receptores. Así, en el caso de que la reducción en los niveles de expresión de los receptores CB1 fuera ya evidente al finalizar el episodio de separación materna (día 10 de vida postnatal), el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 encontraría una menor expresión de receptores y, por tanto, los efectos de dicho agonista serían menores en comparación con los efectos observados en los animales control no separados que presentarían niveles normales de expresión de dichos receptores. De forma similar, la mayor reducción en la expresión de receptores CB1 observada en machos con respecto a las hembras (ver capítulo 5), podría explicar el hecho de que los efectos de la combinación de tratamientos a largo plazo sea algo más evidente entre los machos.

En un estudio anterior de nuestro grupo de investigación, este agonista cannabinoide, WIN 55,212-2, a la misma dosis que la utilizada en esta Tesis Doctoral presentó propiedades neuroprotectoras en un modelo de hipoxia-isquemia en animales neonatales (Martínez-Orgado *et al.*, 2003). Por ello, analizamos los efectos de la administración neonatal de WIN 55,212-2 en nuestro modelo animal de separación materna temprana encontrando interesantes interacciones. A la vista de los efectos deletéreos que este fármaco cannabinoide produjo en los animales a largo plazo, y los

datos obtenidos de un nuevo experimento en el que la potenciación farmacológica del tono cannabinoide endógeno, mediante la administración de un inhibidor de la recaptura de AEA, logró reducir los elevados niveles de impulsividad observados en los animales adolescentes que habían sufrido un episodio de separación materna en edad neonatal (Marco *et al.*, 2007). Nos propusimos utilizar dos “activadores indirectos” del sistema endocannabinoide, OMDM-2 y AA-5-HT, inhibidores del transporte y de la degradación de endocannabinoides (más concretamente inhibe la FAAH), respectivamente, para comprobar si una estrategia más fisiológica (elevar el tono endocannabinoide endógeno) pudiera revertir, al menos, algunos de los efectos que la separación materna había producido en el desarrollo de ciertas estructuras cerebrales de los animales neonatales (capítulo 3).

En la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que, a corto plazo, el incremento del tono cannabinoide endógeno es capaz de modular algunos de los efectos de la separación materna temprana, al menos a nivel celular y endocrino (ver capítulo 3). Así, el tratamiento neonatal (desde el día 7 al 12 de vida postnatal) con los dos inhibidores de la desactivación de endocannabinoides, el AA-5-HT y el OMDM-2 fueron capaces de revertir el aumento en el marcaje de células GFAP+ encontradas en el hipocampo así como los elevados niveles de corticosterona circulante observados a día 13 postnatal en los animales que habían sido separados neonatalmente de sus madres. En el cerebelo incluso demostramos cómo estos compuestos cannabinoide eran capaces de reducir el número de células marcadas con Fj-C (células en degeneración) como consecuencia del episodio de separación materna temprana (López-Gallardo *et al.*, 2008). En resumen, el aumento del tono cannabinoide endógeno inducido a lo largo del tratamiento parece indicar que ésta es una estrategia plausible y probable para contrarrestar algunos de los efectos provocados por la separación materna, entre ellos el proceso de degeneración inducido por la separación materna (ver capítulo 3 y apartado 1.2 de la discusión de la presente Tesis Doctoral), y/o los efectos observados a nivel hormonal. Un posible mecanismo que podría justificar esta idea estaría relacionado con el efecto inhibitorio de los endocannabinoides sobre el eje HHA (Cota, 2008; Hill y McEwen, 2010; Hill *et al.*, 2010). A este respecto hemos observado que los fármacos *per se* modulan la actividad del eje HHA, aunque de forma opuesta en machos y en hembras. En los machos, ambos fármacos inducían un incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona a día 13 postnatal, mientras que en las hembras el efecto observado era el contrario, los fármacos reducían los niveles circulantes de esta

hormona. En adultos, el sistema endocannabinoide parece afectar a los niveles de corticosterona y a sus fluctuaciones circadianas de forma sexodimórfica (Atkinson *et al.*, 2010), pudiendo explicarse de este modo las diferencias observadas en el presente trabajo, aunque en este caso se trate de animales neonatos.

En relación a la reversión de los efectos celulares de la separación materna, los fármacos cannabinoides empleados producen un aumento del tono cannabinoide endógeno, y los efectos sobre las células GFAP+ podrían estar mediados por la activación de receptores cannabinoides presentes en estas células de glía. De hecho, algunos tipos de células de glía expresan receptores CB1 y CB2 y son capaces de llevar a cabo la síntesis de ligandos cannabinoides endógenos (Navarrete y Araque, 2008). Es más, en los últimos años, las evidencias acerca de la importancia del sistema endocannabinoide en la comunicación glía-neurona han aumentado notablemente, habiendo sido propuesta la existencia de un “sistema endocannabinoide glial” con implicaciones tanto fisiológicas como patológicas [ver para revisión (Massi *et al.*, 2008; Pazos *et al.*, 2005; Stella, 2004)]. Nuevamente, al observar los efectos *per se* de los fármacos cannabinoides, encontramos indicios que apuntan en esta dirección. Así, el incremento en el tono endocannabinoide parece regular a la baja el número de células GFAP+ y/o la expresión de GFAP. Este efecto (reducción de células GFAP+) es más evidente entre hembras, aunque esto podría deberse al hecho de que las hembras en condiciones basales presentan un mayor número de este subtipo celular en comparación con los machos (ver capítulo 3).

Respecto al nivel de endocannabinoides en el hipocampo observamos efectos *per se* del AA-5-HT, inhibidor de la FAAH. Este fármaco sólo parece inducir un incremento en los niveles de AEA en el hipocampo de los animales macho no separados, mientras que en las hembras no se observa tal efecto. A pesar de que en la actualidad no haya evidencias sobre posibles diferencias en la expresión de la enzima FAAH entre machos y hembras, sí que se ha descrito una importante influencia inhibitoria de los estrógenos sobre dicha enzima en animales adultos (Maccarrone *et al.*, 2000; Waleh *et al.*, 2002). A pesar de que nuestros datos procedan de animales neonatos, éstos podrían sugerir una menor expresión de enzima FAAH entre las hembras. Dado que el AA-5-HT debería tener un mayor efecto ante una mayor presencia de FAAH, lo lógico sería esperar un efecto mayor en machos que en hembras. Esto mismo podría aplicarse al OMDM-2, inhibidor de la recaptura de los endocannabinoides, que también provoca un aumento en los niveles de AEA en

machos. En este caso el efecto estaría relacionado con el hecho de que la actividad del transportador depende en gran medida de la actividad de la enzima FAAH [ver para revisión (De Petrocellis *et al.*, 2004)]. Para verificar si esto es lo que realmente está sucediendo sería necesario realizar un estudio detallado del perfil de expresión de la enzima FAAH durante el desarrollo en animales de ambos sexos. En las hembras, el único efecto que encontramos por parte del tratamiento farmacológico sobre los niveles de endocannabinoides fue un ligero aumento de 2-AG entre los animales tratados con AA-5-HT, posiblemente debido a que la FAAH es capaz de degradar 2-AG, a pesar de que la monoacilglicerol lipasa sea la enzima que degrade la mayor parte del 2-AG liberado (De Petrocellis *et al.*, 2004; Di Marzo *et al.*, 2005).

En relación a los animales sometidos al protocolo de separación, encontramos que la AA-5-HT indujo un incremento de 2-AG en las hembras, mientras que el OMDM-2, pareció revertir el aumento de 2-AG detectado en los machos separados. Aunque la reducción en los niveles de endocannabinoides observada tras la administración del inhibidor de la recaptura puede resultar paradójico, ésta puede explicarse por el hecho de que este tipo de compuestos son capaces de inhibir no sólo su liberación sino además su recaptura (Ligresti *et al.*, 2004). En resumen, la interacción entre la separación materna y el tratamiento farmacológico sobre los niveles de los cannabinoides endógenos en hipocampo parecen ser complejas y, en este estadio, difíciles de interpretar. En el presente trabajo hemos demostrado que existen diferencias debidas al sexo en los efectos de estos potenciadores del tono cannabinoide endógeno sobre los niveles de endocannabinoides en el hipocampo de animales neonatos. Además existe un efecto diferencial en función de la historia previa del animal (separación materna o no). Es muy posible que los efectos de la separación materna sobre el propio sistema endocannabinoide (por ejemplo, aumento de 2-AG y los efectos sexodimórficos descritos en el capítulo 5 de la presente Tesis Doctoral sobre receptores y enzimas de este sistema) estén influyendo en estos resultados tan diversos.

Otro de los factores que puede intervenir en la variabilidad observada en relación a los efectos de estos fármacos, tanto *per se* como en combinación con la separación materna, es su actuación a través de receptores no-cannabinoides. En este punto sería necesario el uso de antagonistas selectivos, no solo para los receptores CB1 y CB2, sino la modulación de otros receptores que pueden ser activados por los ligandos endocannabinoides como es el caso de los receptores vanilloides (TRPV1) (Cristino *et al.*, 2008; Starowicz *et al.*, 2007) o el recientemente descrito GPR55 (Lauckner *et al.*,

2008). Además, los efectos neuroprotectores de estos dos fármacos cannabinoides también pueden ser debidos a efectos inespecíficos de los mismos. Por ejemplo, la AA-5-HT puede actuar como antagonista de los receptores TRPV1 (Maione *et al.*, 2007), un efecto que puede inhibir el daño neuronal y reducir los niveles de ansiedad en roedores adultos [para revisión (Starowicz *et al.*, 2008)]. Por otro lado el OMDM-2, a altas concentraciones, puede activar de forma directa los receptores CB1 (Ortar *et al.*, 2003), lo cual podría justificar los efectos neuroprotectores, así como la reducción de los niveles de corticosterona.

En resumen, hemos demostrado que existen efectos dependientes del sexo de nuestro protocolo de separación materna temprana sobre el sistema endocannabinoide. Hemos demostrado además que esta alteración puede ser, al menos en parte, responsable de los cambios comportamentales descritos en estos animales, así como de su respuesta frente a tratamientos con compuestos que tienen acciones sobre el sistema endocannabinoide. Por último, pero no por ello menos importante, hemos demostrado cómo una manipulación temprana del sistema endocannabinoide tiene importantes consecuencias, tanto a corto como a largo plazo, que dependen una vez más del sexo y de la historia previa de los animales tratados. De este modo, los presentes estudios hacen evidenciar la importancia de este sistema endocannabinoide en el correcto desarrollo de los individuos, así como en comportamiento futuro y en la adaptación al medio que los rodea.

3. MODELO DEL “DOBLE IMPACTO”

En la última parte de la presente Tesis Doctoral nos hemos centrado en la investigación de la “Hipótesis del Doble Impacto (*Two hit hypothesis*)”, teoría que defiende que la vulnerabilidad a padecer trastornos neuropsiquiátricos aumenta de forma significativa cuando los individuos que han sufrido alteraciones durante el neurodesarrollo, ya sea por causas genéticas o ambientales (primer impacto), se enfrentan a una situación ambiental estresante (segundo impacto) en un momento posterior de sus vidas (Bayer *et al.*, 1999; Maynard *et al.*, 2001). A este respecto, el protocolo de estrés crónico impredecible empleado indujo importantes cambios a varios niveles, tanto a corto (24 horas después) como a largo plazo (semanas después), indicando que este tipo de manipulación durante la adolescencia puede también considerarse como un importante factor que altera el correcto desarrollo del SNC (ver tabla 9). Nuestros datos también demuestran que la separación materna combinada con la exposición a un protocolo de estrés crónico durante la adolescencia es capaz de provocar alteraciones deletéreas a nivel neuroendocrino y comportamental (ver tabla 10), causando un importante déficit cognitivo que podría estar relacionado con la sintomatología observada en patologías neuropsiquiátricas tales como la depresión y la esquizofrenia [ver para revisión (Greer *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2008b)]. De forma paralela, cambios similares a los aquí observados han sido descritos en otros modelos animales para el estudio de trastornos psiquiátricos (Choy *et al.*, 2008; Isgor *et al.*, 2004; Joëls, 2010; Li *et al.*, 2009), indicando la idoneidad de nuestro modelo animal en el estudio de la etiología de estas enfermedades y en la investigación de la hipótesis del “doble impacto”.

Tabla 9. Efectos comportamentales en edad adulta de un protocolo de estrés crónico impredecible (ECI) durante la adolescencia (día 28 al 43 postnatal).

Machos	Hembras
<i>Efectos comportamentales</i>	
Aumento en el porcentaje de tiempo y entradas en brazos abiertos (Laberinto en cruz) - Ansiolisis o mayor tendencia a comportamientos de riesgo	
Aumento de la actividad locomotora	
Déficit cognitivo evaluado en la prueba de reconocimiento de objeto	
<i>Efectos neurobiológicos en el hipocampo</i>	
Tendencia a incrementar la expresión de ARNm del receptor MR	Tendencia a disminuir la expresión de ARNm del receptor MR
Reducción de la expresión de NCAM	Incremento de la expresión de NCAM en el GD
Reducción de la expresión de sinaptofisina en todas las áreas hipocampales estudiadas	
<i>Efectos somáticos y endocrinos</i>	
Reducción en los niveles circulantes de estradiol y similar tendencia en los niveles de testosterona.	

ID, índice de discriminación; GD, Giro Dentado; MR, receptor mineralocorticoide; BDNF, factor de crecimiento derivado de cerebro; NCAM, proteína de adhesión celular neuronal.

Los animales sometidos a un protocolo de estrés crónico impredecible (ECI) durante la adolescencia presentaban a corto plazo una mayor exploración de los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado (capítulo 7). En la literatura encontramos efectos muy diversos en función del tipo de protocolo de estrés empleado (impredecible o no), el tiempo de duración, la edad de los animales durante la exposición, así como en el momento de la evaluación de sus efectos. Por un lado se ha encontrado una ausencia de efectos en el laberinto en cruz elevado inmediatamente después de la exposición a un protocolo de estrés crónico (predecible) durante 14 días (Shoji y Mizoguchi, 2010). Por otro lado se ha descrito un efecto de tipo ansiogénico a corto plazo tras la exposición a un protocolo de estrés (en este caso impredecible) durante ,también, 14 días (Bondi *et al.*, 2007). En cuanto a nuestros resultados, una exploración aumentada de los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado ha sido interpretado clásicamente como una

DISCUSIÓN

respuesta de tipo ansiolítico (Pellow *et al.*, 1985), aunque en los últimos años se han propuesto nuevas interpretaciones. Por un lado, el incremento de la frecuencia de entradas y de tiempo transcurrido en los brazos abiertos del laberinto en cruz ha sido interpretado como un aumento de la actividad exploratoria cuando va acompañado por un incremento de la frecuencia de entradas a brazos cerrados (Doremus-Fitzwater *et al.*, 2009) como también ocurre en nuestro caso. Por otro lado, este comportamiento puede también interpretarse como una reducción en la percepción del riesgo (Davis *et al.*, 2009; Löfgren *et al.*, 2006). En nuestra opinión la interpretación correcta de nuestros resultados se aproxima más a esta última opción, un aumento del comportamiento de riesgo.

Tabla 10. Efectos evaluados en la edad adulta, de la interacción del protocolo de separación materna neonatal (24 h., día 9 a 10 postnatal) y un protocolo de estrés crónico impredecible (ECI) durante la adolescencia (día 28 al 43 postnatal)(*).

Efectos comportamentales

Déficit cognitivo evaluado en la prueba de reconocimiento de objeto

Efectos neurobiológicos en el hipocampo

Disminución de la expresión de BDNF, NCAM y sinaptofisina en todas las áreas hipocampales estudiadas (**)

Efectos somáticos y endocrinos

Reducción del peso corporal hasta la vida adulta

Se anula el efecto reductor en los niveles de leptina debidos a la separación materna

Reducción en los niveles de testosterona y estradiol

Incremento de los niveles de corticosterona circulante (dato no publicado)

ID, índice de discriminación; GD, Giro Dentado; MR, receptor mineralocorticoide; BDNF, factor de crecimiento derivado de cerebro; NCAM, proteína de adhesión celular neuronal

(*) La mayoría de estos efectos sólo fueron encontrados en machos

(**) Estos efectos se dan de igual forma en hembras

Tanto los machos como las hembras expuestos neonatalmente al protocolo de separación materna o al estrés crónico durante la adolescencia presentan un marcado déficit cognitivo en el test de reconocimiento de objeto, reducción que se mantiene en

los animales sometidos a la combinación de dichos protocolos de estrés. En la literatura encontramos trabajos previos que describen marcados problemas de aprendizaje y memoria tras la exposición repetida a estímulos estresantes durante la adolescencia (McCormick y Mathews, 2010; McCormick *et al.*, 2010; Tsoory *et al.*, 2007). Tanto en machos como en hembras sometidos a ambos tipos de estrés la reducción observada en el parámetro de memoria de este test (ID) es más similar al de los grupos que sólo fueron separados de su madre que a aquellos que sólo han sufrido el ECI durante su adolescencia (ver capítulo 7, Fig. 3 del artículo). Esto podría sugerir que el estrés neonatal provocaría un efecto “máximo” sobre el ID.

En otros trabajos se ha observado que un protocolo de estrés crónico (durante la adolescencia) inducía un déficit cognitivo, además de una reducción en el volumen hipocampal (Isgor *et al.*, 2004), asociando los cambios deletéreos en el hipocampo con alteraciones cognitivas provocadas por el estrés. En este contexto, acompañando al déficit en la memoria encontrado en nuestro estudio, observamos que la exposición al protocolo de estrés impredecible durante la adolescencia producía alteraciones significativas en la expresión de proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica en el hipocampo, en concreto, la expresión de BDNF, NCAM y sinaptofisina. Estos resultados concuerdan con otros trabajos en los que la exposición de animales jóvenes a un protocolo parecido de estrés crónico impredecible indujo descensos en los niveles de expresión de BDNF en CA3 y en Giro Dentado (Li *et al.*, 2009), aunque en nuestro caso el efecto es casi siempre reductor, depende del sexo del animal y del área hipocampal estudiada. No obstante, cabe destacar, en relación a estos elementos de plasticidad sináptica, que la combinación de los dos protocolos de estrés produjo una reducción aún mayor en los niveles de expresión de BDNF, NCAM y sinaptofisina, siendo este efecto más marcado en machos y proporcionando, de este modo, una posible explicación al mayor deterioro cognitivo observado en este sexo. En estudios previos se había observado que la combinación de dos protocolos de estrés (doble impacto), a saber estrés neonatal y administración de corticosterona en edad adulta, también redujo de forma significativa la expresión de BDNF (Choy *et al.*, 2008), y redujo los niveles hipocampales de NCAM produciendo además un déficit de memoria espacial y de flexibilidad cognitiva (Bisaz *et al.*, 2009). En el caso de la sinaptofisina, se ha observado que su expresión es altamente sensible al estrés (Afadlal *et al.*, 2010; Thome *et al.*, 2001), por lo que parece tener una gran relevancia en el déficit cognitivo

observado tras la exposición a condiciones de estrés como las que representan los protocolos aquí empleados.

