



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



DEPARTAMENTO DE FARMACIA

TÍTULO:

LA AUSENCIA DE CUIDADOS MATERNOS AFECTA LA
CITOARQUITECTURA DE LAS NEURONAS DEL HIPOCAMPO
VENTRAL Y CORTEZA MEDIA PREFRONTAL AL DIA
POSNATAL 14 EN LA RATA

TESIS:

PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p. Q. F. B. ZULEYMA BASILIO LINO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ANGEL I. MELO SALAZAR

ASESOR INTERNO:

Dr. ISRAEL CAMACHO ABREGO

NOVIEMBRE, 2016.



EL SIGUIENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION EN REPRODUCCIÓN ANIMAL (CIRA) DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA-CINVESTAV EN COLABORACION CON EL LABORATORIO DE NEUROPSIQUIATRÍA DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA DE LA BENÉMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA, BAJO LA DIRECCION DE DR. ANGEL ISMAEL MELO SALAZAR Y DR. ISRAEL CAMACHO ABREGO.

PARA REALIZARLO, SE CONTÓ CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) DE GRUPO DE INVESTIGACIÓN G3 # 181334.



AGRADECIMIENTOS

A todos y cada uno de los que colaboraron para la realización de este proyecto.
En especial para el Dr. Israel Camacho y el Dr. Ángel Melo.

También a la comisión revisora Dr. Alfonso Díaz, M. C. Aldrin Martínez y L. F. Juan Carlos Bastida.

Al Dr. Gonzalo Flores por brindar las facilidades de su laboratorio.

Agradezco a las personas que me enseñaron, apoyaron y ayudaron en el proyecto, por parte del laboratorio de neuropsiquiatría a Luis, Nancy y Evelyn y del CIRA a Mayra y Carlos.

Además a todos mis amigos, familiares, compañeros, etc. Que han sido mi apoyo emocional para no desistir.

Lo único que me queda decir es... GRACIAS.

DEDICATORIA

A mis padres: Mercedes Lino y Mateo Basilio.

"Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental."

Santiago Ramón y Cajal.

ÍNDICE

CONTENIDO	
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE GRÁFICAS	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCION	10
2. ANTECEDENTES	10
3. MARCO TEÓRICO	13
3.1 PERIODO POSNATAL	13
3.2 CONDUCTA MATERNA	14
3.3 MODELOS ANIMALES	16
3.4 CUIDADOS MATERNOS DEFICIENTES	17
3.5 SEPARACION MATERNA	18
3.6 EJE HHA	19
3.7 SISTEMA LIMBICO	22
3.7.1 HIPOCAMPO VENTRAL	23
3.7.2 CORTEZA MEDIA PREFRONTAL	25
3.8 NEUROPLASTICIDAD	27
3.9 NEUROGENESIS	30
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
5. JUSTIFICACIÓN	33
6. HIPÓTESIS	33
7. OBJETIVO GENERAL	34
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	34
8. METODOLOGÍA	35
9. RESULTADOS	46
9.1 CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA III	46
9.2 CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA V	49
9.3 HIPOCAMPO VENTRAL	51

10. DISCUSION DE RESULTADOS	54
11. CONCLUSION	58
12. PERSPECTIVAS	58
13. BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción madre-hijos.	15
Figura 2. Neurona piramidal de la corteza media prefrontal capa III.	26
Figura 3. Etapas fundamentales de la sinapsis.	29
Figura 4. La hipótesis neurogénica de la amnesia infantil.	32
Figura 5. Sistema de crianza artificial.....	36
Figura 6. Efectos de la separación materna total y crianza artificial.....	37
Figura 7. Localización de la corteza media prefrontal.	43
Figura 8. Localización del hipocampo.	44
Figura 9. Localización de hipocampo ventral.	44
Figura 10. Plantilla de discos concéntricos para el análisis de Sholl.....	45

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Arborización dendrítica CmPF c-III.	46
Gráfica 2. Número de orden CmPF c-III.	47
Gráfica 3. Longitud dendrítica CmPF c-III.	48
Gráfica 4. Densidad de las espinas dendríticas CmPF c-III.	48
Gráfica 5. Arborización dendrítica CmPF c-V.	49
Gráfica 6. Numero de orden CmPF c-V.	50
Gráfica 7. Longitud dendrítica CmPF c-V.	50
Gráfica 8. Densidad de espinas dendríticas CmPF c-V.	51
Gráfica 9. Arborización dendrítica Hv.	52
Gráfica 10. Número de orden Hv.....	52
Gráfica 11. Longitud dendrítica Hv.	53
Gráfica 12. Densidad de espinas dendríticas Hv.....	53

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adenocorticotropa
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CA 1	Cuerno de Ammon 1
CA 2	Cuerno de Ammon 2
CA 3	Cuerno de Ammon 3
CA	Crianza artificial
CA-T	Crianza artificial táctil
CM	Criado por su madre
CmPF	Corteza media prefrontal
CPF	Corteza prefrontal
CORT	Corticoesteroides
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DPN	Día posnatal
GC	Glucocorticoides
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
LAM	Laberinto acuático de Morris
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NT	Neurotrofinas
NAcc	Núcleo accumbens
PLP	Potencial a largo plazo
PPN	Periodo posnatal
PVN	Parvocelulares del núcleo paraventricular
SMP	Separación materna parcial
SMT	Separación materna total