Como ya se ha visto en apartados anteriores, gran parte de la sintomatología observada en enfermedades psiquiátricas se debe a una respuesta inadecuada frente a estímulos estresantes [ver para revisión (de Kloet, 2003; Oitzl *et al.*, 2010)]. A este respecto, el balance entre los receptores para glucocorticoides, GR y MR, en el sistema límbico y su actividad coordinada parecen desempeñar un papel crucial en el control emocional, en una adecuada adaptación al medio y en lo relativo a la respuesta frente a situaciones estresantes. Así, se ha descrito una mayor vulnerabilidad a padecer enfermedades neuropsiquiátricas en aquellos individuos que sufren un desequilibrio en la función de los MR (que activan respuestas de defensa frente al estrés) y GR (que inhiben rutan activadas en reacción al estrés) (Oitzl *et al.*, 2010). El protocolo de estrés neonatal, tal y como ha sido discutido anteriormente (ver apartado 1.1.) afectó fundamentalmente a los GR, mientras que el protocolo de estrés crónico durante la adolescencia no parece tener ningún efecto sobre estos receptores (capítulo 7). Estos resultados están en línea con estudios previos en los que, tras la exposición repetida a un protocolo de estrés crónico impredecible durante 21 días sobre machos adultos jóvenes, no se observó reducción significativa de los GR hipocampales (van Riel *et al.*, 2003), así como con lo encontrado en un trabajo en el que se aplicó un estrés por inmovilización durante la adolescencia temprana (Romeo *et al.*, 2008), aunque esto último podría ser debido a una habituación al tipo de estrés empleado. Hay que señalar, que en otro trabajo usando un protocolo de estrés crónico impredecible sí se detectó un descenso en los niveles de GR (Isgor *et al.*, 2004). La diferencia de duración entre los protocolos (16 días, sólo el periodo adolescente en nuestro caso y 21 días en el caso de van Riel y colaboradores) y el protocolo usado por el otro trabajo citado (4 semanas, abarcando el periodo adolescente y juvenil) puede ser la causa de los diferentes efectos encontrados.

Por otra parte, nuestro protocolo de estrés crónico durante la adolescencia parece afectar de forma más marcada a los receptores MR hipocampales (ver capítulo 7), algo que, al menos en machos ya ha sido descrito (van Riel *et al.*, 2003), presentando dichos efectos un marcado perfil sexodimórfico. En machos, la exposición a estrés crónico durante la adolescencia incrementó los niveles de expresión de MR, mientras que en hembras el efecto observado fue el opuesto, principalmente en el Giro Dentado (GD). Teniendo en cuenta la importancia de este receptor en los procesos de adaptación frente

a situaciones estresantes (Oitzl *et al.*, 2010), esta diferencia en los efectos de la exposición a un protocolo de estrés durante la adolescencia podría representar uno de los mecanismos subyacentes al dimorfismo sexual descrito en relación a la susceptibilidad a padecer enfermedades neuropsiquiátricas tras sufrir un evento altamente estresante (Andersen y Teicher, 2008; Oldehinkel y Bouma, 2010).

Tanto el protocolo de ECI empleado como la separación materna provocan alteraciones endocrinas y fisiológicas que van más allá del eje HHA. Como hemos descrito en experimentos previos, el efecto de la separación materna neonatal sobre el peso de los animales se mantiene en la edad adolescente, a partir de la cual los animales controles y separados comienzan a igualar sus pesos (capítulos 1 y 7). En este experimento, y aún en ausencia de efectos del protocolo de estrés adolescente *per se*, la exposición a esta situación estresante durante la adolescencia parece prolongar los efectos de la separación materna neonatal sobre la ganancia de peso corporal, especialmente en los machos, es decir, los animales sometidos a ambos protocolos de estrés son los que muestran una mayor reducción del peso. En estudios previos, la exposición a un protocolo de estrés crónico sobre animales ya adultos redujo la ganancia de peso (Bortolato *et al.*, 2007; Tagliari *et al.*, 2010), aunque tanto la naturaleza como la duración del protocolo de estrés no son comparables a las empleadas en nuestro experimento.

Volviendo a nuestros resultados, los niveles plasmáticos de leptina no parecen mediar los efectos sobre el peso corporal de la combinación de ambos tipos de estrés, ya que no se ven alterados en el grupo sometido a ambos protocolos (capítulo 7). Por tanto, deben existir otros mecanismos implicados. Uno de los posibles candidatos es el sistema serotoninérgico. Como ya vimos, este sistema se encuentra alterado como consecuencia del protocolo de separación materna que indujo un incremento de serotonina (5-HT) en un gran número de áreas cerebrales (capítulo 2). En estudios previos se encontró que también se ve afectado por la exposición a un estrés crónico. Así, en ratas adultas sometidas a 7 días de estrés se evaluaron los niveles de 5-HT en el estriado, la corteza prefrontal y el hipocampo el último día y 24 horas después del protocolo, y se encontró que los niveles de 5-HT estaban disminuidos inmediatamente después de la finalización del protocolo, pero no a las 24 horas (Ahmad *et al.*, 2010). En otro estudio con estrés crónico impredecible más duradero (21 días) se observó también un efecto sobre el sistema serotoninérgico, en este caso sólo a nivel hipocampal, donde se registró una

menor actividad neuronal frente a la estimulación con serotonina (van Riel *et al.*, 2003). En estos trabajos, los protocolos de estrés crónico fueron aplicados a ratas ya adultas, y se sabe que el sistema serotoninérgico está todavía en pleno desarrollo en el intervalo de tiempo en el que nosotros aplicamos nuestro protocolo de estrés crónico (D'Amato *et al.*, 1987; Hedner y Lundborg, 1980). Es plausible que los efectos del ECI dependan de la edad a la que se realiza (además, desde luego, de la propia naturaleza del protocolo) y por lo tanto sólo podemos especular sobre los efectos que haya podido tener nuestro procedimiento de ECI sobre el sistema serotoninérgico (carecemos de este dato). No obstante, parece lógico pensar en este sistema como sustrato neurobiológico de los efectos sobre el peso. Otro factor con una importante implicación en el balance energético y la evolución de la masa corporal es el Neuropeptido Y (NPY), que también se ve afectado por la separación materna neonatal (Husum *et al.*, 2002), y también parece verse afectado por el estrés crónico, como se deduce, de forma indirecta, de un trabajo en el que animales que habían sido sometidos a un protocolo de ECI mejoraban de las alteraciones comportamentales y somáticas provocadas por el mismo al ser tratados con una infusión intra-hipocampal de NPY (Luo *et al.*, 2008). El análisis de estos y otros sistemas neuroquímicos, incluidos también los sistemas opioide y cannabinoide en modelos de “doble impacto” merecería un estudio en profundidad.

Se ha visto que el estrés crónico también es capaz de alterar el comportamiento sexual tanto en machos como en hembras (Hill *et al.*, 2008a). A este respecto, en la presente Tesis Doctoral hemos descrito importantes alteraciones en los niveles de hormonas sexuales como consecuencia de la exposición a un protocolo de estrés durante la adolescencia, y estos cambios hormonales podrían estar mediando las alteraciones de la conducta sexual observadas en los animales sometidos a estrés crónico (Hill *et al.*, 2008a). En nuestro estudio, la combinación de los dos protocolos de estrés provocó una drástica reducción de los niveles circulantes de estradiol y testosterona en machos (ver capítulo 7), mientras que entre las hembras no se encontraron cambios significativos. Cabe destacar que, en las hembras, las fluctuaciones hormonales que acompañan al ciclo estral podrían estar enmascarando los efectos de nuestros protocolos de estrés. En estudios futuros será necesario evaluar posibles cambios en la conducta sexual en nuestro modelo animal del doble impacto con el fin de entender las implicaciones funcionales de los cambios endocrinos observados.

4. DIFERENCIAS SEXUALES

Los cerebros de los machos y las hembras son diferentes. Factores tanto genéticos como hormonales inducen, un patrón de desarrollo neuroendocrino diferente en ambos sexos provocando que existan divergencias en los tamaños de diversos núcleos, en el desarrollo de los sistemas de neurotransmisión, ejes de control endocrino, etc. Los esteroides sexuales juegan un papel crítico en los dimorfismos sexuales observados en los animales adultos, provocando importantes diferencias en la estructura cerebral femenina y masculina (Cooke *et al.*, 1998; Gillies y McArthur, 2010a; MacLusky y Naftolin, 1981; Nunez *et al.*, 2001). Se establecen, como consecuencia, diferencias sexuales no sólo a nivel de comportamiento sexual y reproductivo, sino también emocional, social, aprendizaje, control de ingesta y peso, entre otros [ver (Becker *et al.*, 2005; Bocklandt y Vilain, 2007; Rhodes y Rubin, 1999)].

Según la hipótesis de la diferenciación cerebral debida a los efectos organizacionales y activacionales de las hormonas sexuales, la exposición temprana a dichas hormonas masculiniza diversos circuitos neuronales (cambios estructurales), programando las respuestas comportamentales cuando se alcanza la edad adulta. Durante la pubertad, periodo de maduración gonadal, las hormonas testiculares y ováricas actúan sobre circuitos neuronales ya diferenciados sexualmente con el fin de facilitar la expresión de determinados comportamientos sexuales (efectos activacionales) (Handa *et al.*, 2008; Schwarz y McCarthy, 2008). Datos recientes han mostrado nuevos elementos que podrían explicar, al menos en parte, algunos de los mecanismos que participan en esta diferenciación sexual. De este modo, se ha propuesto que el cerebro adolescente, bajo una intensa actividad de remodelación, sufre además importantes cambios organizacionales como consecuencia de la exposición a las hormonas sexuales esteroideogénicas secretadas durante la pubertad. Esta segunda oleada de cambios organizacionales remodelaría y refinaría circuitos que presentan notables diferencias sexuales durante las etapas más tempranas del desarrollo neural. Así, la organización comportamental que sucede durante la adolescencia, podría ser consecuencia no sólo de los cambios activacionales que tienen lugar durante la pubertad, sino también de los efectos organizacionales que tienen lugar en esta fase del desarrollo (Schulz *et al.*, 2009). Esta hipótesis abre nuevos caminos para la

investigación de las diferencias sexuales que median gran parte de los efectos descritos en la presente Tesis Doctoral, tanto en la adolescencia como en la etapa adulta.

Se han descrito numerosas diferencias sexuales en relación a enfermedades neuropsiquiátricas, por ejemplo, en cuanto a la incidencia de la depresión (Andersen y Teicher, 2008; Heim *et al.*, 2008; Kendler *et al.*, 2002), así como diferencias entre hombres y mujeres en la vulnerabilidad, evolución y sintomatología de la esquizofrenia, además de diferencias en la respuesta al tratamiento (Figueira y Ouakinin, 2010; Goldstein, 2006). En ambos casos dichos dimorfismos sexuales parecen relacionarse con diferencias en los niveles de hormonas sexuales y su interacción con el eje HHA (Andersen y Teicher, 2008; Figueira y Ouakinin, 2010; Goldstein, 2006). A lo largo de la presente Tesis Doctoral, en la que hemos trabajado con un modelo animal de alteraciones neuropsiquiátricas que consideramos válido para el análisis de la hipótesis del neurodesarrollo, hemos descrito por primera vez numerosas diferencias sexuales en muchos de los parámetros estudiados, tanto en los animales controles como en cuanto a los efectos de los tratamientos de estrés y farmacológicos. Cabe pensar que dimorfismos sexuales de base en sistemas afectados por la separación materna (véanse numerosos ejemplos en los capítulos 3,4 y 5) hagan que el impacto de este estrés sea diferente en ambos sexos. Se deriva entonces que las diferencias sexuales que se encuentran en diversas enfermedades psiquiátricas en humanos puedan tener su base en el neurodesarrollo. Esta es una ventaja más, desde el punto de vista de sus posibilidades metodológicas, de este modelo en particular.

En animales adultos se han descrito diferencias sexuales en las células de glía (Conejo *et al.*, 2003). Además se ha visto una importante influencia de los esteroides sexuales sobre los niveles de expresión de la proteína GFAP, de manera que las hormonas testiculares son capaces de reducir considerablemente los niveles de esta proteína (Day *et al.*, 1993). De forma paralela, las hormonas sexuales cobran un papel esencial en el desarrollo de los astrocitos, siendo el estradiol fundamental para la diferenciación de los astrocitos en el núcleo Arcuato, implicado fundamentalmente en el comportamiento sexual (McCarthy *et al.*, 2002). Cabe destacar que en el presente trabajo las diferencias sexuales más relevantes han sido observadas a edades previas a la pubertad, en animales neonatales. A este respecto, en edades tempranas del desarrollo hemos descrito claras diferencias sexuales de base en relación al número de neuronas y

células de glía presentes en el hipocampo de animales de 13 días de vida postnatal (capítulo 4). Se ha visto un mayor número de células marcadas con GFAP y Fj-C en el hipocampo de hembras neonatales respecto a machos, lo cual indica notables diferencias en el ratio de muerte celular en esta estructura, así como diferencias de organización celular. También existen diferencias en cuanto a nivel de endocannabinoides en los animales neonatales de ambos sexos.

Las diferencias sexuales observadas neonatalmente en las células de glía podrían jugar un papel esencial en los efectos diferenciales de la separación materna. Las células gliales en las hembras parecen ser más resistentes que las de los machos a un modelo de privación de oxígeno y glucosa, así como a la muerte por estrés oxidativo provocado por H_2O_2 , proceso que ha sido relacionado a una mayor aromatización y formación de estradiol gracias a la enzima P450 que se encuentra en estas células (Liu *et al.*, 2007). Una mayor actividad aromataza en las hembras podría estar mediando el efecto protector frente al daño degenerativo observado en el hipocampo de los machos como consecuencia de la exposición a la separación materna temprana (capítulo 4). En cuanto a los estudios de metabolitos en hipocampo y corteza, también en varios casos se vieron más afectados machos que hembras. El hecho de que los machos parezcan en varios aspectos más vulnerables a la separación materna que las hembras puede deberse a mecanismos protectores en las hembras y/o a que en el intervalo de tiempo en el que se realiza el procedimiento de la separación de la madre, el estadio de desarrollo del cerebro, no sea igual en machos que en hembras. Esta hipótesis podría tener importantes consecuencias a la hora de “predecir” o más bien de comprender mejor el impacto diferencial que pueda tener un determinado fenómeno estresante en etapa perinatal en dependencia del sexo del individuo afectado.

Durante la adolescencia el cerebro continúa sus procesos de desarrollo y maduración que también presenta un perfil sexodimórfico; en humanos, estructuras como la corteza, el hipocampo, la amígdala, el núcleo de la estría terminal y el cuerpo calloso presentan una diferente velocidad de desarrollo en machos y hembras, siendo el engrosamiento de la materia gris más rápido en hembras que en machos (De Bellis *et al.*, 2001; Giedd, 2004; Giedd *et al.*, 1997). De forma similar, los diferentes sistemas de neurotransmisión presentan un perfil de maduración sexodimórfico. En la presente Tesis Doctoral se han encontrado diferencias sexuales en animales adolescentes en relación con el metabolismo de la dopamina en el mesencéfalo (capítulo 2), en consonancia con

las diferencias encontradas en la expresión de receptores estriatales de dopamina en machos y hembras (Andersen *et al.*, 2000). También se han descrito diferencias en los niveles de serotonina en el estriado de machos y hembras, presentando estas últimas mayores niveles de serotonina, junto con un metabolismo ralentizado (capítulo 2). Estas diferencias encontradas en los animales adolescentes parecen mantenerse en la edad adulta ya que se ha demostrado una mayor síntesis de serotonina en hembras adultas frente a machos (Duchesne *et al.*, 2009).

El sistema endocannabinoide también presenta importantes dimorfismos sexuales durante su desarrollo (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1993). De hecho, en la presente Tesis Doctoral hemos observado que, en el hipocampo de animales neonatos, encontramos un ligero aumento en los niveles de anandamida de las hembras no separadas respecto a los machos a día 13 postnatal. Actualmente no existen evidencias sobre posibles diferencias en la expresión de la enzima FAAH (encargada de degradar la AEA) entre machos y hembras durante el periodo neonatal. Sí que parece existir, en cambio, un efecto inhibitorio de los estrógenos sobre la enzima FAAH en animales adultos (Maccarrone *et al.*, 2000; Waleh *et al.*, 2002). Aunque nuestros resultados han sido obtenidos de animales en edad neonatal, éstos podrían estar sugiriendo una expresión reducida de la FAAH en las hembras. Es más, estas diferencias en la expresión de FAAH podrían estar detrás, al menos en parte, de los efectos *per se* dependientes del sexo observados en los animales tratados con el inhibidor de la FAAH. Además, en estudios recientes se ha descrito una importante influencia de los esteroides sexuales sobre el sistema endocannabinoide. En animales adultos, los estrógenos son capaces de modular la liberación de agonistas endocannabinoides, bien aumentando su liberación (Hill *et al.*, 2007), bien inhibiéndola (Amantea *et al.*, 2007). Es posible que estas relaciones se establezcan desde períodos tempranos del desarrollo, lo que contribuiría a explicar la diferente susceptibilidad a los tratamientos farmacológicos en machos y hembras observadas a largo plazo (capítulo 1), y a corto plazo (capítulo 3).

En la literatura se han descrito diferencias entre animales macho y hembra adultos en relación a los efectos inducidos por los diferentes agonistas cannabinoides [ver (Agrawal *et al.*, 2004; Atkinson *et al.*, 2010; Craft, 2005; Viveros *et al.*, 2006)]. En el presente trabajo hemos observado la diferente susceptibilidad que presentan al tratamiento neonatal con el agonista WIN 55,212-2. La reducción de la actividad motora

como consecuencia de la administración neonatal de WIN 55,212-2, así como el incremento en los niveles de ansiedad observados en el laberinto en cruz elevado sólo fueron descritos en machos, no encontrándose tales efectos en las hembras (capítulo 1). Estas diferencias sexuales pueden ser explicadas si tenemos en cuenta que el desarrollo del sistema cannabinoide es diferente en machos y en hembras. Por ejemplo, a edades neonatales los machos y las hembras presentan diferentes perfiles de expresión del receptor CB1 en el estriado y el mesencéfalo ventral (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1993). Este hecho podría contribuir a explicar la diferente vulnerabilidad de los machos a los efectos de una única administración de WIN 55,212-2, ya que los receptores sobre los que éste compuesto podría actuar se encontrarían en mayor número en machos respecto a hembras. A este respecto el efecto de los inhibidores de la inactivación de los endocannabinoides endógenos sobre el eje HHA podría estar apoyando la anterior afirmación, ya que un aumento del tono endógeno endocannabinoide provoca alteraciones en los niveles de corticosterona circulante en animales neonatales (día 13 postnatal, 24 horas después de finalizar el tratamiento farmacológico), dependientes del sexo, aumentándolos en machos y disminuyéndolos en las hembras (capítulo 3). Otra posible explicación podría referirse a las hormonas sexuales.

Respecto a las diferencias a largo plazo encontradas en relación con el protocolo de estrés crónico durante la adolescencia, el componente sexodimórfico del efecto del ECI en la expresión del receptor MR, que también se ha observado en el caso del otro receptor (GR) en relación a la separación materna, puede representar una de las bases del diferente desarrollo de los trastornos psiquiátricos entre machos y hembras (Ter Horst *et al.*, 2009). Dos fenómenos estresantes durante el desarrollo afectan de diferente forma a ambos sexos, provocando alteraciones a largo plazo diferentes en puntos críticos del control de la respuesta al estrés, y su adaptación, marcando ya una de las bases para entender la diferente adaptabilidad entre machos y hembras a situaciones adversas y su respuesta frente a ellas. En el caso de los humanos, diversos trabajos apuntan que la vulnerabilidad a padecer trastornos asociados con depresión y ansiedad es mayor en mujeres que en los hombres durante su periodo reproductivo, y esto ha sido asociado a la mayor inestabilidad hormonal [ver (Ter Horst *et al.*, 2009)].