RESUMEN

La interacción madre-hijo es importante para el desarrollo del sistema nervioso central. La ausencia de cuidados maternos en el periodo posnatal puede causar alteraciones en la morfología dendrítica en modelos animales de laboratorio (ratas, primates no humanos) adultos, pero este hecho no ha sido estudiado en ratas al 14 DPN. El modelo más utilizado es el de Separación Maternal Parcial en la rata (SMP), el cual consiste en separar a las crías de su madre durante varias horas al día (3,6,24) durante el período hiporesponsivo al estrés (2-14 días postnatales; DPN). Se ha encontrado en ratas adultas que sufrieron SMP una disminución en la arborización dendrítica (menor longitud de dendritas, menor espinas dendríticas, etc) en la corteza prefrontal, hipocampo ventral, núcleo Acumbens, entre otros. Sin embargo, el modelo de SMP causa estrés crónico temprano, lo cual hace que la interpretación de los resultados sea ambigua. Por otro lado, se desconoce en qué etapa del desarrollo temprano ocurren los cambios a nivel dendrítico en las áreas afectadas, por ello se planteó el siguiente objetivo. **Objetivo.** Explorar la participación de la experiencia sensorial y social, a través de la separación maternal total y crianza artificial, durante el día posnatal 14 (día en que termina el período hiporesponsivo al estrés) sobre la modificación de la citoarquitectura de las neuronas del hipocampo y corteza media prefrontal. **Método.** Crías ratas (n=24) de 4 DPN, fueron sometidas al sistema de separación materna y crianza artificial hasta el DPN 14. Se formaron los siguientes grupos de trabajo: 1) Aislado (CA; n=8), 2) Aislado estimulación corporal (CA-Corporal; n=8) y 3) Criado por su madre (CM; n=8). Al 14 DPN se sacrificaron y se continuó con el procedimiento de la técnica de Golgi-Cox y análisis de Sholl. Se determinó longitud dendrítica total, arborización dendrítica, número máximo de orden y densidad de espinas dendríticas. **Resultados.** Los datos de Hipocampo ventral, corteza media prefrontal capa III y V, no muestran diferencias significativas entre los grupos. **Conclusión.** La separación materna total y crianza artificial al 14 DPN no modifica la citoarquitectura de las neuronas en Hipocampo ventral y Corteza media prefrontal capa III y V.

1. INTRODUCCION

Los primeros contactos del niño o niña con sus padres son fundamentales para establecer un vínculo, así como interactuar con el mundo, lo que lo favorece. El recién nacido busca la interacción con la madre. Él busca y espera una respuesta a sus acciones. Si el niño o niña no tiene respuesta, se inhibe y deja de comunicarse. (Bowlby, 1954).

El entorno postnatal es objeto de gran cantidad de estudios debido a la amplia y creciente literatura que indica que las experiencias durante la vida temprana pueden ser la causa de gran diversidad de alteraciones. En los roedores, como en la mayoría de los mamíferos, el hábitat postnatal de las crías está determinado principalmente por la madre (Colorado R., 2006).

Los estudios de privación materna iniciados por Harlow y sus colegas en la década de 1950 fueron motivados por los tipos de "extraños" y devastadores de comportamientos observados entre los huérfanos institucionalizados de Europa occidental y Gran Bretaña después de la Segunda Guerra Mundial (Bowlby, 1951).

Diversos estudios clínicos y preclínicos recientes han mostrado que la negligencia o desatención materna puede interferir seriamente con el desarrollo socioemocional del niño, tornándolo vulnerable a sufrir trastornos psiquiátricos futuros (Poehlmann y cols., 2011). Se han realizado muchos estudios sobre los efectos de la etapa infantil que repercuten en la edad adulta, pero aún se tienen muchas dudas por resolver.

2. ANTECEDENTES

John Bowlby realizó en 1944 un estudio sobre delincuentes juveniles y descubrió que un rasgo común en sus historias era una carencia de atención materna y de afecto. En 1950 la Organización Mundial de la Salud (OMS) le encomendó que redactara un informe sobre la salud mental de los niños, que apareció en 1951 bajo el título ***cuidados maternos y salud mental***. En él, tras revisar los estudios existentes, llegó a la siguiente conclusión: "Consideramos esencial para la salud mental que el bebé y el niño pequeño experimenten una relación cálida, íntima y

continuada con la madre (o sustituto materno permanente) en la que ambos hallen satisfacción y goce”.

Uno de los grupos de investigación más productivos sobre los mecanismos epigenéticos en el período postnatal es el encabezado por Michael Meaney. Desde el año 1988, dirige en la Universidad de McGill un grupo que trabaja, entre otras líneas, en el mecanismo por el cual la conducta materna, en ratas, afecta la respuesta al estrés de sus crías. Este estudio mostró que las crías de ratas muy cuidadas, presentaban un elevado nivel del receptor de glucocorticoides en hipotalámico y lóbulo frontal y ello terminaba traducándose en un menor nivel de factor liberador de corticotrofina en el hipotálamo, es decir, una menor respuesta endocrina al estrés (Kappeler y Meaney, 2010).