Las numerosas y diversas diferencias sexuales que hemos encontrado en todos los experimentos de esta Tesis Doctoral, remarcan la importancia que debe darse al

DISCUSIÓN

factor sexo en investigación básica y más concretamente en modelos animales de enfermedades neuropsiquiátricas. Por supuesto, lo mismo cabe decir de estudios clínicos y epidemiológicos que deben servir de inspiración a modelos animales basados en hechos observables en humanos, que proporcionan las pistas para construir modelos experimentales apropiados y que contribuyan a responder a interrogantes cuya solución no es abordable por cuestiones metodológicas y éticas con la experimentación en humanos. Conviene no perder de vista que un modelo animal no puede imitar en su totalidad una entidad tan compleja como una enfermedad psiquiátrica, pero si ciertos signos o síntomas y, además, permite el control de factores cruciales de tipo ambiental y del factor sexo así como la realización de manipulaciones que ayudan a desentrañar sustratos neurobiológicos subyacentes. Es esperable que técnicas no invasivas permitan avanzar mediante estudios clínicos en la investigación de la hipótesis del neurodesarrollo, pero los modelos animales son, de momento, una herramienta fundamental si se utilizan de una manera adecuada.

CONCLUSIONES

Respecto al modelo de separación materna

Adolescencia

1. Los animales separados de la madre mostraron, en edad adolescente, diversos cambios a nivel comportamental incluida una reducción de la postura erguida en los machos, y un aumento significativo del tiempo de inmovilidad tanto en machos como en hembras. Además, la latencia para alcanzar una postura de flotación fue disminuida significativamente en los machos separados de la madre. Estos efectos son indicativos de un fenotipo depresivo.

2. Los animales adolescentes separados de su madre en edad neonatal mostraron una clara modificación de su sistema serotoninérgico que se tradujo en un incremento de los niveles de serotonina en hipocampo, mesencéfalo, corteza frontal y estriado, así como una elevación en los niveles de dopamina en el estriado.

3. La separación materna temprana produjo una clara reducción del peso corporal que se prolongó hasta bien entrada la edad adolescente y que fue más marcada en los machos.

Período neonatal

4. La separación materna indujo un incremento de los niveles circulantes de corticosterona y una disminución de los niveles de leptina en los animales de 13 días de edad postnatal. A esta misma edad los machos separados de la madre mostraron un aumento significativo del número de células GFAP + y Fj-C+ en el hipocampo.

5. Dos inhibidores de la inactivación de endocannabinoides, AA-5-HT y OMDM2, revirtieron los efectos celulares (aumento significativo del número de células GFAP + en hipocampo) y endocrinos (aumento de los niveles de corticosterona) de la separación materna e indujeron una disminución en el número de células marcadas con GFAP en las hembras controles no separadas de la madre.

6. La separación materna indujo diversos cambios en el sistema endocannabinoide hipocampal de los animales neonatales. El perfil de alteraciones pareció ser más marcado en los machos separados, que mostraron: una disminución significativa de los receptores CB₁ y un aumento de los receptores CB₂, un aumento de 2-AG y disminuciones tanto de la inmunoreactividad de MAGL como de los niveles de ARNm para esta enzima que cataboliza el 2-AG. Nuestros resultados indican que la separación materna temprana produce una clara desregulación del sistema endocannabinoide en desarrollo.

7. La separación materna neonatal provocó importantes cambios en el perfil metabólico tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal de los animales neonatales. En concreto, se encontraron alteraciones en los niveles de N-acetil aspartato, glutamina y glutamato, taurina, colina y fosforiletanolamina, cuya naturaleza dependió del sexo de los animales y del área cerebral analizada.

Respecto al modelo del "doble impacto" (24 de separación materna a día postnatal 9 y estrés crónico impredecible en edad adolescente)

Edad adulta

8. Los animales sometidos al estrés crónico impredecible (ECI) mostraron un aumento en el porcentaje de tiempo y entradas en brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, independientemente del tratamiento neonatal, que podría interpretarse como un aumento de comportamiento de riesgo.

9. En la prueba de reconocimiento de objeto ambos tratamientos de estrés (neonatal y juvenil) indujeron un deterioro significativo de la memoria, siendo estos efectos más marcados en machos que en hembras.

10. Cada protocolo de estrés por separado indujo distintas alteraciones en las moléculas de plasticidad sináptica analizadas (BDNF, NCAM, sinaptofisina), que eran dependientes del sexo. Sin embargo, en los animales que recibieron ambos tipos de

estrés se encontraron efectos más marcados en forma de una drástica disminución en las tres moléculas analizadas.

11. La separación materna neonatal indujo una reducción significativa en la expresión del receptor GR hipocampal en los machos, mientras que el estrés crónico juvenil mostró una tendencia a incrementar la expresión del receptor MR en los machos y a reducirla en las hembras.

12. Tanto la separación materna como el protocolo de estrés juvenil indujeron marcadas reducciones en la testosterona y el estradiol de los machos. La separación materna neonatal también indujo una reducción de los niveles de leptina en machos. En cambio, en las hembras ninguna de las hormonas analizadas fue alterada por los protocolos de estrés.

ANEXO I

FÁRMACOS UTILIZADOS: COMPUESTOS CANNABINOIDES

Agonistas directos, aquellos que se unen de forma directa a los receptores cannabinoides activándolos.

WIN 55212,2

Nombre formal	(R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetilo)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naptalenilmetanona
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₃
Actividad biológica	Se trata de un derivado Aminoalquilindol. Es un potente agonista de los receptores CB1 y CB2.
Casa comercial	SIGMA

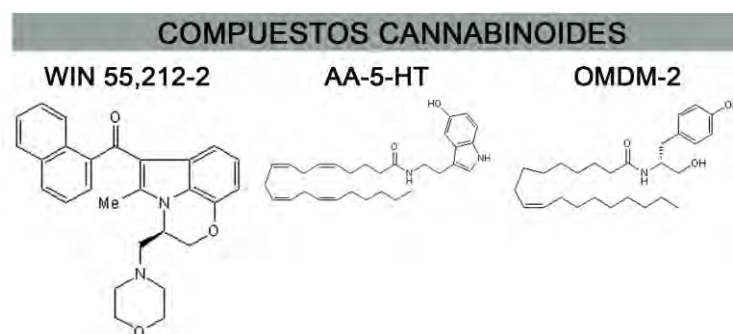
Agonistas indirectos, compuestos que potencian la actividad cannabinoide endógena mediante la inhibición de la inactivación de sus ligandos endógenos.

N-araquidonil- serotonina (AA-5-HT)

Nombre formal	N-[2-(5-Hidroxi-1H-indol-3-il)etil]-5,8,11,14-eicosato traenamida
Fórmula molecular	C ₃₀ H ₄₂ N ₂ O ₂
Actividad biológica	Inhibidor de la enzima FAAH, responsable de la hidrólisis intracelular de AEA, así como antagonista del receptor vanilloide TRPV1
Casa comercial	Sintetizado y donado por el laboratorio del profesor Di Marzo (Nápoles, Italia).

OMDM-2

Nombre formal	(R)-N-[1-(4 hidroxifenil)-2-hidroxifenil]-oleamida
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃
Actividad biológica	Presenta una potente y selectiva actividad inhibidora de la recaptura de anandamida
Casa comercial	Tocris



ANTICUERPOS UTILIZADOS

Primarios

Monoclonal mouse anti-rat GFAP IgG2b

Antígeno	Proteína glial fibrilar ácida (GFAP) de rata.
Animal en el que se desarrolló	Ratón
Concentración de trabajo	1:1000
Casa comercial	BD Biosciences

Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) monoclonal antibody

Antígeno	Proteína del núcleo neuronal (NeuN) de rata
Animal en el que se desarrolló	Ratón
Concentración de trabajo	1:100
Casa comercial	Chemicon International

Polyclonal rabbit Anti-CB1

Antígeno	Receptor cannabinoide CB1 de roedor
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:500
Casa comercial	Cortesía del Prof. Ken Mackie

Polyclonal rabbit Anti-CB2

Antígeno	Receptor cannabinoide CB2 de roedor
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:500
Casa comercial	Cortesía del Prof. Ken Mackie

Polyclonal antibodies rabbit Anti-DAGL α and DAGL β

Antígeno	Enzima Diacilglicerol lipasa α o β de roedor
----------	---

Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:250 Anti-DAGL α y 1:200 Anti- DAGL β
Casa comercial	Desarrollados en el laboratorio del Dr. Rodríguez de Fonseca

Rabbit polyclonal antibody MAGL

Antígeno	Monoacilglicerol lipasa de roedor
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:100
Casa comercial	Cayman Chemical, Ann Harbor

Secundarios

Rabbit antimouse IgG-Cy2 conjugated

Antígeno	Inmunoglobulina G
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:100
Conjugado	Cianina 2 (Cy2). Fluorescencia en el espectro del verde.
Casa comercial	Chemicon Internacional

Rhodamine (TRITC)-conjugated AfinniPure Rabbit Anti-Mouse IgG

Antígeno	IgG de ratón
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:100
Conjugado	Rodamina (TRITC). Fluorescencia en el espectro del rojo
Casa comercial	Jackson

Biotinylated Donkey anti-rabbit immunoglobulin

Antígeno	Ig-G conejo
----------	-------------

ANEXO I

Animal en el que se desarrolló	Burro
Concentración de trabajo	1:500
Conjugado	Biotina
Casa comercial	Amersham

Reactivos, aquellos que se unen específicamente a una o varias sustancias pero no son inmunoglobulinas.

FLUOROJADE C (Fj-C)

Acción	Se une específicamente a células en degeneración. Con menos afinidad puede unirse también a vasos sanguíneos, meninges y los plexos coroideos, así como a células de glía (con muy baja afinidad).
Conjugado	Fluorescencia en el espectro del verde
Concentración de trabajo	1:10000 en ácido acético
Casa comercial	Chemicon

DNAbinding fluorescent dye 40,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)

Acción	Se une específicamente al ADN.
Conjugado	Fluorescencia en el espectro del azul
Concentración de trabajo	0.0002% en Vectashield®
Casa comercial	Sigma–Aldrich

ANEXO II

ANEXO II. MODELOS COMPORTAMENTALES EMPLEADOS

El estudio de las diferentes enfermedades psiquiátricas se ha basado en el empleo de diferentes modelos animales. En estos modelos los roedores han sido el grupo más empleado, tanto para el estudio del origen, evolución y sintomatología, como para el empleo de nuevas estrategias terapéuticas o el empleo de nuevas técnicas de estudio. A continuación se hará un resumen de las pruebas comportamentales empleadas para el estudio de los cambios que los diferentes tratamientos y protocolos empleados sobre estos animales han provocado en este aspecto.

Estos modelos de basan en el análisis de su comportamiento espontáneo, entre los que destacan su marcada tendencia exploratoria, su aversión a las alturas y a los espacios abiertos, así como su capacidad de memoria y aprendizaje.

Análisis de la actividad locomotora y exploratoria

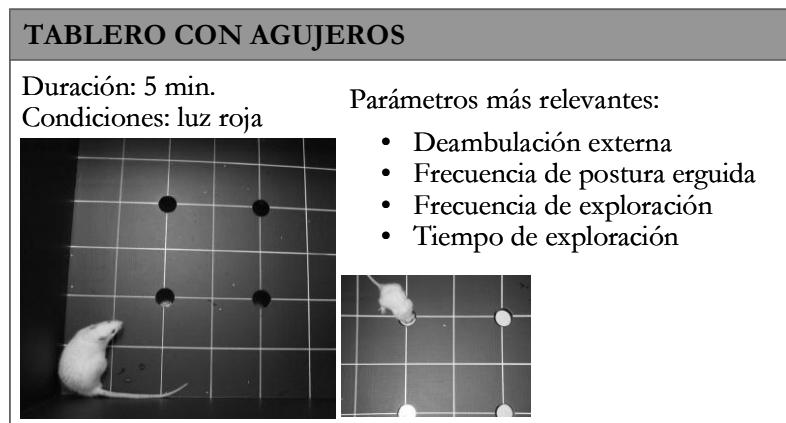
El comportamiento de los animales en el laboratorio se realiza en espacios cerrados en los que los animales evitan los riesgos potenciales asociados a la zona central, y muestran una clara preferencia por las zonas próximas a paredes y esquinas que ofrecen una cierta protección. Esta tendencia de las ratas a desplazarse en contacto con paredes se denomina tigmotaxis. La observación del comportamiento de los animales en estos espacios cerrados permite el análisis de parámetros motores, actividad motora horizontal y vertical, y la observación de comportamientos relevantes tales como el atusamiento rostral o *grooming*.

Una variante al estudio del comportamiento espontáneo de los animales en un espacio cerrado es la introducción de estímulos en la zona central del tablero, estímulos que frecuentemente se encuentran representados por la introducción de agujeros (**Tablero con agujeros**). En este tipo de paradigmas, los animales sufren un marcado conflicto de intereses entre su natural tendencia exploratoria y su “miedo” a aventurarse en la zona central del tablero donde se encuentran los agujeros. La evaluación del comportamiento animal en este tipo de paradigmas ofrece la posibilidad de evaluar de forma independiente la actividad motora y la actividad exploratoria por ellos desplegada (File, 1992; File y Wardill, 1975). El empleo de este paradigma comportamental, el

ANEXO II

tablero con agujeros, permite además la estimación complementaria del estado emocional de los animales ya que ha sido establecida una estrecha relación entre los parámetros exploratorios y los niveles de ansiedad de los individuos (Rodríguez Echandia *et al.*, 1987; Takeda *et al.*, 1998).

A menudo las ratas se muestran temerosas cuando son expuestas por primera vez a un ambiente nuevo y desconocido, sin embargo este miedo suele disminuir tras exposiciones repetidas, o tras la exposición prolongada a dicho ambiente, se considera entonces que se ha producido una habituación al ambiente. Este fenómeno de habituación puede ser también de utilidad a la hora de evaluar el estatus emocional de los animales.

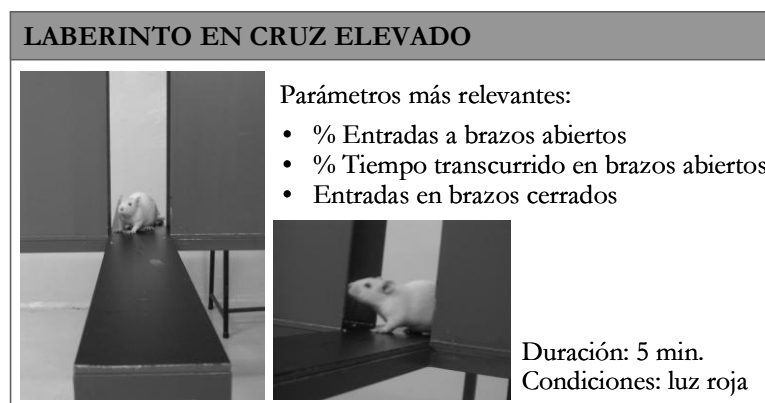


Evaluación de los niveles de ansiedad

Los modelos animales empleados para el análisis de los niveles de ansiedad se basan también en su comportamiento espontáneo. La diversidad de modelos animales para la evaluación de las respuestas de ansiedad se basa en la variedad de comportamientos susceptibles de evaluación. Así, por ejemplo, si consideramos la naturaleza social de las ratas evaluaremos los niveles de ansiedad mediante el *test* de interacción social, mientras que si consideramos su aversión a las alturas y a los espacios abiertos emplearemos el **laberinto en cruz elevado**. En el caso de la presente Tesis, se empleó el segundo tipo de prueba.

- **Laberinto en cruz elevado:** Es un modelo comportamental validado para el análisis de los niveles de ansiedad en roedores, y se basa en su natural

aversión por los espacios abiertos y por las alturas. En este modelo la principal medida de ansiedad viene dada por la frecuencia de entradas y por el tiempo transcurrido por el animal en los brazos abiertos respecto al total de entradas y de tiempo transcurrido en los brazos, empleándose, por norma general, los correspondientes porcentajes en el análisis de datos. Este paradigma proporciona medidas adicionales de actividad locomotora general a través del parámetro correspondiente al número de entradas en brazos cerrados (Fernandes y File, 1996; File, 1992; Pellow *et al.*, 1985).



Los modelos animales de ansiedad son validados en función de su utilidad en la evaluación de fármacos ansiolíticos, y dicha validación ha sido clásicamente realizada mediante el empleo de benzodiazepinas, lo cual supone una importante limitación ya que no todos los trastornos de ansiedad son susceptibles al tratamiento con benzodiazepinas. Se ha sugerido la posibilidad de que cada uno de los modelos animales de ansiedad modelice y refleje alteraciones neurobiológicas subyacentes a diferentes trastornos de ansiedad. Así que el laberinto en cruz elevado ha sido más relacionado con un modelo de trastorno de pánico, si es la primera vez que el animal es expuesto al laberinto (*trial 1*), o de fobia específica si ha sido ya previamente expuesto (*trial 2*) (Fernandes y File, 1996).

Evaluación del fenotipo depresivo

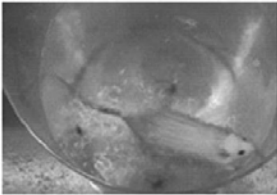
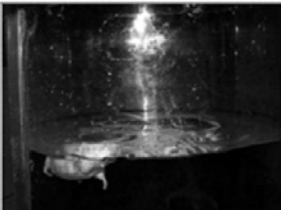
Unos de los aspectos más complejos a la hora de tratar de modelizar enfermedades de tipo neurológico en los animales es la complejidad de los síntomas, así como las evidentes diferencias existentes entre las diferentes especies. Es por ello que algunas pruebas comportamentales se han desarrollado con el fin de detectar

comportamientos que tienen ciertas similitudes con la sintomatología que se ha observado en humanos. En el caso de los roedores, cuando son obligados a hacer frente a una situación adversa de la que resulta imposible escapar, acaban desarrollando un comportamiento que se ha denominado de “desesperación” (*despair behaviour*). La aparición de este comportamiento se caracteriza porque el individuo cesa cualquier intento por escapar de la situación en la que está, y se ha visto modulado por el empleo de fármacos con actividad antidepresiva en humanos (Porsolt *et al.*, 1978; Porsolt *et al.*, 1977). Una de las pruebas más usadas, basada en el desarrollo de este comportamiento es el **Test de natación forzada** o **Test de Porsolt**. Este test consiste en dos fases: en la primera se obliga a nadar a los roedores en un espacio reducido, y del que no pueden salir, durante un tiempo más o menos prolongado. Durante los primeros momentos de esta fase los roedores intentan sin éxito escapar de esa situación, para acabar por adquirir una actitud pasiva (inmovilidad) ante la imposibilidad de salir del agua. En la segunda fase (24 horas después) los roedores son obligados a nadar en las mismas condiciones que el día anterior, pero en un intervalo de tiempo mucho menor, y durante este periodo los animales adquieren rápidamente la actitud pasiva de inmovilidad, conocedores de la imposibilidad de escape, es decir han desarrollado el “*despair bahaviour*”. El tiempo que permanecen inmóviles los animales en esta segunda fase de la prueba es significativamente reducido cuando al animal se le administran fármacos de acción antidepresiva (Porsolt *et al.*, 1977). Así pues, esta prueba resulta de gran utilidad para valorar el fenotipo más o menos depresivo de los animales sometidos a diferentes tratamientos o manipulaciones genéticas (Cryan y Mombereau, 2004; Shearman *et al.*, 2003).

Los parámetros que suelen analizarse en esta prueba son los siguientes:

- **Tiempo de inmovilidad:** Se considera el periodo en el que animal no realiza ningún movimiento más que los necesarios para mantener la cabeza fuera del agua.
- **Latencia:** Tiempo que el animal tarda en alcanzar el primer estado de inmovilidad desde el comienzo de la prueba.
- **Natación:** Tiempo en el que el animal realiza movimientos activos de desplazamiento sobre la superficie del agua, más allá de lo necesario para mantener la cabeza fuera del agua.
- **Escalada (*Climbing*):** Es el tiempo que el animal dedica a hacer movimientos bruscos buscando huir de la piscina, normalmente consiste en el movimiento de las

cuatro patas intentando escalar las paredes de la piscina o saltar fuera del agua, algunos autores lo conocen también como “lucha” (*struggling*).

TEST DE NATACIÓN FORZADA	
	<u>Parámetros más relevantes:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de inmovilidad • Tiempo de latencia • Natación • <i>Climbing</i>
	<u>2 Fases:</u> <ul style="list-style-type: none"> - 1ª fase: 15 min natación. - 2ª fase: 5 min natación. <u>Condiciones:</u> <ul style="list-style-type: none"> - Temperatura del agua $23 \pm 1^\circ\text{C}$ - Luz roja

Evaluación de la memoria y aprendizaje.

Existen diferentes tipos de pruebas pensadas para evaluar la capacidad de retención de información y la capacidad cognitiva en procesos que requieren un aprendizaje por parte de los animales. Algunas de estas pruebas evalúan lo que se conoce como la memoria de trabajo, que es un tipo de memoria a corto plazo necesaria para almacenar cierta información que permita al individuo realizar alguna tarea concreta (Baddeley, 1992). En el caso de los roedores estas pruebas pueden basarse en la tendencia que presentan a la exploración. Por ejemplo, cuando los roedores son expuestos a un objeto que ya han explorado (familiar o conocido) y, simultáneamente, a otro que para ellos es desconocido (nuevo), tienden a pasar más tiempo explorando el segundo, ya que el primero permanece en su memoria. Así, esta espontánea preferencia por el objeto nuevo que desarrollan los roedores es en la que se basa una de las pruebas que han sido usadas para medir el nivel cognitivo de los animales, el **test de reconocimiento de objeto** (Ennaceur y Delacour, 1988). Entre las ventajas de este tipo de prueba, está que al basarse únicamente en el comportamiento espontáneo del animal se puede hablar de memoria de trabajo “pura” sin que intervengan otros componentes relacionados con otros tipos de memoria (Ennaceur y Delacour, 1988). Una variante de esta prueba es el **test de localización de objeto**, en el que, a diferencia del anterior, no se pone un objeto nuevo, si no que uno de los ya conocidos se cambia de lugar. En

principio se basa en la misma tendencia de los roedores a explorar lo novedoso, en este caso el animal retendría la antigua localización del objeto que no se haya movido (objeto familiar) y tendería a explorar más el que ha cambiado de posición (objeto nuevo), evaluándose en este caso la memoria espacial a corto plazo de los animales (Ennaceur *et al.*, 2005). En ambos casos se trata de pruebas de memoria a corto plazo, ya que los periodos entre la fase de entrenamiento, en la que los animales son expuestos a los dos objetos “familiares” y la de la prueba, en la que son expuestos al objeto “familiar” y al “nuevo” duran el orden de minutos o algunas horas.

En ambas pruebas lo que se evalúa es prácticamente lo mismo, aunque el protocolo entre una y otra varíe un poco. En el caso de la presente Tesis lo que se evaluó fue:

- **Índice de discriminación (ID):** Diferencia entre el tiempo que exploraba el objeto nuevo (N) y el familiar (F), dividido por el tiempo total que al animal había explorado ambos objetos: $ID=(N-F)/(F+N)$

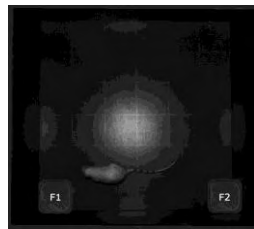
- **El tiempo total de exploración de ambos objetos** durante el entrenamiento y la prueba de memoria.

- **Tiempo de latencia de exploración.** lo que tarda en explorar el primer objeto. Determina si existe algún tipo de reparo por parte del animal a comenzar la exploración.

- **Tiempo que exploran cada objeto y frecuencia,** durante el entrenamiento, lo que permite estudiar si existe preferencia por alguno. Durante la prueba de memoria es útil sólo el tiempo, para determinar el índice de discriminación o memoria.

- **Otros comportamientos.** Tanto durante la fase de entrenamiento como la de memoria se puede estudiar tiempo y frecuencia de atusamiento rostral o *grooming*, postura erguida, inmovilidad y defecaciones.

TEST DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO



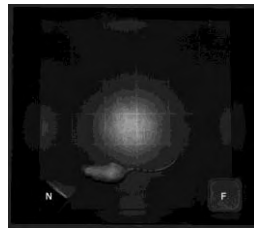
2 Fases:

- 1ª fase: Entrenamiento. Exploración objetos familiares (F) (no más de 30 seg.). Duración máxima de la fase 4 min.

- 2ª fase: Test (4 horas después del entrenamiento). Un objeto F se cambia por uno nuevo (N). Duración 3 minutos.

Condiciones:

- Luz blanca tenue.



En la presente Tesis Doctoral también se ha usado otra prueba destinada a medir el estado cognitivo de los animales, la conocida como la **prueba de alternancia espontánea**. Este paradigma comportamental estudia la memoria a muy corto plazo, y se basa, como en los casos anteriores, en la actividad exploratoria de los roedores. El aparato es un laberinto formado por tres brazos de igual forma y tamaño, y una zona neutra que los conecta, siendo la única diferencia entre los brazos ciertas señales visuales colocadas en cada uno. En esta prueba, el principio de alternancia está basado en el hecho de que el animal preferirá visitar el brazo en el que haya estado menos recientemente, por lo que debe recordar cual es el último brazo que visitó [ver (Paul *et al.*, 2009)]. Si el tiempo que se deja explorar al animal el laberinto es suficiente obtendremos, al final de la prueba, un número de entradas en los diversos brazos del que podremos calcular un índice de alternancia que nos dará información acerca de su estado cognitivo. Así pues lo que se evalúa en esta prueba es:

- **Índice de discriminación o memoria:** el índice de memoria se calcula dividiendo el número de alternancias (entrada en los tres brazos distintos consecutivamente) entre el número total de entradas en brazos totales menos una.

$$ID = N/(T-1)$$


N= número de veces que ha entrado en los brazos de forma consecutiva.

T= número total de entradas en los brazos.

- **Número de entradas en los brazos.** Tanto en cada brazo, como las totales. Además del índice de discriminación, nos permitirá obtener información de la actividad motora espontánea y si existe algún tipo de preferencia por alguno de los brazos en particular. Se considera que el animal entra en un brazo cuando las cuatro patas están dentro del mismo.

- **Tiempo en cada brazo.** Similar a la frecuencia en cada brazo.

- Otros comportamientos pueden ser tomados en cuenta en esta prueba, tales como % de tiempo en postura erguida, % tiempo de atusamiento rostral, % tiempo inmovilidad. Evaluar estos comportamientos puede dar información acerca del nivel de emotividad del animal así como de su actividad exploratoria y vertical.

TEST DE ALTERNANCIA ESPONTÁNEA	
	<p><u>Parámetros más relevantes:</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Número de entradas en cada brazo• Tiempo en cada brazo• Índice de discriminación o memoria <p>Condiciones: Luz blanca tenue.</p> <p>Duración: 8 minutos.</p>

ANEXO III.

Revisiones derivadas de la presente Tesis Doctoral:

De la Fuente M, **Llorente R**, Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Cruces J, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation in rats: a proposed animal model for the study of developmental neuroimmunoendocrine interactions. **Ann N Y Acad Sci 1153: 176-83.**

Marco EM, Adriani W, **Llorente R**, Laviola G, Viveros MP (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. **Neurosci. Biobehav. Rev. 33: 498- 507.**

Viveros MP, **Llorente R**, Lopez-Gallardo M, Suarez J, Bermudez-Silva F, De la Fuente M, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Segura LM (2009) Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. **Psychoneuroendocrinology 34 Suppl 1: S217-26.**

Viveros MP, **Llorente R**, Suarez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, Rodriguez de Fonseca F (2011) The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: Sex differences and neuropsychiatric implications. **Psychopharmacology**. In Press.

ANEXO IV. SUMMARY AND CONCLUSIONS

TITLE: "Psychoimmunoendocrine characterization of an animal model of psychiatric disorders based on neurodevelopmental hypothesis; implications of endocannabinoid system"

Title of Doctoral Thesis: "Psychoimmunoendocrine characterization of an animal model of psychiatric disorders based on neurodevelopmental hypothesis; implications of endocannabinoid system"

One obvious limitation in developing animal models for psychiatric diseases is that, due to the nature and complexity of the human symptoms, it is impossible to reproduce the disease in its entirety. However, several experimental models have been developed in an attempt to mimic specific signs of diverse neuropsychiatric disorders. These procedures allow experimental controls that are not possible in human studies and provide a valuable approach for the investigation of neurobiological substrates. Evidence indicates that traumatic experiences during early developmental periods might be associated with psychopathology (such as depression or schizophrenia) and altered neuroendocrine function later in life and several experimental models have been developed in an attempt to mimic diverse types of early life stress. In the present study we have chosen as our main experimental model the early maternal deprivation model (MD). Notably, previous studies had indicated that adult rats submitted to the 24-h episode of MD at PND 9 showed behavioural abnormalities that resemble psychotic-like symptoms, including disturbances in pre-pulse inhibition, latent inhibition and auditory sensory gating and startle habituation. Regarding possible underlying neurochemical correlates, adult MD animals showed, among other changes, a significant reduction in hippocampal levels of polysialylated neuronal cell adhesion molecule (PSA-NCAM) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a significant decrease in the mRNA levels of glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits, NR-2A and NR-2B. These changes are suggestive of a loss of synaptic plasticity and hypofunctionality of the glutamatergic system, as recently postulated for schizophrenia.

One of our objectives was to provide new data for a more complete psychoneuroimmunoendocrine characterization of this animal model, from a multidisciplinary perspective by evaluating its effects in adolescent rats of both sexes. In previous studies we had found that cannabinoid compounds counteracted the enhanced impulsivity of maternally deprived animals and that the cannabinoid receptor

SUMMARY

agonist WIN 55,212-2 showed neuroprotective properties in neonatal rats. So, we hypothesised that this compound could counteract at least some of the detrimental effects that we expected to find in maternally deprived animals. Accordingly, the drug was administered immediately after the maternal deprivation period. Maternally deprived males showed significantly decreased motor activity in the holeboard and the plus-maze. The cannabinoid agonist induced, exclusively in males, a significant anxiogenic-like effect, which was reversed by maternal deprivation. In the forced swimming test, both treatments independently induced depressive-like responses. Maternal deprivation reduced immunological function whereas the drug exerted tissue-dependent effects on the immune parameters analyzed. Maternally deprived females showed reduced corticosterone levels whereas the cannabinoid agonist increased hormone concentration in all groups. In general, the results show detrimental effects of both treatments as well as intriguing interactions, notably in relation to emotional behaviour and certain immunological responses. In order to provide a more complete dynamic picture of MD immunological changes, we further analyzed the effects of MD at PND 13 and in adulthood (PND 75). In both male and female neonatal animals, MD caused significant decreases in the natural killer activity of cells from thymus as well as in the proliferative response to lipopolysaccharide and in the chemotaxis of lymphocytes from thymus and spleen. In adulthood, both male and female MD animals showed marked reductions in the natural killer activity and lymphoproliferative responses of cells obtained from thymus and spleen as well as a reduced lymphoproliferation in response to ConcanavalinA that, in the thymus, was significant in male animals.

We also aimed to address the effects of MD on the levels of serotonin (5-HT) and dopamine (DA) and their metabolites in prefrontal cortex (PFC), hippocampus, striatum, midbrain and cerebellum of periadolescent 35-day-old rats. The brain regions and neurochemical systems were chosen on the basis of their close functional relationship with the emotional behavioural profile induced by MD. Rats submitted to MD showed significantly increased levels of 5-HT in all regions studied with the exception of cerebellum. In addition, MD animals showed increased levels of DA in PFC as well as increased levels of DA and a decrease of DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid)/DA and HVA (Homovanillic acid) ratios in striatum. The effect of MD on the monoaminergic systems was in several cases sex-dependent.

According to the neurodevelopmental theory, we hypothesized that the behavioural alterations observed in adolescent and adult rats might be mediated by detrimental neurodevelopmental processes that might be associated, at least partially, with stress-induced corticosterone responses. In order to address this hypothesis, we have focused on the hippocampus and cerebellar cortex, two brain regions that show high density of glucocorticoid receptors, and analyzed possible neuronal and glial alterations by immunohistochemical techniques. To evaluate the presence of degenerating neurons we used Fluoro-Jade-C (FJ-C) staining and for the study of astrocytes we employed glial fibrillary acidic protein (GFAP). Within control animals, females showed significantly more GFAP positive cells than males and a trend towards more FJ-C positive cells. Maternal deprivation induced neuronal degeneration and astroglial changes in the hippocampus and cerebellar cortex of neonatal rats that, in general, were more marked in males. At the same age, postnatal day (PND) 13, we have found that MD rats show a significant decrease in leptin levels as well as increased corticosterone and ACTH (adrenocorticotrophic hormone) levels and we discuss the possible effects of elevated glucocorticoids and decreased leptin levels in mediating the cellular alterations in developing hippocampus and cerebellum. These neural alterations of neonatal MD rats appear to support our claim that the MD neonatal stress may be a potential model to analyze neuropsychiatric symptoms with a basis in neurodevelopment.

Several lines of evidence support an association between an altered endocannabinoid system and the pathogenesis of schizophrenia. Moreover, frequent cannabis use significantly increases the risk for psychotic symptoms and schizophrenia. In addition, the endocannabinoid system appears to play a major role in brain development. Based on the previously reported psychotic-like symptoms in adult MD animals and on our findings of cellular changes in relevant brain regions such as the hippocampus, we expected that MD might also induce alterations in the endogenous cannabinoid system. Our results confirmed that neonatal MD animals showed an increased level of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol (2-AG) and a decrease in hippocampal CB1 immunoreactivity. Again, these alterations were more marked in male animals. Concordant with the decreased 2-AG levels, we have also found that MD induced a significant decrease in hippocampal MAGL (monoacylglycerol lipase), the

SUMMARY

enzyme involved in the degradation of this endocannabinoid, again more marked in males. This sexual dimorphism was in agreement with our previous results showing that 13-day-old male rats were also more affected than corresponding females regarding hippocampal neuronal and glial alterations. Moreover, two inhibitors of endocannabinoid inactivation modulated the above indicated hippocampal cellular effects induced by the MD stress. As a whole, these data support a clear association between neurodevelopmental stress and dysregulation of the endocannabinoid system. This association may be relevant for schizophrenia and other neurodevelopmental psychiatric disorders. Moreover, we propose that the MD procedure may provide a relevant experimental model to further address the role of the endocannabinoid system in brain development and its possible implications in neurodevelopmental mental illnesses.

In the last years, magnetic resonance techniques have been applied to the field of biomedical research. Actually, metabolic changes in hippocampus (HIP) and prefrontal cortex (PFC) have been described among schizophrenic patients by using *ex vivo* High-Resolution Magic Angle Spinning proton nuclear MR spectroscopy (HR-MAS). Therefore, we aimed to investigate whether similar changes in the brain metabolic profile, measured by using *ex vivo* HR-MAS, could be described in our MD animal model. In the short-term (PND 13), MD appeared to have critically influenced the metabolic profile of both HIP and PFC in MD male and female rats compared to control non-deprived animals. Glutamine and glutamate (Glx) were found to be reduced within these brain regions, whereas taurine content seemed to have increased in HIP and PFC of both male and female rats. Differences in prefrontal N-acetyl aspartate and hippocampal phosphoethanolamine have also been found as a function of the MD protocol. In addition, MD induced some other region- and sex-dependent effects. Present findings point at a different brain metabolic profile in our animal model of early life stress, thus suggesting its potential utility in the implementation of translational neuropsychiatric research.

In addition to the perinatal period, adolescence represents another critical developmental phase during which the nervous system shows a unique plasticity. This transition period from neonate to adulthood involves ongoing maturation of the central nervous system including maturation and rearrangement of major neurotransmitter

pathways. In general, there are important maturational changes in several brain areas important for cognition, emotion, motivation and reactivity to stress such as the prefrontal cortex and limbic brain structures. Moreover, a “window of vulnerability” appears to exist during the periadolescent period regarding the onset of certain neuropsychiatric disorders. Thus, adolescence too may be a period of unique vulnerability for persistent effects of chronic stress. In relation to the etiopathogenesis of diverse neuropsychiatric disorders, the “two-hit” hypothesis states that early developmental factors may act as a “first hit” that would increase relative vulnerability to developing a given psychiatric disease when additional stressful events (“second-hit”) are superimposed later in life. In this model, the “first hit” consists of predisposing genetic factors and/or early environmental factors and the “second hit” consists of one or more environmental factors, such as drug abuse or social stress. Within the framework of this theory, in the last experiment of this Thesis MD was used for mimicking a “first hit” and chronic unpredictable stress (CUS) exposure during adolescence (PND 28 to PND 43) was used as the “second hit”. We aimed to carry out an extensive evaluation of long term psychoneuroendocrine effects in this “two hit” animal model. Animals were tested in the elevated plus maze (EPM, anxiety) at PND 44 and in two memory tests, spontaneous alternation (SAT) and novel object recognition (NOT) in the adulthood. The expression of hippocampal glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid (MR) receptors as well as of synaptophysin, neural cell adhesion molecule (NCAM) and BDNF was analyzed by in situ hybridization in selected hippocampal regions. Endocrine determinations of leptin, testosterone and estradiol plasma levels were carried out by radioimmunoassay. Young CUS animals showed increased percentages of time and entries in the open arms of the EPM irrespective of neonatal treatment. Memory impairments were induced by the two stressful treatments as was revealed by the NOT, with males being most clearly affected. Whereas each stressful procedure, when considered separately, induced different effects on the three synaptic molecules analyzed and affected differently males and females, the combination of MD and CUS induced an unique disruptive effect on the three synaptic plasticity players. MD induced a long term significant decrease in hippocampal GR only in males, whereas CUS tended to increase MR in males and to decrease them in females. Both, neonatal MD and periadolescent CUS induced marked reductions in testosterone and estradiol in males, whereas MD male animals also showed significantly decreased leptin levels. In contrast, in females none of the hormones analyzed was

SUMMARY

altered by any of the stressful procedures. Taking our data together in support of the “two-hit” hypothesis, MD during neonatal life and/or exposure to CUS during the periadolescent period induced a permanent deficit in memory accompanied by a decrement in markers for hippocampal plasticity. The long-term effects on body weight and hormone levels, particularly among males, might reflect sex-dependent lasting metabolic alterations as well as an impaired reproductive function.