El profesor Ted Schaeffer fue uno de los primeros científicos en proponer que la experiencia adquirida durante la infancia modificaba la respuesta al estrés en la etapa adulta. Durante este periodo las crías tienen una intensa interacción con su madre, a través de la conducta que ella despliega hacia ellas. En 1974, Fleming y Rosenblatt propusieron que la aversión/atracción hacia las crías dependía del sistema olfatorio, principal y accesorio. Ellos mostraron que la anosmia total causada por la remoción de los bulbos olfatorios o periféricos por la aplicación de sulfato de zinc al epitelio olfatorio, reducía en las madres la percepción de olores y disminuía el tiempo dedicado al lamido de las crías. Además, se ha propuesto la existencia de un circuito neural que regula la conducta maternal (“circuito maternal”), en el que se incluye al sistema olfatorio principal y accesorio, sus proyecciones hacia el sistema límbico, como la amígdala, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal, el núcleo “cama” de la estría terminal, el septum y el área preóptica media. Para evaluar la participación de los factores (señales o estímulos) que participan durante el periodo posnatal sobre el desarrollo de las crías se ha utilizado desde hace algunos años el paradigma experimental de “separación maternal” diseñado por el Dr. Ted Schaeffer. Así, las crías separadas del nido y criadas dentro de un sistema de crianza artificial han sido estudiadas, los resultados sugieren la participación de factores epigenéticos provenientes de la madre (hormonas, estímulos sensoriales) y de los compañeros de camada

(sensoriales y sociales) durante el periodo posnatal en el desarrollo de los sistemas neurales que regulan la expresión de la conducta maternal, la agresión maternal, el aprendizaje social, la atención y la respuesta al estrés (Melo y Fleming, 2006). Se ha mostrado que ratas que fueron separadas de su madre y de sus hermanos de camada, y criadas artificialmente, muestran mayor agresión ofensiva (no gestantes) y maternal (Melo y cols., 2006). Esta interacción materna influye en el desarrollo del comportamiento en la descendencia. Curiosamente, la cantidad de aseo materna proporcionada a los cachorros parece que tiene un papel importante en el desarrollo de dimorfismo sexual; cachorros machos reciben más estimulación maternal de la región anogenital que las mujeres (Moore y Morelli, 1979). Esta diferencia de sexo depende de la exposición hormonal gonadal de la cría. Se sabe que es la presencia de una hormona prepucial la que genera que la madre emplee un mayor tiempo en la ejecución de lamido perineal ya que al extirpar la glándula prepucial o si a las hembras se les unta extracto de glándula masculina en la región perineal, este dimorfismo sexual desaparece (Moore, 1982). Como se podrá deducir tanto machos como hembras poseen esta glándula (en ambos conectada al tracto uretral) y en ambos existe la presencia de Dodecil propionato, una hormona que es efectiva en inducir el aseo de la región perineal de las crías. Se cree que los machos contiene mayor cantidad de esta hormona y que la testosterona y/o metabolito regula esta diferencia en la cantidad de estímulos perineales que la madre provee a las crías de acuerdo a su sexo (Moore, 1988).

Ahora se sabe según Champagne y cols. (2007), que el cuidado materno (por ejemplo, conducta materna de lamido) en rata durante la infancia, influye a largo plazo en las respuestas ante el estrés y en procesos sociales, emocionales y cognitivos de las crías. Se encontró que el árbol dendrítico es más corto y hay menor densidad de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo CA1 de las crías adultas con bajo cuidado materno con respecto a las que sí tienen cuidado materno adecuado. Estos resultados sugieren que los cuidados maternos pueden alterar, a largo plazo, el funcionamiento cognitivo óptimo. En un trabajo de tesis de pregrado encontraron cambios morfológicos en neuronas piramidales de la capa

tres de la corteza media prefrontal y de la región CA1 del hipocampo debidos a la privación materna parcial del DPN 1 al DNP14, el cual utiliza dos grupos de crías de rata, uno denominado privación materna (PM) y otro control (C) donde se les separa de la madre desde DP1 hasta DP5 por una hora y de DP6 a DP14 durante dos horas diarias (Sánchez, 2008), el cual sugiere que este protocolo de PM utilizado causa una interferencia suficientemente grande entre la madre y las crías como para provocar alteraciones en el neurodesarrollo normal de ellas.

Un estudio piloto en ratas juveniles que fueron criadas en un modelo animal de privación materna a través de la crianza artificial (CA). Algunas de las investigaciones se encuentran los efectos del aislamiento social sobre la morfología neuronal de corteza prefrontal, núcleo accumbens e hipocampo en etapas críticas del desarrollo en la rata Sprague Dawley. Se detectó que el daño provocado por el aislamiento social es más severo si es aplicado en etapas tempranas del desarrollo, por la tendencia de un mayor daño en las ratas aisladas en etapa de juego (Martínez, 2009). El efecto de la crianza artificial al DP 7 sobre la morfología del NAcc y ABL en la rata, en el NAcc, el aislamiento no causó cambios significativos en la arborización dendrítica, en la ABL, el aislamiento incrementó la arborización, el número de orden y longitud dendrítica en comparación con el grupo control, la estimulación táctil previno algunos efectos del aislamiento (Sánchez, 2016). En un estudio de la crianza materna favorece el desarrollo neuronal en la rata al día 21 posnatal en Hipocampo dorsal y ventral concluye que la estimulación táctil corporal aplicada en la crianza artificial en ratas macho sometidas al aislamiento socio-materno durante los días postnatales 4-21 previene el efecto del aislamiento (Arellano, 2016).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 PERIODO POSNATAL

Numerosos estudios demuestran que distintos estímulos durante las primeras semanas de vida influyen en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) causando persistentes alteraciones en una amplia variedad de procesos

conductuales y fisiológicos en la etapa adulta (Flores y cols., 1996; Hsu y cols., 2003; Colorado y cols. 2006)

La madre y la cría dependen de las experiencias somatosensoriales de la madre en su relación con la cría, experiencias que estimulan la producción de oxitocina y opioides endógenos, que facilitan los fenómenos de plasticidad neuronal (Forero, 2005).