Animal models for different neuropsychiatric disorders hardly contemplate the existence of sexual dimorphisms. Our data on the MD model has provided evidence for sex-dimorphic responses to this form of neonatal stress. Sex differences might be attributable to a greater vulnerability of males to this kind of early environmental insult and/or to sex-dependent differences in the onset and/or progression of the effects. Mechanisms underlying sex differences might be also related to the organizational effects of gonadal steroids in the brain. In any case, the present experimental procedure may be instrumental in elucidating sex-dependent mechanisms of neurodevelopmental psychiatric disorders with a basis in early environmental insults. Our data emphasize the necessity of considering the potential influence of sex/gender in animal and human studies related to neurodevelopmental psychiatric disorders.

List of original articles and publications containing the results obtained in this Doctoral Thesis:

Original articles:

Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la FM, Viveros MP (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. **Psychoneuroendocrinology 32: 636-650.**

Llorente R, Llorente-Berzal A, Petrosino S, Marco EM, Guaza C, Prada C, López-Gallardo M, Di Marzo V, Viveros MP (2008) Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: A possible role for the endocannabinoid system. **Dev Neurobiol 68: 1334-47.**

Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Segura LM, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. **Int J Dev Neurosci 27: 233-41.**

Llorente R, O'Shea E, Gutierrez-López MD, Llorente-Berzal A, Colado MI, Viveros MP (2010) Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. **Neurosci Lett** **479**: 112-7

Suárez J, **Llorente R**, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermudez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. **Hippocampus** **19**: 623-32

Suárez J, Rivera P, **Llorente R**, Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2010) Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. **Brain Res** **1349**: 162-73

Llorente R, Miguel-Blanco C, Aisa B, Lachize S, Borcel E, Meijer OC, Ramirez MJ, De Kloet ER, Viveros MP (2011). Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. **J. Neuroendocrinology**. **In press**.

Llorente R, Villa Valverde P, Marco, EM, Viveros, MP (2011) Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain, a proton NMR spectroscopy study. Sent to **NMR in Biomed**. **January 2011**.

Reviews:

De la Fuente M, **Llorente R**, Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Cruces J, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation in rats: a proposed animal model for the study of developmental neuroimmunoendocrine interactions. **Ann N Y Acad Sci** **1153**: 176-83.

Marco EM, Adriani W, **Llorente R**, Laviola G, Viveros MP (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. **Neurosci. Biobehav. Rev.** **33**: 498-507.

Viveros MP, **Llorente R**, Lopez-Gallardo M, Suarez J, Bermudez-Silva F, De la Fuente M, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Segura LM (2009) Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. **Psychoneuroendocrinology** **34 Suppl 1**: S217-26.

Viveros MP, **Llorente R**, Suarez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, Rodriguez de Fonseca F (2011) The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: Sex differences and neuropsychiatric implications. Sent to **Journal of Psychopharmacology** on **January 2011**.

CONCLUSIONS

Maternal deprivation model

Adolescence

1. Animals submitted to early maternal deprivation (MD) showed, in the adolescence, diverse behavioural changes, including a decreased rearing behaviour in males and a significant increase in the immobility time in the forced swimming test in both, males and females. Moreover, latency to reach a floating posture was significantly decreased in MD males, suggesting a depressive-like phenotype.

2. Adolescent MD animals showed a significant alteration in their serotonergic system, as revealed by the increase of serotonin within hippocampus, midbrain, frontal cortex and striatum, as well as an increase in striatal dopamine.

3. The MD protocol induced an important decrease in the body weight from PND 10 until the late adolescent period, with this effect being more marked in males than in females.

Neonatal period

4. Early MD induced a significant increase in corticosterone and a significant decrease in leptin circulating levels at PND 13. At this same age, MD males showed a significant increase in the number of GFP + and Fj-C+ cells in the hippocampus.

5. Two inhibitors of endocannabinoid inactivation, AA-5-HT and OMDM2, induced a reversion of the cellular (significant increase of hippocampal GFAP + cells) and endocrine (increased corticosterone levels) effects caused by MD. These drugs also induced a decrease in the number of hippocampal GFAP + cells within control no MD females.

6. Early MD induced diverse changes in the hippocampal endocannabinoid system of the neonatal animals (PND 13), particularly in males. Thus MD males showed a significant reduction in CB₁ receptor and an increase in CB₂ receptor expression, an increase 2-AG content and a decrease in both the immunoreactivity and the RNAm levels of MAGL, the enzyme which hydrolyzes 2-AG. These results clearly indicate that MD induced a dis-regulation of the developing endocannabinoid system.

7. Maternal deprivation caused important alterations in the metabolic profile of hippocampus and frontal cortex of neonatal rats. In particular, this the neonatal stress modified the levels of metabolites such as N-Acetyl aspartate, glutamine, glutamate, choline, taurine and phosphorilethanolamine, and the nature of these effects depended on the sex of the animals and the region analysed.

Regarding the “two hits” model (24 h of maternal deprivation at PND 9 and chronic unpredictable stress during adolescence)

Adulthood

8. Animals submitted to chronic unpredictable stress (CUS) (both MD and no MD groups) showed a significant increase in the percentage of entries and time in the open arms of the elevated plus maze. This finding might be interpreted as an increase in risk-taking behaviour

9. In the novel object recognition test both stressful treatments (neonatal MD and juvenile CUS) induced significant memory impairments, with this effect being more marked in males than in females.

10. Each stressful protocol, separately, caused different sex-dependent alterations in the expression of proteins related with synaptic plasticity (BDNF, NCAM, synaptophysin). However, combination of both protocols induced a significant and unique reduction of the three proteins in both sexes.

11. MD induced a decrease in hippocampal GR expression in males, whereas the CUS protocol showed a trend to increase the hippocampal MR expression in males and to decrease these receptors in females.

12. Both, MD and CUS induced long-term reductions in testosterone and estradiol plasmatic levels in males. MD also induced a decrease in circulating leptin levels of males. However none of the stressful protocols induced any significant endocrine effect in females.

BIBLIOGRAFÍA

- Abi-Dargham A. 2007. Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 78:133-64.
- Acosta M, Gallo V, Batshaw ML. 2002. Brain development and the ontogeny of developmental disabilities. *Adv Pediatr* 49:1-57.
- Adamczyk P, Golda A, McCreary AC, Filip M, Przegalinski E. 2008. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. *J Physiol Pharmacol* 59(2):217-28.
- Adriani W, Chiarotti F, Laviola G. 1998. Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behav Neurosci* 112(5):1152-66.
- Adriani W, Laviola G. 2004. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol* 15(5-6):341-52.
- Afadlal S, Polaboon N, Surakul P, Govitrapong P, Jutapakdeegul N. 2010. Prenatal stress alters presynaptic marker proteins in the hippocampus of rat pups. *Neuroscience Letters* 470(1):24-27.
- Agarwal N, Port JD, Bazzocchi M, Renshaw PF. 2010. Update on the use of MR for assessment and diagnosis of psychiatric diseases. *Radiology* 255(1):23-41.
- Agrawal A, Neale MC, Prescott CA, Kendler KS. 2004. Cannabis and other illicit drugs: comorbid use and abuse/dependence in males and females. *Behav Genet* 34(3):217-28.
- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I. 2005. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J* 19(12):1704-6.
- Aguado T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G, Lutz B, Guzmán M, Galve-Roperh I. 2007. The CB1 Cannabinoid Receptor Mediates Excitotoxicity-induced Neural Progenitor Proliferation and Neurogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 282(33):23892-23898.
- Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, Flier JS. 1999. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* 140(6):2755-62.
- Ahmad A, Rasheed N, Banu N, Palit G. 2010. Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* 13(4):356-365.

BIBLIOGRAFÍA

- Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. 2009. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus* 19(12):1222-31.
- Alonso A, Fernandez R, Moreno M, Ordonez P, Diaz F, Gonzalez C. 2007. Leptin and its receptor are controlled by 17beta-estradiol in peripheral tissues of ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 232(4):542-9.
- Amantea D, Spagnuolo P, Bari M, Fezza F, Mazzei C, Tassorelli C, Morrone LA, Corasaniti MT, Maccarrone M, Bagetta G. 2007. Modulation of the endocannabinoid system by focal brain ischemia in the rat is involved in neuroprotection afforded by 17beta-estradiol. *FEBS J*.
- Anand KJ, Scalzo FM. 2000. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biol Neonate* 77(2):69-82.
- Anavi-Goffer S, Mulder J. 2009. The polarised life of the endocannabinoid system in CNS development. *Chembiochem* 10(10):1591-8.
- Andersen SL. 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27(1-2):3-18.
- Andersen SL, Gazzara RA. 1993. The ontogeny of apomorphine-induced alterations of neostriatal dopamine release: effects on spontaneous release. *J Neurochem* 61(6):2247-55.
- Andersen SL, Teicher MH. 2008. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends Neurosci* 31(4):183-91.
- Andersen SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC, Teicher MH. 2000. Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse* 37(2):167-9.
- Andrey SB, Chan ML, Power WP. 2010. HRMAS 1H NMR conformational study of the resin-bound amyloid-forming peptide GNNQQNY from the yeast prion Sup35. *J Phys Chem A* 114(10):3457-65.
- Anke W, Patrick W, Soyon H, Michel K, Thomas MI, Nephi S. 2004. Endocannabinoids accumulate in spinal cord of SOD1^{G93A} transgenic mice. *Journal of Neurochemistry* 89(6):1555-1557.
- Antonio P, Filomena F, Salvatore G, Natalia B, Simone N, Alessandro F-A, Giorgio B, Livia B, Mariangela P, Paolo Sy otros. 2005. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. *Annals of Neurology* 57(5):777-779.
- Arborelius L, Eklund MB. 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.

- Argente J, Barrios V, Chowen JA, Sinha MK, Considine RV. 1997. Leptin plasma levels in healthy Spanish children and adolescents, children with obesity, and adolescents with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Pediatr* 131(6):833-8.
- Artigas F. 2010. The prefrontal cortex: a target for antipsychotic drugs. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 121(1):11-21.
- Ashton JC, Rahman RMA, Nair SM, Sutherland BA, Glass M, Appleton I. 2007. Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain. *Neuroscience Letters* 412(2):114-117.
- Atkinson HC, Leggett JD, Wood SA, Castrique ES, Kershaw YM, Lightman SL. 2010. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Circadian Rhythm by Endocannabinoids Is Sexually Diergic. *Endocrinology* 151(8):3720-3727.
- Avital A, Richter-Levin G. 2005. Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. *Int J Neuropsychopharmacol* 8(2):163-73.
- Baddeley A. 1992. Working memory. *Science* 255(5044):556-9.
- Bahr BA, Karanian DA, Makanji SS, Makriyannis A. 2006. Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. *Expert Opin Invest Drugs* 15(4):351-365.
- Baldaçara L, Borgio JGF, Lacerda ALTd, Jackowski AP. 2008. Cerebellum and psychiatric disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 30:281-289.
- Barton SJ, Howe FA, Tomlins AM, Cudlip SA, Nicholson JK, Bell BA, Griffiths JR. 1999. Comparison of in vivo ¹H MRS of human brain tumours with ¹H HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples in vitro. *MAGMA* 8(2):121-8.
- Bayer TA, Falkai P, Maier W. 1999. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *J Psychiatr Res* 33(6):543-8.
- Bazak N, Kozlovsky N, Kaplan Z, Matar M, Golan H, Zohar J, Richter-Levin G, Cohen H. 2009. Pre-pubertal stress exposure affects adult behavioral response in association with changes in circulating corticosterone and brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology* 34(6):844-58.
- Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner My otros. 2005. Strategies and Methods for Research on Sex Differences in Brain and Behavior. *Endocrinology* 146(4):1650-1673.
- Begbie J, Doherty P, Graham A. 2004. Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo. *J Anat* 205(3):213-8.
- Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J. 2003. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23(35):11136-41.

BIBLIOGRAFÍA

- Benito C, Romero JP, Tolón RM, Clemente D, Docagne F, Hillard CJ, Guaza C, Romero J. 2007. Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors and Fatty Acid Amide Hydrolase Are Specific Markers of Plaque Cell Subtypes in Human Multiple Sclerosis. *J. Neurosci.* 27(9):2396-2402.
- Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urban GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty Ay otros. 2007. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* 316(5828):1212-1216.
- Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F. 2010. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: The end or a new beginning? *Pharmacology Biochemistry and Behavior* In Press, Corrected Proof.
- Bernard C, Milh M, Morozov YM, Ben Ari Y, Freund TF, Gozlan H. 2005. Altering cannabinoid signaling during development disrupts neuronal activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102(26):9388-9393.
- Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernandez ML, Romero J, Cebeira M, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. 1998. Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development* 125(16):3179-88.
- Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz JJ. 1999. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33(3):181-91.
- Bilsland LG, Dick JRT, Pryce G, Petrosino S, Di Marzo V, Baker D, Greensmith L. 2006. Increasing cannabinoid levels by pharmacological and genetic manipulation delay disease progression in SOD1 mice. *FASEB J.* 20(7):1003-1005.
- Bisaz R, Schachner M, Sandi C. 2009. Causal evidence for the involvement of the neural cell adhesion molecule, NCAM, in chronic stress-induced cognitive impairments. *Hippocampus*:n/a-n/a.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJy otros. 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163(3):463-8.
- Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. 2005. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81(2):224-38.
- Bjorksten B. 2008. Environmental influences on the development of the immune system: consequences for disease outcome. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 61:243-54.

- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. 2007. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14(12):1347-56.
- Blüml S, Seymour KJ, Ross BD. 1999. Developmental changes in choline- and ethanolamine-containing compounds measured with proton-decoupled (31)P MRS in in vivo human brain. *Magn Reson Med* 42(4):643-54.
- Bocklandt S, Vilain E. 2007. Sex differences in brain and behavior: hormones versus genes. *Adv Genet* 59:245-66.
- Bondi CO, Rodriguez G, Gould GG, Frazer A, Morilak DA. 2007. Chronic Unpredictable Stress Induces a Cognitive Deficit and Anxiety-Like Behavior in Rats that is Prevented by Chronic Antidepressant Drug Treatment. *Neuropsychopharmacology* 33(2):320-331.
- Borrell J, Vela JM, Arevalo-Martin A, Molina-Holgado E, Guaza C. 2002. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 26(2):204-15.
- Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. 2007. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry* 62(10):1103-10.
- Bouret SG, Simerly RB. 2006. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin Genet* 70(4):295-301.
- Bouwmeester H, Gerrits MAFM, Roozmond JG, Snapper J, Ronken E, Kruse CG, Westenberg HGM, van Ree JM. 2007. Neonatal basolateral amygdala lesions affect monoamine and cannabinoid brain systems in adult rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 10(06):727-739.
- Braga RJ, Petrides G, Figueira I. 2004. Anxiety disorders in schizophrenia. *Compr Psychiatry* 45(6):460-8.
- Brown AS. 2006. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull* 32(2):200-2.
- Brown AS, Derkits EJ. 2010. Prenatal Infection and Schizophrenia: A Review of Epidemiologic and Translational Studies. *Am J Psychiatry* 167(3):261-280.
- Bruinink A, Lichtensteiger W, Schlumpf M. 1983. Pre- and postnatal ontogeny and characterization of dopaminergic D2, serotonergic S2, and spirodecane binding sites in rat forebrain. *J Neurochem* 40(5):1227-36.
- Brusco A, Tagliaferro P, Saez T, Onaivi ES. 2008. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse* 62(12):944-9.
- Buka SL, Tsuang MT, Lipsitt LP. 1993. Pregnancy/Delivery Complications and Psychiatric Diagnosis: A Prospective Study. *Arch Gen Psychiatry* 50(2):151-156.

BIBLIOGRAFÍA

- Burdick KE, Gunawardane N, Woodberry K, Malhotra AK. 2009. The role of general intelligence as an intermediate phenotype for neuropsychiatric disorders. *Cogn Neuropsychiatry* 14(4-5):299-311.
- Burlina AP, Aureli T, Bracco F, Conti F, Battistin L. 2000. MR spectroscopy: a powerful tool for investigating brain function and neurological diseases. *Neurochem Res* 25(9-10):1365-72.
- Bustillo JR, Rowland LM, Jung R, Brooks WM, Qualls C, Hammond R, Hart B, Lauriello J. 2008. Proton magnetic resonance spectroscopy during initial treatment with antipsychotic medication in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 33(10):2456-66.
- Buwalda B, Nyakas C, Vosselman HJ, Luiten PG. 1995. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. *Behav Brain Res* 67(1):85-90.
- Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, Dupont C, Frick JS, Frokiaer H, Heinrich J, Garn H, Koletzko S, Lack Gy otros. 2006. Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *Br J Nutr* 96(4):774-90.
- Camozzato TS, Winkelmann-Duarte EC, Padilha CB, Miguel SP, Bonzanini L, Anselmo-Franci JA, Fernandes MC, Lucion AB. 2009. Neonatal handling reduces the number of cells in the medial preoptic area of female rats. *Brain Res* 1247:92-9.
- Carpenter-Hyland EP, Chandler LJ. 2007. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86(2):200-8.
- Casolini P, Zuena AR, Cinque C, Matteucci P, Alema GS, Adriani W, Carpinelli G, Santoro F, Alleva E, Bosco Py otros. 2005. Sub-neurotoxic neonatal anoxia induces subtle behavioural changes and specific abnormalities in brain group-I metabotropic glutamate receptors in rats. *J Neurochem* 95(1):137-45.
- Cerqueira JJ, Pego JM, Taipa R, Bessa JM, Almeida OF, Sousa N. 2005. Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *J Neurosci* 25(34):7792-800.
- Cirulli F, Francia N, Berry A, Aloe L, Alleva E, Suomi SJ. 2009. Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci Biobehav Rev* 33(4):573-85.
- Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. 2007. The hormonal control of food intake. *Cell* 129(2):251-62.
- Conejo NM, Gonzalez-Pardo H, Pedraza C, Navarro FF, Vallejo G, Arias JL. 2003. Evidence for sexual difference in astrocytes of adult rat hippocampus. *Neurosci.Lett.* 339(2):119-122.

- Connors SL, Levitt P, Matthews SG, Slotkin TA, Johnston MV, Kinney HC, Johnson WG, Dailey RM, Zimmerman AW. 2008. Fetal Mechanisms in Neurodevelopmental Disorders. *Pediatric Neurology* 38(3):163-176.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. 1998. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19(4):323-62.
- Cosentino M, Fietta A, Caldiroli E, Marino F, Rispoli L, Comelli M, Lecchini S, Frigo G. 1996. Assessment of lymphocyte subsets and neutrophil leukocyte function in chronic psychiatric patients on long-term drug therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20(7):1117-29.
- Cota D. 2008. The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:35-8.
- Cottrell EC, Ozanne SE. 2008. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav* 94(1):17-28.
- Craft RM. 2005. Sex differences in behavioral effects of cannabinoids. *Life Sci*. 77(20):2471-2478.
- Crews F, He J, Hodge C. 2007. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86(2):189-99.
- Crippa JA, Zuardi AW, Martin-Santos R, Bhattacharyya S, Atakan Z, McGuire P, Fusar-Poli P. 2009. Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. *Hum Psychopharmacol* 24(7):515-23.
- Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V, Di Marzo V. 2008. Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience* 151(4):955-68.
- Croxford JL, Yamamura T. 2005. Cannabinoids and the immune system: Potential for the treatment of inflammatory diseases? *Journal of Neuroimmunology* 166(1-2):3-18.
- Cryan JF, Mombereau C. 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry* 9(4):326-57.
- Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. 2005. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 115(6):1119-28; quiz 1129.
- Cunningham MG, Bhattacharyya S, Benes FM. 2002. Amygdalo-cortical sprouting continues into early adulthood: implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. *J Comp Neurol* 453(2):116-30.
- Champagne FA, Curley JP. 2005. How social experiences influence the brain. *Curr Opin Neurobiol* 15(6):704-709.
- Chao HM, Choo PH, McEwen BS. 1989. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat brain. *Neuroendocrinology* 50(4):365-71.

BIBLIOGRAFÍA

- Chapillon P, Patin V, Roy V, Vincent A, Caston J. 2002. Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. *Dev Psychobiol* 41(4):373-87.
- Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP. 2003. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm Res* 59(4):161-79.
- Cheng LL, Anthony DC, Comite AR, Black PM, Tzika AA, Gonzalez RG. 2000. Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro Oncol* 2(2):87-95.
- Cheng LL, Newell K, Mallory AE, Hyman BT, Gonzalez RG. 2002. Quantification of neurons in Alzheimer and control brains with ex vivo high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy and stereology. *Magn Reson Imaging* 20(7):527-33.
- Choi IY, Lee SP, Guilfoyle DN, Helpert JA. 2003. In vivo NMR studies of neurodegenerative diseases in transgenic and rodent models. *Neurochem Res* 28(7):987-1001.
- Choy KH, de Visser Y, Nichols NR, van den Buuse M. 2008. Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory. *Hippocampus* 18(7):655-67.
- Choy KH, de Visser YP, van den Buuse M. 2009. The effect of 'two hit' neonatal and young-adult stress on dopaminergic modulation of prepulse inhibition and dopamine receptor density. *Br J Pharmacol* 156(2):388-96.
- Choy KH, van den Buuse M. 2008. Attenuated disruption of prepulse inhibition by dopaminergic stimulation after maternal deprivation and adolescent corticosterone treatment in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 18(1):1-13.
- D'Amato RJ, Blue ME, Largent BL, Lynch DR, Ledbetter DJ, Molliver ME, Snyder SH. 1987. Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(12):4322-6.
- Daenen EW, Wolterink G, Van Der Heyden JA, Kruse CG, Van Ree JM. 2003. Neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus disrupt prepulse inhibition of the acoustic startle response; implications for an animal model of neurodevelopmental disorders like schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 13(3):187-97.
- Dalley JW, Mar AC, Economidou D, Robbins TW. 2008. Neurobehavioral mechanisms of impulsivity: fronto-striatal systems and functional neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav* 90(2):250-60.
- Davis JF, Krause EG, Melhorn SJ, Sakai RR, Benoit SC. 2009. Dominant rats are natural risk takers and display increased motivation for food reward. *Neuroscience* 162(1):23-30.

- Day JR, Laping NJ, Lampert-Etchells M, Brown SA, O'Callaghan JP, McNeill TH, Finch CE. 1993. Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus. *Neuroscience* 55(2):435-43.
- De Bellis MD, Keshavan MS, Beers SR, Hall J, Frustaci K, Masalehdan A, Noll J, Boring AM. 2001. Sex differences in brain maturation during childhood and adolescence. *Cereb Cortex* 11(6):552-7.
- de Kloet ER. 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul* 37(2):51-68.
- de Kloet ER, Derijk RH, Meijer OC. 2007. Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3(2):168-79.
- de Kloet ER, Rots NY, Cools AR. 1996. Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent. *Cell Mol Neurobiol* 16(3):345-56.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19(3):269-301.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. 2004. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* 141(5):765-74.
- Dean B, Sundram S, Bradbury R, Scarr E, Copolov D. 2001. Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience* 103(1):9-15.
- DeFeo EM, Cheng LL. 2010. Characterizing human cancer metabolomics with ex vivo 1H HRMAS MRS. *Technol Cancer Res Treat* 9(4):381-91.
- Del Rio M, Hernanz A, de la Fuente M. 1994. Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. *Peptides* 15(1):15-22.
- Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D. 2008. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 149(2):470-5.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258(5090):1946-9.
- Di Forti M, Morrison PD, Butt A, Murray RM. 2007. Cannabis use and psychiatric and cognitive disorders: the chicken or the egg? *Curr Opin Psychiatry* 20(3):228-34.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. 2005. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*(168):147-85.

BIBLIOGRAFÍA

- Di Marzo V, Petrosino S. 2007. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr.Opin.Lipidol.* 18(2):129-140.
- DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ. 2006. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J Neurosci* 26(26):6897-906.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16):10819-24.
- Donoso MA, Munoz-Calvo MT, Barrios V, Garrido G, Hawkins F, Argente J. 2010. Increased circulating adiponectin levels and decreased leptin/soluble leptin receptor ratio throughout puberty in female ballet dancers: association with body composition and the delay in puberty. *Eur J Endocrinol* 162(5):905-11.
- Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP. 2009. Effects of pretest manipulation on elevated plus-maze behavior in adolescent and adult male and female Sprague-Dawley rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 92(3):413-423.
- Dowie MJ, Bradshaw HB, Howard ML, Nicholson LFB, Faull RLM, Hannan AJ, Glass M. 2009. Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* 163(1):456-465.
- Duchesne A, Dufresne MM, Sullivan RM. 2009. Sex differences in corticolimbic dopamine and serotonin systems in the rat and the effect of postnatal handling. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(2):251-61.
- Eastwood SL, Harrison PJ. 2001. Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexins. *Brain Research Bulletin* 55(5):569-578.
- Egertova M, Elphick MR. 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol* 422(2):159-71.
- Elmqvist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. 1998. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1(6):445-50.
- Ellenbroek BA. 2003. Animal models in the genomic era: possibilities and limitations with special emphasis on schizophrenia. *Behav Pharmacol* 14(5-6):409-17.
- Ellenbroek BA, Cools AR. 1995. Maternal separation reduces latent inhibition in the conditioned taste aversion paradigm. *Neuroscience research communications* 17(1):27-33.
- Ellenbroek BA, Cools AR. 2000. The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background. *Neuropsychopharmacology* 23(1):99-106.

- Ellenbroek BA, Cools AR. 2002. Early maternal deprivation and prepulse inhibition: The role of the postdeprivation environment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 73(1):177-184.
- Ellenbroek BA, de Bruin NM, van Den Kroonenburg PT, van Luijtelaar EL, Cools AR. 2004. The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult Wistar rats. *Biol.Psychiatry* 55(7):701-707.
- Ellenbroek BA, Derks N, Park HJ. 2005. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress*. 8(4):247-257.
- Ellenbroek BA, Riva MA. 2003. Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia. *Clin. Neurosci. Res.* 3(4):297-302.
- Ellenbroek BA, van den Kroonenburg PT, Cools AR. 1998. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr.Res.* 30(3):251-260.
- Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research* 31(1):47-59.
- Ennaceur A, Michalikova S, Bradford A, Ahmed S. 2005. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav Brain Res* 159(2):247-66.
- Enthoven L, de Kloet ER, Oitzl MS. 2008. Effects of maternal deprivation of CD1 mice on performance in the water maze and swim stress. *Behavioural Brain Research* 187(1):195-199.
- Ernst M, Romeo RD, Andersen SL. 2009. Neurobiology of the development of motivated behaviors in adolescence: a window into a neural systems model. *Pharmacol Biochem Behav* 93(3):199-211.
- Eskandari F, Sternberg EM. 2002. Neural-immune interactions in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 966:20-7.
- Fantuzzi G. 2008. Three questions about leptin and immunity. *Brain Behav Immun.*
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana Sy otros. 2002. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110(8):1093-103.
- Fatemi SH, Earle J, Kanodia R, Kist D, Emamian ES, Patterson PH, Shi L, Sidwell R. 2002a. Prenatal viral infection leads to pyramidal cell atrophy and macrocephaly in adulthood: implications for genesis of autism and schizophrenia. *Cell Mol Neurobiol* 22(1):25-33.
- Fatemi SH, Emamian ES, Sidwell RW, Kist DA, Stary JM, Earle JA, Thuras P. 2002b. Human influenza viral infection in utero alters glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the developing brains of neonatal mice. *Mol Psychiatry* 7(6):633-40.

BIBLIOGRAFÍA

- Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Sidwell RW. 2008. The role of cerebellar genes in pathology of autism and schizophrenia. *Cerebellum* 7(3):279-94.
- Fauvelle F, Dorandeu F, Carpentier P, Foquin A, Rabeson H, Graveron-Demilly D, Arvers P, Testylier G. 2010. Changes in mouse brain metabolism following a convulsive dose of soman: a proton HRMAS NMR study. *Toxicology* 267(1-3):99-111.
- Fèlix J, Luisa De L, Juana U, Sonia P, Fernando A, Antoni C, Mercè P, Rafael R, Carme A. 2010. Content and traffic of taurine in hippocampal reactive astrocytes. *Hippocampus* 9999(9999):NA.
- Fenton WS. 2001. Comorbid conditions in schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry* 14(1):17-23.
- Fernandes C, File SE. 1996. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 54(1):31-40.
- Fernández-López D, Pazos MR, Tolon RM, Moro MA, Romero J, Lizasoain I, Martínez-Orgado J. 2007. The cannabinoid agonist WIN55212 reduces brain damage in an in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. *Pediatr Res* 62(3):255-60.
- Fernández-Ruiz J, Berrendero F, Hernandez ML, Ramos JA. 2000. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci* 23(1):14-20.
- Fernández-Ruiz J, Gomez M, Hernandez M, de Miguel R, Ramos JA. 2004. Cannabinoids and gene expression during brain development. *Neurotox Res* 6(5):389-401.
- Fernández-Ruiz JJ, Berrendero F, Hernandez ML, Romero J, Ramos JA. 1999. Role of endocannabinoids in brain development. *Life Sci* 65(6-7):725-36.
- Ferrandez MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. 1999. Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 34(5):675-85.
- Figueira ML, Ouakinin S. 2010. Gender-related endocrinological dysfunction and mental disorders. *Curr Opin Psychiatry* 23(4):369-72.
- File SE. 1992. Behavioral detection of anxiolytic action. In: Elliot JM, Heal DJ, Marsden CA, editors. *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. New York: Wiley. p 25-44.
- File SE, Wardill AG. 1975. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44(1):53-9.
- Fowler CJ, Rojo ML, Rodriguez-Gaztelumendi A. 2010. Modulation of the endocannabinoid system: Neuroprotection or neurotoxicity? *Experimental Neurology* In Press, Uncorrected Proof.
- Fox C, Merali Z, Harrison C. 2006. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res* 175(1):1-8.

- Freund TF, Katona I, Piomelli D. 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83(3):1017-66.
- Fride E. 2004. The endocannabinoid-CB receptor system: Importance for development and in pediatric disease. *Neuro Endocrinol Lett* 25(1-2):24-30.
- Fride E, Dan Y, Feldon J, Halevy G, Weinstock M. 1986. Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiol Behav* 37(5):681-7.
- Fride E, Weinstock M. 1988. Prenatal stress increases anxiety related behavior and alters cerebral lateralization of dopamine activity. *Life Sci* 42(10):1059-65.
- Furukawa TA, Ogura A, Hirai T, Fujihara S, Kitamura T, Takahashi K. 1999. Early parental separation experiences among patients with bipolar disorder and major depression: a case-control study. *J Affect Disord* 52(1-3):85-91.
- Gaillard RC. 2001. Interaction between the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the immunological system. *Ann Endocrinol (Paris)* 62(2):155-63.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232(1):54-61.
- Gallily R, Breuer A, Mechoulam R. 2000. 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice. *Eur J Pharmacol* 406(1):R5-7.
- Gaoni Y, Mechoulam R. 1964. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society* 86(8):1646-1647.
- García-Gutiérrez MA, Manzanares J. 2010. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J Psychopharmacol*.
- García-Gutiérrez MS, Pérez-Ortiz JM, Gutiérrez-Adan A, Manzanares J. 2010. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br J Pharmacol* 160(7):1773-84.
- García-Ovejero D, Arevalo-Martin A, Petrosino S, Docagne F, Hagen C, Bisogno T, Watanabe M, Guaza C, Di Marzo V, Molina-Holgado E. 2009. The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis* 33(1):57-71.
- García-Segura LM. 2009. Life Stages, Hormones, and Brain Remodeling: The Transition from Childhood to Adulthood In: Oxford University Press NY, editor. *Hormones and Brain Plasticity*. New York: Oxford University Press.
- García-Segura LM, Suárez I, Segovia S, Tranque PA, Cales JM, Aguilera P, Olmos G, Guillamon A. 1988. The distribution of glial fibrillary acidic protein in the adult rat brain is influenced by the neonatal levels of sex steroids. *Brain Res* 456(2):357-63.

BIBLIOGRAFÍA

- Giang DK, Cravatt BF. 1997. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6):2238-42.
- Giedd JN. 2004. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 1021:77-85.
- Giedd JN. 2008. The teen brain: insights from neuroimaging. *J Adolesc Health* 42(4):335-43.
- Giedd JN, Castellanos FX, Rajapakse JC, Vaituzis AC, Rapoport JL. 1997. Sexual dimorphism of the developing human brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21(8):1185-201.
- Giedd JN, Lalonde FM, Celano MJ, White SL, Wallace GL, Lee NR, Lenroot RK. 2009. Anatomical brain magnetic resonance imaging of typically developing children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48(5):465-70.
- Gillies GE, McArthur S. 2010a. Estrogen Actions in the Brain and the Basis for Differential Action in Men and Women: A Case for Sex-Specific Medicines. *Pharmacological Reviews* 62(2):155-198.
- Gillies GE, McArthur S. 2010b. Independent influences of sex steroids of systemic and central origin in a rat model of Parkinson's disease: A contribution to sex-specific neuroprotection by estrogens. *Hormones and Behavior* 57(1):23-34.
- Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, Klosterkötter J, Piomelli D. 2004. Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology* 29(11):2108-2114.
- Glass M, Dragunow M, Faull RLM. 2000. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABAA receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97(3):505-519.
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, 3rd, Herman DH, Clasen LS, Toga AWy otros. 2004. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21):8174-9.
- Goldstein JM. 2006. Sex, hormones and affective arousal circuitry dysfunction in schizophrenia. *Horm.Behav.* 50(4):612-622.
- Gomes CM, Frantz PJ, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA, Lucion AB. 1999. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz J Med Biol Res* 32(10):1239-42.
- Gomes CM, Rainecki C, Ramos de Paula P, Severino GS, Helena CV, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Sanvitto GL, Lucion AB. 2005. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J Endocrinol* 184(2):435-45.

- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071(1):10-23.
- González RG, Cheng LL, Westmoreland SV, Sakaie KE, Becerra LR, Lee PL, Masliah E, Lackner AA. 2000. Early brain injury in the SIV-macaque model of AIDS. *AIDS* 14(18):2841-9.
- Gorzalka BB, Hill MN, Hillard CJ. 2008. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32(6):1152-60.
- Goto Y, Yang CR, Otani S. 2010. Functional and Dysfunctional Synaptic Plasticity in Prefrontal Cortex: Roles in Psychiatric Disorders. *Biological Psychiatry* 67(3):199-207.
- Gould E. 1994. The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 743:73-92.
- Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. 2000. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 13(3):129-53.
- Green AI, Canuso CM, Brenner MJ, Wojcik JD. 2003. Detection and management of comorbidity in patients with schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am* 26(1):115-39.
- Greer TL, Kurian BT, Trivedi MH. 2010. Defining and Measuring Functional Recovery from Depression. *CNS Drugs* 24(4):267-284 10.2165/11530230-000000000-00000.
- Grojean S, Schroeder H, Pourie G, Charriaut-Marlangue C, Koziel V, Desor D, Vert P, Daval JL. 2003. Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup: a long term follow-up. *Neurobiol Dis* 14(2):265-78.
- Gruss M, Braun K, Frey JU, 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.
- Guillin O, Abi-Dargham A, Laruelle M. 2007. Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 78:1-39.
- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF. 2004. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20(2):441-58.
- Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP. 2008. Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem* 283(3):1754-63.
- Guzmán M, Sanchez C, Galve-Roperh I. 2002. Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther* 95(2):175-84.

BIBLIOGRAFÍA

- Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. 1994. Gonadal Steroid Hormone Receptors and Sex Differences in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Hormones and Behavior* 28(4):464-476.
- Handa RJ, Pak TR, Kudwa AE, Lund TD, Hinds L. 2008. An alternate pathway for androgen regulation of brain function: activation of estrogen receptor beta by the metabolite of dihydrotestosterone, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. *Horm Behav* 53(5):741-52.
- Harkany T, Guzman M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K. 2007. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol.Sci.* 28(2):83-92.
- Harkany T, Keimpema E, Barabas K, Mulder J. 2008. Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol* 286(1-2 Suppl 1):S84-90.
- Harrison PJ. 1999. The neuropathology of schizophrenia: A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122(4):593-624.
- Hedner T, Lundborg P. 1980. Serotonergic development in the postnatal rat brain. *J Neural Transm* 49(4):257-79.
- Heim C, Nemeroff CB. 2001. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol.Psychiatry* 49(12):1023-1039.
- Heim C, Newport DJ, Bonsall R, Miller AH, Nemeroff CB. 2001. Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse. *Am J Psychiatry* 158(4):575-81.
- Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB. 2008. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 33(6):693-710.
- Heisler LK, Jobst EE, Sutton GM, Zhou L, Borok E, Thornton-Jones Z, Liu HY, Zigman JM, Balthasar N, Kishi Ty otros. 2006. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron* 51(2):239-49.
- Heng L, Beverley JA, Steiner H, Tseng KY. 2010. Differential developmental trajectories for CB1 cannabinoid receptor expression in limbic/associative and sensorimotor cortical areas. *Synapse*.
- Herman JP. 1993. Regulation of adrenocorticosteroid receptor mRNA expression in the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 13(4):349-72.
- Hill MN, Carrier EJ, McLaughlin RJ, Morrish AC, Meier SE, Hillard CJ, Gorzalka BB. 2008a. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem* 106(6):2322-36.
- Hill MN, Gorzalka BB. 2005. Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav Pharmacol* 16(5-6):333-52.

- Hill MN, Gorzalka BB. 2009. The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8(6):451-8.
- Hill MN, Karacabeyli ES, Gorzalka BB. 2007. Estrogen recruits the endocannabinoid system to modulate emotionality. *Psychoneuroendocrinology* 32(4):350-357.
- Hill MN, McEwen BS. 2010. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(5):791-7.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, Hillard CJ, Gorzalka BB, Viau V. 2010. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20):9406-11.
- Hill SK, Harris MSH, Herbener ES, Pavuluri M, Sweeney JA. 2008b. Neurocognitive Allied Phenotypes for Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Schizophr Bull* 34(4):743-759.
- Hornak JP. 1996. The Basics of MRI. In: Hornak JP, editor. New York: Learning Software, Henrietta, NY.
- Hughes RN. 2004. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* 28(5):497-505.
- Hungund BL, Vinod KY, Kassir SA, Basavarajappa BS, Yalamanchili R, Cooper TB, Mann JJ, Arango V. 2004. Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35 S]GTP[γ]S binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Mol Psychiatry* 9(2):184-190.
- Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. 2002. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* 950(1-2):52-63.
- Husum H, Termeer E, Mathe AA, Bolwig TG, Ellenbroek BA. 2002. Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology* 42(6):798-806.
- Ikemoto S, Panksepp J. 1999. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Brain Res Rev* 31(1):6-41.
- Imamura K. 2003. Proton MR spectroscopy of the brain with a focus on chemical issues. *Magn Reson Med Sci* 2(3):117-32.
- Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ. 2004. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus* 14(5):636-48.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G. 1996. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 118(8):2023-8.