Durante los primeros 10-14 días de vida, las crías de los roedores (ratas, ratones) se mantienen juntas a través de movimientos de amontonamiento para preservar la temperatura corporal (termorregulación conductual), debido a que ellas aun no pueden regular su temperatura corporal. Es así como se proporciona calor y el aislamiento de todos sus miembros activos (Alberts, 1978).

La respuesta a estresores en la adultez depende de la predisposición genética y de la historia de vida particularmente en etapas tempranas. Esto determina si un organismo será resistente a estresores. Individuos vulnerables pueden tener cambios en la expresión de receptores de corticosteroides, atrofia de las células hipocampales, neurogénesis reducida, alteración en las vías monoaminérgicas, menor plasticidad sináptica y daño en la habilidad de aprender, llevando a un estado patológico (De Kloet y cols. 2005).

3.2 CONDUCTA MATERNA

La conducta materna (CM) consiste en la expresión de una serie de patrones motores y eventos somato-sensoriales por parte de la madre durante la gestación, el parto y la lactancia. Esto con la finalidad de proveer de nutrientes, protección, calor y los estímulos sensoriales (estímulos táctiles, auditivos y odoríferos), hormonales (a través de la leche materna) y sociales (interacción madre-hijos y entre los hermanos) necesarios para el crecimiento, desarrollo y maduración de la progenie. Incluso, en especies que viven en grupos sociales estables, la madre favorece el establecimiento de las posiciones sociales de la progenie dentro de la comunidad. De manera recíproca, la progenie provee a la madre de los estímulos sensoriales; táctiles, succión, odoríferos, visuales y sociales indispensables para el establecimiento y mantenimiento de la CM post-parto (Fig. 1; Melo y cols., 2013).

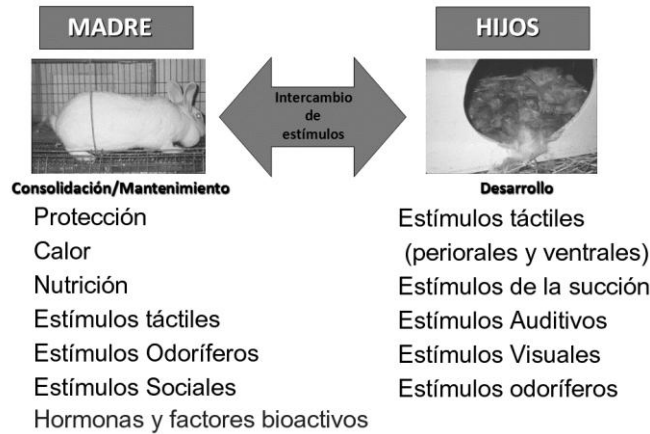


Figura 1. Interacción madre-hijos.

Durante la interacción madre-hijos existe un intercambio de señales (estímulos) entre la madre y la progenie. Como se puede observar, la madre provee a las crías (progenie o hijos) de nutrientes y de estímulos sensoriales, hormonales y sociales necesarios para su crecimiento y desarrollo. La otra parte de la diada; las crías, corresponden con la emisión de señales sensoriales y sociales. De tal manera que este intercambio se vuelve en un ciclo (Tomado de Melo y cols., 2013).

El amamantamiento es sin duda, el componente conductual más importante de la CM de todos los mamíferos, pues está involucrada directamente en proveer de alimento a la progenie. Esta conducta se inicia desde el momento mismo del parto y se repite (c/2-3 hrs en *roedores*, c/24 hrs en *conejos*; c/3-5 hrs en *humanos*) a través de toda la lactancia (22-24 *roedores*; 23-24 *conejos*; 1-12 meses *humanos*). No obstante, la frecuencia de amamantamiento disminuye después de la segunda mitad de la lactancia, cuando las crías inician la ingesta de alimento sólido. Durante el amamantamiento, la madre adopta la postura de amamantamiento adecuada y específica para cada especie, para facilitar que el infante alcance la glándula mamaria y succione. En la *rata*, la madre inicialmente adopta la postura de amamantamiento (PA; ventroflexión) de baja intensidad, mientras les lame el cuerpo y la región anogenital para estimular la micción, la defecación y proveerlos de estímulos sensoriales, y las crías despliegan la conducta de búsqueda del

pezón en el vientre de la madre, esta conducta intensifica la PA de alta intensidad y se inicia el amamantamiento. (Swanson y cols. 1979; Anderson y Wagner, 1995) Moore y colaboradores (1982) reportaron que las madres lamen más la región anogenital de las crías macho, que la de las crías hembra (Moore, 1982). Lo anterior hizo que ellos propusieran que además de las hormonas sexuales, los estímulos táctiles anogenitales participan en la diferenciación sexual cerebral, reproductiva y conductual, como la conducta de juego-lucha.