BIBLIOGRAFÍA

- Issa G, Wilson C, Terry Jr AV, Pillai A. 2010. An inverse relationship between cortisol and BDNF levels in schizophrenia: Data from human postmortem and animal studies. *Neurobiol Dis* In Press, Corrected Proof.
- Iuvone L, Geloso MC, Dell'Anna E. 1996. Changes in open field behavior, spatial memory, and hippocampal parvalbumin immunoreactivity following enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. *Exp Neurol* 139(1):25-33.
- Janáky R, Shaw CA, Oja SS, Saransaari P. 2008. Taurine release in developing mouse hippocampus is modulated by glutathione and glutathione derivatives. *Amino Acids* 34(1):75-80.
- Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA. 2004. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 66(2):204-8.
- Joëls M. 2010. Impact of glucocorticoids on brain function: Relevance for mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* In Press, Corrected Proof(2010).
- Joëls M, de Kloet ER. 1994. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* 43(1):1-36.
- Johansen EB, Aase H, Meyer A, Sagvolden T. 2002. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) behaviour explained by dysfunctioning reinforcement and extinction processes. *Behav Brain Res* 130(1-2):37-45.
- Juckel G, Gallinat J, Riedel M, Sokullu S, Schulz C, Moller HJ, Muller N, Hegerl U. 2003. Serotonergic dysfunction in schizophrenia assessed by the loudness dependence measure of primary auditory cortex evoked activity. *Schizophr Res* 64(2-3):115-24.
- Juckel G, Gudlowski Y, Muller D, Ozgurdal S, Brune M, Gallinat J, Frodl T, Witthaus H, Uhl I, Wutzler Ay otros. 2008. Loudness dependence of the auditory evoked N1/P2 component as an indicator of serotonergic dysfunction in patients with schizophrenia--a replication study. *Psychiatry Res* 158(1):79-82.
- Kathmann M, Bauer U, Schlicker E, Gothert M. 1999. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359(6):466-70.
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. 2006. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26(21):5628-37.
- Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ. 1992. Generalized anxiety disorder in women. A population-based twin study. *Arch Gen Psychiatry* 49(4):267-72.
- Kendler KS, Sheth K, Gardner CO, Prescott CA. 2002. Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychol.Med.* 32(7):1187-1194.

- Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA. 2006. Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol* 69(3):691-6.
- Kjær SL, Wegener G, Rosenberg R, Lund SP, Hougaard KS. 2010. Prenatal and adult stress interplay--behavioral implications. *Brain Res* 1320:106-13.
- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H. 2003. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 74(4):486-96.
- Kobayashi K. 2009. Targeting the Hippocampal Mossy Fiber Synapse for the Treatment of Psychiatric Disorders. *Molecular Neurobiology* 39(1):24-36.
- Koch M, Kreutz S, Bottger C, Grabiec U, Ghadban C, Korf HW, Dehghani F. 2010. The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB(1) receptors and modulated by TRPA1 and Ca(v)2.2 channels. *Hippocampus*.
- Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E, Brady DL. 2005. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res* 156(2):251-61.
- Kondziella D, Brenner E, Eyjolfsson EM, Sonnewald U. 2007. How do glial-neuronal interactions fit into current neurotransmitter hypotheses of schizophrenia? *Neurochem.Int.* 50(2):291-301.
- Kumari V, Aasen I, Sharma T. 2004. Sex differences in prepulse inhibition deficits in chronic schizophrenia. *Schizophr Res* 69(2-3):219-35.
- La Cava A, Matarese G. 2004. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 4(5):371-9.
- Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM, Mayer EA, Saper CB. 1999. Chapter 7 Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Progress in Brain Research: Elsevier*. p 81-103.
- Lafenetre P, Chaouloff F, Marsicano G. 2007. The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction. *Pharmacol Res* 56(5):367-81.
- Lam DD, Zhou L, Vegge A, Xiu PY, Christensen BT, Osundiji MA, Yueh CY, Evans ML, Heisler LK. 2009. Distribution and neurochemical characterization of neurons within the nucleus of the solitary tract responsive to serotonin agonist-induced hypophagia. *Behav Brain Res* 196(1):139-43.
- Lange A, Gattin Z, Van Melckebeke H, Wasmer C, Soragni A, van Gunsteren WF, Meier BH. 2009. A combined solid-state NMR and MD characterization of the stability and dynamics of the HET-s(218-289) prion in its amyloid conformation. *Chembiochem* 10(10):1657-65.

BIBLIOGRAFÍA

- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. 2008. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7):2699-704.
- Laviola G, Adriani W, Rea M, Aloe L, Alleva E. 2004. Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. *Psychopharmacology (Berl)* 175(2):196-205.
- Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W. 2003. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 27(1-2):19-31.
- Law AJ, Pei Q, Walker M, Gordon-Andrews H, Weickert CS, Feldon J, Pryce CR, Harrison PJ. 2009. Early parental deprivation in the marmoset monkey produces long-term changes in hippocampal expression of genes involved in synaptic plasticity and implicated in mood disorder. *Neuropsychopharmacology* 34(6):1381-94.
- Lawson A, Ahima RS, Krozowski Z, Harlan RE. 1992. Postnatal development of corticosteroid receptor immunoreactivity in the rat cerebellum and brain stem. *Neuroendocrinology* 55(6):695-707.
- Lee PR, Brady D, Koenig JI. 2003. Corticosterone alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA expression before puberty. *Brain Res Mol Brain Res* 115(1):55-62.
- Lehmann J, Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. 1999. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64(4):705-15.
- Leonard BE, Myint A. 2009. The psychoneuroimmunology of depression. *Hum Psychopharmacol* 24(3):165-75.
- Léonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC, Dupouy JP. 2003. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod* 68(2):390-400.
- Levine S. 1994. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci* 746:275-88; discussion 289-93.
- Levine S. 2000. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* 405(1-3):149-60.
- Levine S. 2005. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30(10):939-46.
- Leweke FM, Giuffrida A, Koethe D, Schreiber D, Nolden BM, Kranaster L, Neatby MA, Schneider M, Gerth CW, Hellmich M, et al. 2007. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: impact of cannabis use. *Schizophr Res* 94(1-3):29-36.

- Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D. 1999. Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport* 10(8):1665-1669.
- Leweke FM, Koethe D. 2008. Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addict Biol* 13(2):264-75.
- Lewis DA, Levitt P. 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu.Rev.Neurosci.* 25:409-432.
- Li Y, Ji YJ, Jiang H, Liu DX, Zhang Q, Fan SJ, Pan F. 2009. Effects of unpredictable chronic stress on behavior and brain-derived neurotrophic factor expression in CA3 subfield and dentate gyrus of the hippocampus in different aged rats. *Chin Med J (Engl)* 122(13):1564-9.
- Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Rakic P. 1991. Synchronized overproduction of neurotransmitter receptors in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(22):10218-21.
- Ligresti A, Morera E, Van Der Stelt M, Monory K, Lutz B, Ortas G, Di Marzo V. 2004. Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem J* 380(Pt 1):265-72.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HYy otros. 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(36):13345-50.
- Liu M, Hurn PD, Roselli CE, Alkayed NJ. 2007. Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 27(1):135-141.
- Löfgren M, Johansson IM, Meyerson B, Lundgren P, Backstrom T. 2006. Progesterone withdrawal effects in the open field test can be predicted by elevated plus maze performance. *Horm Behav* 50(2):208-15.
- López-Gallardo M, Llorente R, Llorente-Berzal A, Marco EM, Prada C, Di Marzo V, Viveros MP. 2008. Neuronal and glial alterations in the cerebellar cortex of maternally deprived rats: gender differences and modulatory effects of two inhibitors of endocannabinoid inactivation. *Dev Neurobiol* 68(12):1429-40.
- Loría F, Petrosino S, Hernangómez M, Mestre L, Spagnolo A, Correa F, Di Marzo V, Docagne F, Guaza C. 2010. An endocannabinoid tone limits excitotoxicity in vitro and in a model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 37(1):166-176.
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A. 2008. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 1148:86-94.
- Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czeh B. 2010. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and

- inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *European Neuropsychopharmacology* 20(1):1-17.
- Luo DD, An SC, Zhang X. 2008. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. *Brain Research Bulletin* 77(1):8-12.
- Llorente-Berzal A, Fuentes S, Galiano H, López-Gallardo M, Armario A, Viveros MP, Nadal R. 2010. Sex Dependent Effects of Maternal Deprivation and Adolescent Cannabinoid Treatment on Adult Rat Behaviour. *Addiction Biology*:In press.
- Maccarrone M, De Felici M, Bari M, Klinger F, Siracusa G, Finazzi-Agro A. 2000. Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem* 267(10):2991-7.
- Mackie K. 2005. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In: Pertwee RG, editor. *Cannabinoids handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer. p 299-323.
- MacLusky NJ, Naftolin F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211(4488):1294-1302.
- Macri S, Laviola G. 2004. Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. *Behav. Brain Res.* 154(1):231-238.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. 1993. Glucocorticoid regulation of cannabinoid receptor messenger RNA levels in the rat caudate-putamen. An in situ hybridization study. *Neurosci Lett* 156(1-2):51-3.
- Maione S, De Petrocellis L, de NV, Moriello AS, Petrosino S, Palazzo E, Rossi FS, Woodward DF, Di MV. 2007. Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *Br.J.Pharmacol.* 150(6):766-781.
- Malcher-Lopes R, Franco A, Tasker JG. 2008. Glucocorticoids shift arachidonic acid metabolism toward endocannabinoid synthesis: A non-genomic anti-inflammatory switch. *European Journal of Pharmacology* 583(2-3):322-339.
- Marco EM, Adriani W, Canese R, Podo F, Viveros MP, Laviola G. 2007. Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: Modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86(2):334-45.
- Marco EM, Adriani W, Llorente R, Laviola G, Viveros MP. 2009. Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 33(4):498-507.

- Marco EM, Macri S, Laviola G. 2010. Critical Age Windows for Neurodevelopmental Psychiatric Disorders: Evidence from Animal Models. *Neurotox Res*:In press.
- Marco EM, Viveros MP. 2009. The critical role of the endocannabinoid system in emotional homeostasis: avoiding excess and deficiencies. *Mini Rev Med Chem* 9(12):1407-15.
- Marchetti B, Morale MC, Testa N, Tirolo C, Caniglia S, Amor S, Dijkstra CD, Barden N. 2001. Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3):259-72.
- Marek G, Merchant K. 2005. Developing therapeutics for schizophrenia and other psychotic disorders. *NeuroRx*. 2(4):579-589.
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. 2005. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95(2):437-45.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt My otros. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302(5642):84-8.
- Marsicano G, Lutz B. 2006. Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest* 29(3 Suppl):27-46.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger Wy otros. 2002. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418(6897):530-4.
- Martínez-Orgado J, Fernández-Frutos B, González R, Romero E, Urigüen L, Romero J, Viveros MP. 2003. Neuroprotection by the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vivo newborn rat model of acute severe asphyxia. *Brain Res Mol Brain Res* 114(2):132-9.
- Massi P, Valenti M, Bolognini D, Parolaro D. 2008. Expression and function of the endocannabinoid system in glial cells. *Curr Pharm Des* 14(23):2289-98.
- Matarese G, Procaccini C, De Rosa V. 2008. The intricate interface between immune and metabolic regulation: a role for leptin in the pathogenesis of multiple sclerosis? *J Leukoc Biol* 84(4):893-9.
- Mateos B, Borcel E, Loriga R, Luesu W, Bini V, Llorente R, Castelli M, Viveros MP. 2010. Adolescent exposure to nicotine and/or the cannabinoid agonist CP 55,940 induces gender-dependent long-lasting memory impairments and changes in brain nicotinic and CB1 cannabinoid receptors. *J Psychopharmacol*. In press.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346(6284):561-4.

BIBLIOGRAFÍA

- Maynard TM, Sikich L, Lieberman JA, LaMantia AS. 2001. Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull* 27(3):457-76.
- McCarthy MM, Amateau SK, Mong JA. 2002. Steroid modulation of astrocytes in the neonatal brain: implications for adult reproductive function. *Biol.Reprod.* 67(3):691-698.
- McCormick CM, Mathews IZ. 2010. Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(5):756-65.
- McCormick CM, Nixon F, Thomas C, Lowie B, Dyck J. 2010. Hippocampal cell proliferation and spatial memory performance after social instability stress in adolescence in female rats. *Behav Brain Res* 208(1):23-9.
- McEwen BS. 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:105-22.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. 1986. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* 66(4):1121-88.
- McGrath JJ, Feron FP, Burne TH, Mackay-Sim A, Eyles DW. 2003. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: a review of recent developments. *Ann Med* 35(2):86-93.
- Meaney MJ. 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24:1161-92.
- Mechoulam R, Shohami E. 2007. Endocannabinoids and Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol* 36(1):68-74.
- Medeiros JM, Silva CM, Sougey EB, Costa JA, Castro CM, Castro RM. 2001. Action of selective serotonin reuptake inhibitor on aggressive behavior in adult rat submitted to the neonatal malnutrition. *Arq Neuropsiquiatr* 59(3-A):499-503.
- Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, Di Carlo C, Nappi C, Di Carlo R. 2004. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology* 145(7):3115-21.
- Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. 2009. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 33(7):1061-1079.
- Meyer U, Yee BK, Feldon J. 2007. The Neurodevelopmental Impact of Prenatal Infections at Different Times of Pregnancy: The Earlier the Worse? *Neuroscientist* 13(3):241-256.
- Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, Vettor R. 2002. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* 10(11):1095-103.
- Moises HW, Schindler L, Leroux M, Kirchner H. 1985. Decreased production of interferon alpha and interferon gamma in leucocyte cultures of schizophrenic patients. *Acta Psychiatr Scand* 72(1):45-50.

- Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. 2002. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 22(22):9742-53.
- Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, Garcia-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arevalo-Martin A, Gomez-Torres O, Molina-Holgado E. 2007. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci* 25(3):629-34.
- Monory K, Massa F, Egertova M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker My otros. 2006. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51(4):455-66.
- Moreira FA, Lutz B. 2008. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* 13(2):196-212.
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Koehl M, Casolini P, Van Reeth O, Maccari S. 2003. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Res* 989(2):246-51.
- Muccioli GG. 2010. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discovery Today In Press, Corrected Proof*.
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YLy otros. 2008. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(25):8760-5.
- Mullen KL, Pritchard J, Ritchie I, Snook LA, Chabowski A, Bonen A, Wright D, Dyck DJ. 2009. Adiponectin resistance precedes the accumulation of skeletal muscle lipids and insulin resistance in high-fat-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(2):R243-51.
- Muller N, Riedel M, Gruber R, Ackenheil M, Schwarz MJ. 2000. The immune system and schizophrenia. An integrative view. *Ann N Y Acad Sci* 917:456-67.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365(6441):61-5.
- Murkinati S, Juttler E, Keinert T, Ridder DA, Muhammad S, Waibler Z, Ledent C, Zimmer A, Kalinke U, Schwaninger M. 2010. Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment. *FASEB J* 24(3):788-98.
- Navarrete M, Araque A. 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57(6):883-93.
- Nemeroff CB, Owens MJ. 2009. The role of serotonin in the pathophysiology of depression: as important as ever. *Clin Chem* 55(8):1578-9.

BIBLIOGRAFÍA

- Nichols NR, Agolley D, Zieba M, Bye N. 2005. Glucocorticoid regulation of glial responses during hippocampal neurodegeneration and regeneration. *Brain Res Rev* 48(2):287-301.
- Nowakowski RS, Hayes NL. 1999. CNS development: an overview. *Dev Psychopathol* 11(3):395-417.
- Nunez JL, Lauschke DM, Juraska JM. 2001. Cell death in the development of the posterior cortex in male and female rats. *J Comp Neurol* 436(1):32-41.
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. 2010. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 34(6):853-66.
- Oja SS, Saransaari P. 2007. Pharmacology of taurine. *Proc West Pharmacol Soc* 50:8-15.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. 2004. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279(7):5298-305.
- Oldehinkel AJ, Bouma EM. 2010. Sensitivity to the depressogenic effect of stress and HPA-axis reactivity in adolescence: A review of gender differences. *Neurosci Biobehav Rev*.
- Oliver P, Picó C, De Matteis R, Cinti S, Palou A. 2002. Perinatal expression of leptin in rat stomach. *Developmental Dynamics* 223(1):148-154.
- Onaivi ES. 2006. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology* 54(4):231-246.
- Onaivi ES, Hari Shanker S. 2009. *Cannabinoid Receptors in Brain: Pharmacogenetics, Neuropharmacology, Neurotoxicology, and Potential Therapeutic Applications. International Review of Neurobiology: Academic Press.* p 335-369.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner Ey otros. 2006. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1074:514-536.
- Ortar G, Ligresti A, De Petrocellis L, Morera E, Di Marzo V. 2003. Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem Pharmacol* 65(9):1473-81.
- Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB. 2001. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci* 115(6):1332-40.
- Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, Julien B, Carrasco C, Resel E, Sagredo O, Benito C, Romero J, Azcoitia Iy otros. 2009. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain* 132(Pt 11):3152-64.
- Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Zhang H, Pavuluri MN. 2010. Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 34(4):645-651.

- Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P. 2009. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacological Research* 60(2):85-92.
- Pardo CA, Eberhart CG. 2007. The neurobiology of autism. *Brain Pathol* 17(4):434-47.
- Paria BC, Song H, Wang X, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Bonner TI, Zimmer A, Dey SK. 2001. Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation. *J Biol Chem* 276(23):20523-8.
- Parmentier-Batteur S, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. 2002. Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22(22):9771-5.
- Partridge JG, Tang KC, Lovinger DM. 2000. Regional and postnatal heterogeneity of activity-dependent long-term changes in synaptic efficacy in the dorsal striatum. *J Neurophysiol* 84(3):1422-9.
- Paul C-M, Magda G, Abel S. 2009. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research* 203(2):151-164.
- Pavlik A, Buresova M. 1984. The neonatal cerebellum: the highest level of glucocorticoid receptors in the brain. *Brain Res* 314(1):13-20.
- Paz-Filho G, Wong ML, Licinio J. 2010. The procognitive effects of leptin in the brain and their clinical implications. *Int J Clin Pract* 64(13):1808-12.
- Paz RD, Tardito S, Atzori M, Tseng KY. 2008. Glutamatergic dysfunction in schizophrenia: From basic neuroscience to clinical psychopharmacology. *European Neuropsychopharmacology* 18(11):773-786.
- Pazos MR, Nunez E, Benito C, Tolon RM, Romero J. 2005. Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 81(2):239-247.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14(3):149-67.
- Perea G, Araque A. 2005. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38(3-4):375-382.
- Pertwee RG. 2006. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S163-71.
- Pertwee RG. 2008. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol* 13(2):147-59.
- Pilatus U, Lais C, Rochmont AdMd, Kratzsch T, Frölich L, Maurer K, Zanella FE, Lanfermann H, Pantel J. 2009. Conversion to dementia in mild cognitive impairment is associated with decline of N-acetylaspartate and creatine as revealed by magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 173(1):1-7.
- Piomelli D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4(11):873-84.