En condiciones normales, después de las dos primeras semanas de nacimiento la rata madre deja el nido materno regularmente, separándose de la camada por periodos de diez minutos a una hora, dependiendo de la edad de las crías sin que haya daños aparentes en su desarrollo. (Kalinichev, Plotsky 2002).

Hallazgos en humanos señalan que los lazos afectivos entre madres e hijos, se presentan de manera similar en la generación posterior (Francis y cols. 1999).

Se han reportado estudios electrofisiológicos, donde la manipulación ambiental postnatal aumentó la sensibilidad al receptor de corticosterona, aumentando el efecto inhibitorio de la corticosterona en la excitabilidad y plasticidad de CA1 lo cual facilita el aprendizaje en el animal adulto (Zou y cols. 2001). Entre los hallazgos de las investigaciones moleculares se ha propuesto que los efectos de programación que son ejercidos por la conducta materna están asociados con un único gen, el gen de RG. Una progenie con cuidados maternos debidos tiene una alta expresión hipocampal de RG debido a la desmetilación de un residuo de cisteína en la región de unión 5' NGF1A en el promotor del exón 17 (Weaver, 2004).

3.3 MODELOS ANIMALES

Para estudiar el papel de la experiencia temprana en el desarrollo de los organismos, hay paradigmas experimentales que manipulan la cantidad de estímulos sensoriales o las señales sociales que reciben las crías durante el período pre-destete posnatal. Por ejemplo, en condiciones de laboratorio, existen efectos "positivos" en el desarrollo de la descendencia cuando se aumenta la estimulación temprana, por: 1) la reducción del número de cachorros en la camada

(Leigh y Hofer, 1973), ó 2) separar las crías de la madre por un breve período de tiempo (15 min; manipulación que promueve el aumento del lamiendo materna cuando los cachorros son devueltos a la madre, (Lee & Williams, 1974). Por otro lado, es posible inducir efectos "negativos" en la descendencia por la disminución de la cantidad de estimulación proporcionada a las crías, por 1) aumentar el número de crías dentro de la camada (Fleming y cols., 1979), 2) inducir anosmia en la madre (Fleming y Rosenblatt, 1974; Fleming y cols., 1979;. Moore, 1984), 3) la separación de las crías de la madre para una porción de cada día (separación materna parcial), o 4) separar las crías de la madre y el nido totalmente, y ponerlo en un sistema de crianza artificial (Hall, 1975; Gonzalez y cols., 2001; Lomanowska y Melo, 2016). Este último paradigma que actualmente se está utilizando para evaluar la participación de la experiencia temprana es el de la separación maternal total y crianza artificial. Priva a las crías de los estímulos sensoriales (táctiles y odoríferos) y sociales provenientes de la madre y de los compañeros de camada sin causar estrés crónico ni desnutrición (Lomanowska y cols., 2011).

3.4 CUIDADOS MATERNOS DEFICIENTES

Se han hecho estudios con madres de altos y bajos cuidados maternos basados en las observaciones conductuales (lamido /acicalado y posición arqueada de amamantamiento, LG-ABN), durante 19 días por un periodo de 6-8 horas (Liu y cols. 1997). La progenie de madres con alto LG-ABN muestra reducido nivel de ACTH y de la respuesta de corticosteroides ante estrés. Las crías de madres con alto cuidado mejoraron el desarrollo cognitivo en pruebas de memoria espacial y reducida ansiedad en la adultez (Liu y cols. 1997). La progenie adulta de madres con bajo cuidado, manifiesta un aumento significativo en la respuesta noradrenérgica al estrés a nivel del PVNh, - aumento- de receptores de **corticotropina (CRH)** a nivel de locus ceruleus y un incremento en el ARNm de CRH del núcleo central de la amígdala, además de un decremento de receptores a **benzodiacepina** en el núcleo basolateral y central de la amígdala y en locus coeruleus (Caldji y cols. 1998).

3.5 SEPARACION MATERNA

Las consecuencias de la separación materna dependen del momento en que se produce, así como de la duración de la misma (Nishi, 2013).

Los adecuados cuidados suministrados por la madre a sus crías en las primeras semanas después del parto incrementan la densidad de las sinapsis en el hipotálamo, desarrollan la función hipocámpica y mantienen en buen funcionamiento el mecanismo de producción de los glucocorticoides. Cuando se interrumpe el cuidado materno de modo natural, o en el laboratorio a través del uso de diversos modelos animales, el efecto positivo inducido maternalmente se afecta negativamente. La separación materna neonatal en ratas ha sido ampliamente utilizada como un modelo de desarrollo neurológico para imitar los trastornos relacionados con el estado de ánimo. Los cuales producen una amplia gama de anomalías de comportamiento que persisten en la edad adulta. Sin embargo el momento en el que se aplica la separación materna es determinante, ya que si es aplicada antes del periodo de hiporesponsividad del eje HHA al estrés (DPN 1 AL DPN 3) reduce significativamente la densidad de espinas dendríticas a nivel de las neuronas piramidales de la tercera capa de la CmPF, mientras que durante el periodo de baja respuesta (DPN 5 al DPN 7) al estrés, no se observan diferencias en la morfología dendrítica (Bock y cols. 2005).

En una investigación se estudió el efecto de la separación y el uso de una materna sustituto (manipulación humana) sobre la morfología dendrítica de las neuronas en la corteza prefrontal (CPF), el hipocampo ventral CA1, y el núcleo accumbens (NAcc), regiones cerebrales en ratas macho que se han asociado con los trastornos afectivos en pre-puber (DPN 35) y post-puber (DPN 60). Las características morfológicas de las dendritas se estudiaron mediante el método de tinción de Golgi-Cox. La separación materna indujo una disminución en la longitud dendrítica total y densidad de la espina dendrítica en las neuronas del CPF, el hipocampo ventral CA1 y el NAcc a una edad posterior a la pubertad. A la inversa, la manipulación humana produjo un aumento en la densidad de la espina dendrítica en las neuronas piramidales de la PFC y el hipocampo a una edad prepuberal, y una disminución en la longitud dendrítica de las neuronas NAcc a

una edad posterior a la pubertad. Estos resultados sugieren que la condición de la atención materna afecta a la morfología dendrítica de las neuronas en el córtex prefrontal, el hipocampo ventral CA1 y el NAC a diferentes edades. Estas modificaciones anatómicas pueden ser relevantes para los comportamientos alterados observados en estos animales (Monroy y cols., 2010).

3.6 EJE HHA

El eje HHA interviene en el desarrollo de la activación conductual, emocional y autonómica así como en el desarrollo de respuestas endocrinas ante la exposición a una situación de estrés. Las conductas maternas adecuadas en la progenie resultarán en una mayor expresión génica de receptores que permitirán lograr una mejor regulación de la respuesta conductual ante una situación de estrés. La regulación del eje por corticoides se realizará sobre dos poblaciones de receptores: los receptores a mineralocorticoides (MR) y los receptores a glucocorticoides (GR). Los MR, presentes desde el nacimiento (en los roedores), son los responsables del mantenimiento de la actividad basal del eje HHA. Los GR, aparecen luego de varias semanas del nacimiento y controlan la actividad del eje HHA a los niveles basales (De Kloet y cols. 2005).

Es un sistema que consta de tres estructuras: el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas suprarrenales, mismas que a su vez liberan diferentes hormonas: la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona adenocorticotropa (ACTH) y los glucocorticoides (GC), respectivamente. La CRH es un péptido de 41 aminoácidos, sintetizado y liberado por las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo (Bloom y cols., 1982). La CRH es liberada al sistema porta-hipofisiario, a través del cual es transportada hacia la hipófisis anterior. La CRH estimula en los corticotropos adenohipofisarios la síntesis y secreción de ACTH, a través de la unión a receptores específicos en esas células (Rivier y Vale, 1983; Aguilera y cols., 2008). La ACTH liberada al torrente sanguíneo se une a receptores de alta afinidad, localizados en la membrana de las células de la corteza suprarrenal, donde estimula la síntesis y liberación de GC (Kloet y cols., 1998).

Los estudios llevados a cabo durante las últimas cuatro décadas han encontrado consistentemente que todos los días la "manipulación" o breve separación de crías de rata de sus madres (BMS) durante los primeros 2-3 semanas de vida disminuye el comportamiento ansioso inducida por el estrés agudo e hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) la activación del eje durante la edad adulta (Ader y Grotta, 1969; Meaney y cols., 1994).

Los investigadores han observado que las crías que fueron más estimuladas por la madre, cuando fueron madres, estimularon más a sus propios hijos, porque, al parecer, el referente de memoria afectiva, fruto de la acción del eje HHA y de la acción de los glucocorticoides en su propia relación con la madre, estimulan potenciales de largo plazo en el hipocampo, estructura que está relacionada con el almacenamiento de la memoria y el aprendizaje (Forero, 2005).

Michael Meaney y Moshe Szyf, ligaban lo anterior con la disminución de receptores cerebrales para glucocorticoides, y al proceso de metilación del DNA. Las hijas de ratas que expresan menos conductas maternas tenían tendencia a incrementar los grupos metilos unidos a la región de promotores, la posición "on" del interruptor del gene de receptores de glucocorticoides. Es decir, mecanismos epigenéticos estarían regulando la expresión de ese gene. Ubicados allí, estos grupos metilos bloquean el acceso para que el factor de transcripción active la producción del gene. Como resultado, se producen menos receptores. Experimentos subsecuentes muestran que al administrarse las enzimas que extraen los grupos metilos del DNA, pueden también revertir los efectos provocados por las madres descariñadas (Fish y cols. 2004). Otras investigaciones de los mismos autores señalan que a su vez las hijas de madres descariñadas, al ser ellas madres, se comportan del mismo modo. También ellas presentan mayor metilación, junto con una reducción del gene que codifica para un receptor de estrógenos en el hipotálamo, una región del cerebro que tiene que ver con la reproducción. Estos receptores amplifican la producción de oxitocina, una hormona que promueve la interacción madre-hija (Oxitocina la hormona del afecto; Weaver y cols., 2004). Entonces al haber menor producción

del gen para producir estrógenos, se producirá menos oxitocina, lo que probablemente cause cuidados maternos deficientes.