BIBLIOGRAFÍA

- Pope C, Mechoulam R, Parsons L. 2010. Endocannabinoid signaling in neurotoxicity and neuroprotection. *NeuroToxicology* In Press, Corrected Proof.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47(4):379-91.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266(5604):730-2.
- Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. 2008. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry* 63(8):801-8.
- Price DA, Martinez AA, Seillier A, Koek W, Acosta Y, Fernandez E, Strong R, Lutz B, Marsicano G, Roberts JLy otros. 2009. WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 29(11):2177-86.
- Primus RJ, Kellogg CK. 1989. Pubertal-related changes influence the development of environment-related social interaction in the male rat. *Dev Psychobiol* 22(6):633-43.
- Pryce CR, Palme R, Feldon J. 2002. Development of Pituitary-Adrenal Endocrine Function in the Marmoset Monkey: Infant Hypercortisolism Is the Norm. *J Clin Endocrinol Metab* 87(2):691-699.
- Pryce CR, Ruedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, Feldon J. 2005. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev* 29(4-5):649-74.
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ. 2007. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(3):219-33.
- Raman L, Tkac I, Ennis K, Georgieff MK, Gruetter R, Rao R. 2005. In vivo effect of chronic hypoxia on the neurochemical profile of the developing rat hippocampus. *Developmental Brain Research* 156(2):202-209.
- Ramírez BG, Blazquez C, del Pulgar TG, Guzmán M, de Ceballos ML. 2005. Prevention of Alzheimer's Disease Pathology by Cannabinoids: Neuroprotection Mediated by Blockade of Microglial Activation. *J. Neurosci.* 25(8):1904-1913.
- Rees S, Harding R. 2004. Brain development during fetal life: influences of the intra-uterine environment. *Neurosci Lett* 361(1-3):111-4.
- Rhodes ME, Rubin RT. 1999. Functional sex differences ('sexual diergism') of central nervous system cholinergic systems, vasopressin, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mammals: a selective review. *Brain Res Brain Res Rev* 30(2):135-52.
- Rivers JR, Ashton JC. 2010. The development of cannabinoid CBII receptor agonists for the treatment of central neuropathies. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 10(1):47-64.

- Rivier C, Rivier J, Vale W. 1986. Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science* 231(4738):607-609.
- Roa J, Garcia-Galiano D, Castellano JM, Gaytan F, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2010. Metabolic control of puberty onset: new players, new mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 324(1-2):87-94.
- Robertson SA, Leininger GM, Myers MG, Jr. 2008. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol Behav* 94(5):637-42.
- Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA. 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol.Psychiatry* 7(6):609-616.
- Roche M, Finn DP. 2010. Brain CB2 Receptors: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Pharmaceuticals* 3(8):2517-2553.
- Rodríguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnin A, Fernández-Ruiz JJ. 1993. Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4(2):135-8.
- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM. 2001. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 21(3):823-33.
- Romeo RD. 2003. Puberty: a period of both organizational and activational effects of steroid hormones on neurobehavioural development. *J Neuroendocrinol* 15(12):1185-92.
- Romeo RD. 2010. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31(2):232-240.
- Romeo RD, Ali FS, Karatsoreos IN, Bellani R, Chhua N, Vernov M, McEwen BS. 2008. Glucocorticoid receptor mRNA expression in the hippocampal formation of male rats before and after pubertal development in response to acute or repeated stress. *Neuroendocrinology* 87(3):160-7.
- Romeo RD, Mueller A, Sisti HM, Ogawa S, McEwen BS, Brake WG. 2003. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm Behav* 43(5):561-7.
- Romero J, Garcia-Palomero E, Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernandez M, Ramos J, Fernández-Ruiz J. 1997. Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. *Synapse* 26(3):317-323.
- Ross RA. 2009. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci* 30(3):156-63.
- Ross RG, Heinlein S, Tregellas H. 2006. High rates of comorbidity are found in childhood-onset schizophrenia. *Schizophr Res* 88(1-3):90-5.

BIBLIOGRAFÍA

- Rots NY, de Jong J, Workel JO, Levine S, Cools AR, De Kloet ER. 1996. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J Neuroendocrinol* 8(7):501-6.
- Rüedi-Bettschen D, Pedersen EM, Feldon J, Pryce CR. 2005. Early deprivation under specific conditions leads to reduced interest in reward in adulthood in Wistar rats. *Behav Brain Res* 156(2):297-310.
- Ryan D, Drysdale AJ, Lafourcade C, Pertwee RG, Platt B. 2009. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *J Neurosci* 29(7):2053-63.
- Sadri S, Bahrami F, Khazaei M, Hashemi M, Asgari A. 2010. Cannabinoid Receptor Agonist WIN-55,212-2 Protects Differentiated PC12 Cells From Organophosphorus- Induced Apoptosis. *International Journal of Toxicology* 29(2):201-208.
- Sagredo O, Gonzalez S, Aroyo I, Pazos MR, Benito C, Lastres-Becker I, Romero JP, Tolon RM, Mechoulam R, Brouillet Ey otros. 2009. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia* 57(11):1154-67.
- Salamone JD, Correa M. 2002. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res* 137(1-2):3-25.
- Samuelsson AM, Jennische E, Hansson HA, Holmang A. 2006. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(5):R1345-56.
- Sapolsky RM. 2000. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry* 48(8):755-65.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. 1986. The Neuroendocrinology of Stress and Aging: The Glucocorticoid Cascade Hypothesis. *Endocr Rev* 7(3):284-301.
- Sapolsky RM, Packan DR, Vale WW. 1988. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. *Brain Res* 453(1-2):367-71.
- Sari Y. 2004. Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28(6):565-582.
- Sarne Y, Mechoulam R. 2005. Cannabinoids: between neuroprotection and neurotoxicity. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4(6):677-84.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE. 1997. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142(2):278-87.
- Schlicker E, Kathmann M. 2001. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22(11):565-72.

- Schlotz W, Phillips DI. 2009. Fetal origins of mental health: evidence and mechanisms. *Brain Behav Immun* 23(7):905-16.
- Schmid HH, Schmid PC, Berdyshev EV. 2002. Cell signaling by endocannabinoids and their congeners: questions of selectivity and other challenges. *Chem Phys Lipids* 121(1-2):111-34.
- Schmidt M, Enthoven L, van Woezik JH, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. 2004. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J Neuroendocrinol* 16(1):52-7.
- Schmidt MV, Levine S, Alam S, Harbich D, Sterlemann V, Ganea K, Kloet ERd, Holsboer F, Müller MB. 2006. Metabolic Signals Modulate Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activation During Maternal Separation of the Neonatal Mouse. *Journal of Neuroendocrinology* 18(11):865-874.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. 2005. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 1035(1):24-31.
- Schomacher M, Müller H, Sommer C. 2006. Short-term ischemia usually used for ischemic preconditioning down-regulates central cannabinoid receptors in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathologica* 111(1):8-14.
- Schramm NL, Egli RE, Winder DG. 2002. LTP in the mouse nucleus accumbens is developmentally regulated. *Synapse* 45(4):213-9.
- Schulz KM, Molenda-Figueira HA, Sisk CL. 2009. Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Horm Behav* 55(5):597-604.
- Schwarz JM, McCarthy MM. 2008. Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *J Neurochem* 105(5):1561-72.
- Schwarz MJ, Chiang S, Muller N, Ackenheil M. 2001. T-helper-1 and T-helper-2 responses in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun* 15(4):340-70.
- Shanley LJ, Irving AJ, Rae MG, Ashford ML, Harvey J. 2002. Leptin inhibits rat hippocampal neurons via activation of large conductance calcium-activated K⁺ channels. *Nat Neurosci* 5(4):299-300.
- Shearman LP, Rosko KM, Fleischer R, Wang J, Xu S, Tong XS, Rocha BA. 2003. Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. *Behav Pharmacol* 14(8):573-82.
- ShklyaeV S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, Scarpace PJy otros. 2003. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24):14217-22.

BIBLIOGRAFÍA

- Shoemaker JL, Seely KA, Reed RL, Crow JP, Prather PL. 2007. The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *J Neurochem* 101(1):87-98.
- Shoji H, Mizoguchi K. 2010. Acute and repeated stress differentially regulates behavioral, endocrine, neural parameters relevant to emotional and stress response in young and aged rats. *Behavioural Brain Research* 211(2):169-177.
- Shouman B, Fontaine RH, Baud O, Schwendimann L, Keller M, Spedding M, Lelievre V, Gressens P. 2006. Endocannabinoids potently protect the newborn brain against AMPA-kainate receptor-mediated excitotoxic damage. *Br J Pharmacol* 148(4):442-51.
- Simon GM, Cravatt BF. 2008. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J Biol Chem* 283(14):9341-9.
- Smith JT, Waddell BJ. 2003. Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: peripubertal changes and the emergence of sex differences. *J Endocrinol* 176(3):313-9.
- Sodhi MSK, Sanders-Bush E, John S. 2004. Serotonin and brain development. *International Review of Neurobiology: Academic Press*. p 111-174.
- Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32(12):638-47.
- Spatz Widom C, DuMont K, Czaja SJ. 2007. A Prospective Investigation of Major Depressive Disorder and Comorbidity in Abused and Neglected Children Grown Up. *Arch Gen Psychiatry* 64(1):49-56.
- Spear LP. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24(4):417-63.
- Spear LP. 2004. Adolescent brain development and animal models. *Ann N Y Acad Sci* 1021:23-6.
- Stamford JA. 1989. Development and ageing of the rat nigrostriatal dopamine system studied with fast cyclic voltammetry. *J Neurochem* 52(5):1582-9.
- Stancheva S, Grahovska T, Petkov VV. 1985. Ontogenetic development of the monoamine oxidase activity and of the metabolism of biogenic monoamines in rat brain. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 11(1):3-9.
- Starowicz K, Cristino L, Di Marzo V. 2008. TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Curr Pharm Des* 14(1):42-54.
- Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V. 2007. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114(1):13-33.
- Stella N. 2004. Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 48(4):267-277.

- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388(6644):773-778.
- Sterlemann V, Rammes G, Wolf M, Liebl C, Ganea K, Muller MB, Schmidt MV. 2010. Chronic social stress during adolescence induces cognitive impairment in aged mice. *Hippocampus* 20(4):540-9.
- Strous RD, Shoenfeld Y. 2006. Schizophrenia, autoimmunity and immune system dysregulation: a comprehensive model updated and revisited. *J Autoimmun* 27(2):71-80.
- Suárez J, Bermudez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt BF, de Fonseca FR. 2008. Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol* 509(4):400-21.
- Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S. 1993. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57(2):204-212.
- Suchecki D, Tufik S. 1997. Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *Am J Physiol* 273(4 Pt 2):R1332-8.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215(1):89-97.
- Tagliari B, dos Santos T, Cunha A, Lima D, Delwing D, Sitta A, Vargas C, Dalmaz C, Wyse A. 2010. Chronic variable stress induces oxidative stress and decreases butyrylcholinesterase activity in blood of rats. *Journal of Neural Transmission* 117(9):1067-1076.
- Tanasescu R, Constantinescu CS. 2010. Cannabinoids and the immune system: An overview. *Immunobiology* 215(8):588-597.
- Tang BL. 2008. Leptin as a neuroprotective agent. *Biochem Biophys Res Commun* 368(2):181-5.
- Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ. 1998. Postnatal development of dopamine D4-like receptors in rat forebrain regions: comparison with D2-like receptors. *Brain Res Dev Brain Res* 110(2):227-33.
- Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ. 1999. Postnatal development of dopamine D1-like receptors in rat cortical and striatolimbic brain regions: An autoradiographic study. *Dev Neurosci* 21(1):43-9.
- Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC, Jr. 1995. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Brain Res Dev Brain Res* 89(2):167-72.

BIBLIOGRAFÍA

- Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM. 2003. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci Biobehav Rev* 27(1-2):33-44.
- Teicher MH, Tomoda A, Andersen SL. 2006. Neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment: are results from human and animal studies comparable? *Ann N Y Acad Sci* 1071:313-23.
- Telegdy G, Vermes I. 1975. Effect of adrenocortical hormones on activity of the serotonergic system in limbic structures in rats. *Neuroendocrinology* 18(1):16-26.
- Tena-Sempere M, Barreiro ML. 2002. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molecular and Cellular Endocrinology* 188(1-2):9-13.
- Ter Horst GJ, Wichmann R, Gerrits M, Westenbroek C, Lin Y. 2009. Sex differences in stress responses: focus on ovarian hormones. *Physiol Behav* 97(2):239-49.
- Teunis MA, Heijnen CJ, Sluyter F, Bakker JM, Van Dam AM, Hof M, Cools AR, Kavelaars A. 2002. Maternal deprivation of rat pups increases clinical symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis at adult age. *J Neuroimmunol* 133(1-2):30-8.
- Thome J, Pesold B, Baader M, Hu M, Gewirtz JC, Duman RS, Henn FA. 2001. Stress differentially regulates synaptophysin and synaptotagmin expression in hippocampus. *Biological Psychiatry* 50(10):809-812.
- Tsang TM, Griffin JL, Haselden J, Fish C, Holmes E. 2005. Metabolic characterization of distinct neuroanatomical regions in rats by magic angle spinning 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 53(5):1018-24.
- Tseng KY, Chambers RA, Lipska BK. 2009. The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research* 204(2):295-305.
- Tsoory M, Cohen H, Richter-Levin G. 2007. Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol* 17(4):245-56.
- Tyrka AR, Wier L, Price LH, Ross N, Anderson GM, Wilkinson CW, Carpenter LL. 2008. Childhood Parental Loss and Adult Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function. *Biological Psychiatry* 63(12):1147-1154.
- Tzika AA, Cheng LL, Goumnerova L, Madsen JR, Zurakowski D, Astrakas LG, Zarifi MK, Scott RM, Anthony DC, Gonzalez R Gy otros. 2002. Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in vivo and ex vivo magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg* 96(6):1023-31.
- Uehara T, Tanii Y, Sumiyoshi T, Kurachi M. 2000. Neonatal lesions of the left entorhinal cortex affect dopamine metabolism in the rat brain. *Brain Res* 860(1-2):77-86.

- Vallee M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. 1997. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 17(7):2626-36.
- van der Stelt M, Di Marzo V. 2003. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* 480(1-3):133-50.
- van der Stelt M, Di Marzo V. 2005. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular.Med.* 7(1-2):37-50.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. 1997. Persistent, but Paradoxical, Effects on HPA Regulation of Infants Maternally Deprived at Different Ages. *Stress* 1(4):249-262.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. 1999. Persistent Effects of Maternal Deprivation on HPA Regulation Can Be Reversed By Feeding and Stroking, But Not By Dexamethasone. *Journal of Neuroendocrinology* 11(8):581-588.
- van Oers HJJ, de Kloet ER, Levine S. 1998. Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Developmental Brain Research* 111(2):245-252.
- van Riel E, Meijer OC, Steenbergen PJ, Joels M. 2003. Chronic unpredictable stress causes attenuation of serotonin responses in cornu ammonis 1 pyramidal neurons. *Neuroscience* 120(3):649-58.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JSy otros. 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310(5746):329-32.
- Vanderschuren LJ, Niesink RJ, Van Ree JM. 1997. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 21(3):309-26.
- Vázquez DM, López JF, Van Hoers H, Watson SJ, Levine S. 2000. Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. *Brain Res* 855(1):76-82.
- Vitalis T, Laine J, Simon A, Roland A, Leterrier C, Lenkei Z. 2008. The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro. *Eur J Neurosci* 28(9):1705-18.
- Viveros M-P, Díaz F, Mateos B, Rodríguez N, Chowen JA. 2010a. Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm Behav* 57(4-5):405-414.
- Viveros M-P, Llorente R, Díaz F, Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ, Rodríguez de Fonseca F, Argente J, Chowen JA. 2010b. Maternal deprivation has sexually dimorphic long-term effects on hypothalamic cell-turnover, body weight and circulating hormone levels. *Hormones and Behavior* 58(5):808-819.

BIBLIOGRAFÍA

- Viveros MP, Llorente R, Lopez-Gallardo M, Suarez J, Bermudez-Silva F, De la Fuente M, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Segura LM. 2009. Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S217-26.
- Viveros MP, Llorente R, Moreno E, Marco EM. 2005a. Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behav.Pharmacol.* 16(5-6):353-362.
- Viveros MP, Marco EM, File SE. 2005b. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 81(2):331-42.
- Viveros MP, Marco EM, File SE. 2006. Nicotine and cannabinoids: parallels, contrasts and interactions. *Neurosci Biobehav Rev* 30(8):1161-81.
- Viveros MP, Marco EM, Llorente R, Lopez-Gallardo M. 2007. Endocannabinoid system and synaptic plasticity: implications for emotional responses. *Neural Plast.*:52908.
- Waleh NS, Cravatt BF, Apte-Deshpande A, Terao A, Kilduff TS. 2002. Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene. *Gene* 291(1-2):203-10.
- Walker EF, Diforio D. 1997. Schizophrenia: a neural diathesis-stress model. *Psychol Rev* 104(4):667-85.
- Wallmichrath I, Szabo B. 2002. Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience* 113(3):671-82.
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A. 2008. The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci* 38(1):89-97.
- Weinberger DR. 1987. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch.Gen.Psychiatry* 44(7):660-669.
- Weinberger DR. 1999. Cell biology of the hippocampal formation in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 45(4):395-402.
- Weinstock M. 2002. Can the behaviour abnormalities induced by gestational stress in rats be prevented or reversed? *Stress* 5(3):167-76.
- Weinstock M. 2005. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity* 19(4):296-308.
- Weinstock M. 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 32(6):1073-86.
- Weiss IC, Feldon J. 2001. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 156(2-3):305-26.
- Whitaker-Azmitia PM. 2001. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin* 56(5):479-485.
- Whitaker-Azmitia PM, Christian PM, Barry LJ. 2010. Serotonin and Development. *Handbook of Behavioral Neuroscience: Elsevier.* p 309-323.

- Workel JO, Oitzl MS, Fluttert M, Lesscher H, Karssen A, de Kloet ER. 2001. Differential and age-dependent effects of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of brown norway rats from youth to senescence. *J Neuroendocrinol* 13(7):569-80.
- Wright LD, Hebert KE, Perrot-Sinal TS. 2008. Periadolescent stress exposure exerts long-term effects on adult stress responding and expression of prefrontal dopamine receptors in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 33(2):130-42.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M. 2006. Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 26(18):4740-51.
- You M, Considine RV, Leone TC, Kelly DP, Crabb DW. 2005. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology* 42(3):568-77.
- Zani A, Braida D, Capurro V, Sala M. 2007. Delta(9)-Tetrahydrocannabinol (THC) and AM 404 protect against cerebral ischaemia in gerbils through a mechanism involving cannabinoid and opioid receptors. *Br J Pharmacol* 152(8):1301-11.
- Zavitsanou K, Garrick T, Huang XF. 2004. Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(2):355-60.
- Zhang LX, Levine S, Dent G, Zhan Y, Xing G, Okimoto D, Kathleen GM, Post RM, Smith MA. 2002a. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 133(1):1-11.
- Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RK, Ganea D, Tuma RF. 2008. Modulation of the balance between cannabinoid CB1 and CB2 receptor activation during cerebral ischemic/reperfusion injury. *Neuroscience* 152(3):753-760.
- Zhang Y, Wilsey JT, Frase CD, Matheny MM, Bender BS, Zolotukhin S, Scarpace PJ. 2002b. Peripheral but not central leptin prevents the immunosuppression associated with hypoleptinemia in rats. *J Endocrinol* 174(3):455-61.
- Zhu MY, Wang WP, Huang J, Regunathan S. 2007. Chronic treatment with glucocorticoids alters rat hippocampal and prefrontal cortical morphology in parallel with endogenous agmatine and arginine decarboxylase levels. *J Neurochem* 103(5):1811-20.
- Zimmerberg B, Shartrand AM. 1992. Temperature-dependent effects of maternal separation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat. *Dev Psychobiol* 25(3):213-26.
- Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Carvalho LA, Pariante CM. 2010. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* In Press, Corrected Proof.