Por otro lado, se ha mostrado que los glucocorticoides estimulan el receptor NMDA para que permita el ingreso de calcio a la neurona y se una a la calmodulina, formando el complejo calcio-calmodulina que resulta primordial en los procesos de crecimiento neuronal, al estimular la formación del BDNF. Las neurotrofinas están relacionadas con la plasticidad cerebral posnatal porque coordinan el remodelamiento celular y estimulan en la neurona la liberación de neurotransmisores. El número de nuevas sinapsis se incrementa en forma exponencial en el período posnatal, especialmente durante las primeras dos semanas de vida, aumentando el número de las neuronas granulosas del giro dentado del hipocampo. La neurogénesis y la sinaptogénesis aumentan la posibilidad de modificación en la función cerebral, que depende de las primeras experiencias, es decir, si la relación madre-hijo es adecuada se suceden los cambios neurobioquímicos y biomoleculares al interior de la neurona que estimulan la neurogénesis y la plasticidad neuronal. Por el contrario, si la relación madre-hijo es deficiente, como sucede en la privación materna y la privación afectiva, se presentan fenómenos de poda neuronal, apoptosis e hiperactividad del eje HHA, que como lo comentamos anteriormente, están relacionados con mayor vulnerabilidad al estrés, disminución de la respuesta inmunológica y presentación de cuadros de ansiedad y depresión, que a su vez incrementan la morbi-mortalidad. (Roceri, 2004).

PERIODO HIPORESPONSIVO

En la rata, la mayoría de las neuronas granulares se producen durante las dos primeras semanas de vida postnatal, coincidiendo con el periodo hiporesponsivo al estrés (Schlessinger y cols., 1975). Estas dos primeras semanas se caracterizan por tener concentraciones basales bajas de glucocorticoides y una respuesta disminuida de la glándula suprarrenal al estrés, lo que se ha denominado como “periodo hiporesponsivo” al estrés (Schapiro y cols., 1962; Sapolsky, 1986). Sin embargo, es conocido que ciertos estresores tales como la separación maternal prolongada pueden elevar las concentraciones de glucocorticoides aun durante el

periodo hiporesponsivo (Levine, 1994). **Una de las áreas cerebrales que es afectada por la exposición en periodos tempranos al estrés es el hipocampo, debido en gran medida a la interacción de altas concentraciones de glucocorticoides con sus receptores hipocampales** (Ladd, 2004).

En general, los patrones alterados de la actividad HHA persisten en modelos de roedores en todo el curso de la vida. Sin embargo, el enriquecimiento ambiental (Francis, Diorio, Plotsky, y Meaney, 2002) y la manipulación de la cantidad de estimulación somatosensorial temprana puede mejorar algunos de estos efectos duraderos (Brake y cols., 2004; Caldji y cols., 1998).

3.7 SISTEMA LIMBICO

El sistema límbico está conformado por varias estructuras y núcleos los cuales están interconectados tanto funcional como anatómicamente, las principales funciones de este sistema comprenden las endocrinas, autonómicas, regulación de estímulos emocionales, motivación y memoria. Las regiones que se incluyen en este sistema son: hipocampo, bulbo olfatorio, amígdala, hipotálamo, algunos núcleos talámicos y áreas de la neocorteza (Swenson, 2006).

El sistema límbico se puede dividir en regiones límbicas corticales y subcorticales. La porción cortical del sistema límbico ("lóbulo límbico") incluye el hipocampo, circunvolución del hipocampo y la circunvolución del cíngulo. Estas regiones están compuestas de tejido cortical filogenéticamente mayor, con menos de 6 capas (allocortex). Los nodos corticales extendidos del sistema límbico incluyen la corteza prefrontal orbital y medial. Por último, las regiones límbicas subcorticales incluyen la amígdala, núcleo septal, núcleo accumbens, los cuerpos mamilares, el hipotálamo, el núcleo anterior del tálamo y mesencéfalo límbico. (White y cols., 2008).

El hipocampo, la corteza prefrontal, y los circuitos neuronales interconectadas están implicados en varios aspectos de los procesos cognitivos y de memoria- (Thierry y cols., 2000). Ahora se sabe que además de las emociones, la formación hipocampal, la amígdala y la corteza que los rodea están implicadas en procesos de aprendizaje y memoria (Carlson, 2006).

3.7.1 HIPOCAMPO VENTRAL

Situado en la parte medial del lóbulo temporal y porción anterior del hipocampo. Se relaciona con varios núcleos del sistema nervioso central; entre estos se encuentran la corteza media prefrontal, núcleo accumbens, amígdala y área ventral tegmental (Grace, 2000). La formación hipocámpal tiene tres regiones citoarquitectónicas distintas: el giro dentado, el hipocampo y el subículo, las cuales, a diferencia de la mayoría de las conexiones cortico-corticales, tienen aferencias unidireccionales. Según las conexiones, características y tamaño de las neuronas, el hipocampo se divide a su vez en las regiones CA3, CA2 y CA1 (*Cornus Ammonis*), esto en la rata y es esta última estructura la que envía proyecciones glutamatergicas a la parte ventral de la CmPF y otra parte de las neuronas envía proyecciones a la ABL, en cambio, el hipocampo recibe muy pocas conexiones recíprocas por medio de fibras corticales. Las aferencias corticales hacia el hipocampo se dan de manera indirecta, normalmente por medio de las cortezas rinales que conforman la región parahipocámpal (Sesack y cols., 1989), con las cuales genera la mayoría de las conexiones.

El hipocampo está implicado en la integración de la información multimodal y es responsable de la formación inicial de la memoria declarativa antes que la información se transfiera a otras regiones del cerebro para su almacenamiento. La formación de los recuerdos es informado por la experiencia emocional, especialmente a través de las conexiones con la amígdala, lo que conduce a un sesgo emocional en la selección de los recuerdos procesados en largo plazo. (Cools y cols., 2005). El hipocampo es especialmente sensible al estrés y también limita las respuestas al estrés biológico a través del sistema hipotálamo-pituitaria y adrenal. Conocida por su capacidad inusual para la neurogénesis postnatal. (Bush y cols., 2000).

Una función neuroendocrina del hipocampo es participar en la terminación de la respuesta de estrés por medio de una retroalimentación negativa que inhibe el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (eje HHA: Kim y Diamond, 2002). En el hipocampo existen dos tipos de receptores para corticosteroides, los mineralocorticoides (MR)

y los glucocorticoides (GR). Estos últimos, de menor afinidad y ocupados de manera masiva por corticosteroides en la respuesta al estrés, son los principales mediadores de los efectos adversos del estrés en el hipocampo (afectan negativamente al metabolismo neuronal, la supervivencia celular, las funciones fisiológicas y la morfología neuronal del hipocampo en las ratas). Numerosos estudios en las dos últimas décadas apoyan la idea de que el estrés y las hormonas del estrés deterioran las formas de memoria dependientes del hipocampo, tanto en humanos como en animales (Kim y Diamond, 2002). Estudios en pacientes exhiben un incremento de la actividad del eje HHA, con un aumento del número de pulsos secretores de hormona adrenocorticotrópica y un aumento de la magnitud de los pulsos de cortisol. Se conoce que el efecto de los glucocorticoides consiste en la regulación del metabolismo general y del comportamiento afectivo por medio de su acción directa en numerosas regiones cerebrales (Zandio y cols. 2002). La actividad del eje HHA está controlada por determinados circuitos cerebrales, que incluyen el hipocampo y la amígdala. Los glucocorticoides mediante su efecto directo en el hipocampo e hipotálamo realizan una retroalimentación negativa en el eje HHA. Se ha demostrado que las **concentraciones elevadas de corticoides mantenidas en el tiempo pueden dañar las neuronas del hipocampo, en particular las neuronas piramidales CA3** (Zandio y cols. 2002). Este daño a nivel del hipocampo conlleva una reducción de la retroalimentación negativa sobre el eje HHA, manteniendo la elevada actividad glucocorticoidea y causando un mayor daño en el hipocampo. Con base en estudios genéticos, anatómicos y conductuales, recientemente se ha propuesto separar al hipocampo en dos diferentes regiones: hipocampo ventral (HV) e hipocampo dorsal (HD; Fanselow y Dong, 2010). El hipocampo dorsal, que se corresponde con el hipocampo posterior en primates, realiza funciones principalmente cognitivas. El ventral (anterior en primates) se relaciona con el estrés, la emoción y el afecto. Sorprendentemente, la expresión génica en el hipocampo dorsal se correlaciona con las regiones corticales implicadas en el procesamiento de la información, mientras que los genes expresados en el

hipocampo ventral se correlacionan con regiones implicadas en la emoción y el estrés (amígdala y el hipotálamo).

Por lo tanto es viable decir que el hipocampo ventral es una estructura encargada de modular la emoción y los procesos afectivos. (Fanselow y Dong, 2010).

El ventral recibe proyecciones directas del bulbo olfatorio, estas proyecciones tienen una función importante en la depresión que se desarrolla después de que el bulbo olfatorio pierde algunas funciones (Song y Leonard, 2005).

3.7.2 CORTEZA MEDIA PREFRONTAL

La corteza media prefrontal (CmPF) recibe proyecciones de todas las áreas sensoriales, además de la amígdala, corteza entorrinal y circunvolución del cíngulo (Barbas, 2000). La CmPF es una región de la corteza prefrontal (CPF) con una función principalmente ejecutiva, relacionada sobre todo con el lenguaje, cognición social y regulación del comportamiento emocional (Markram y Markram, 2010). Corresponde al área cortical que recibe proyecciones del núcleo medial dorsal del tálamo en mayor proporción (Vázquez, 2008) y del hipocampo (Thierry y cols., 2000) entre otras. La CmPF presenta inervaciones eferentes a estructuras visceromotoras en el hipotálamo, así como proyecciones aferentes provenientes del tálamo mediodorsal y de la amígdala. En el área prefrontal de la corteza cerebral existe también una amplia inervación dopaminérgica proveniente del área ventral tegmental (Morgane y cols., 2005).

Las neuronas piramidales se encuentran en diferentes regiones del encéfalo de los mamíferos, sobre todo en la corteza cerebral, hipocampo y amígdala. En la CmPF se encuentran en las capas III y V, su estudio es de gran importancia porque son integradoras de la información de otras áreas corticales o subcorticales y porque se encuentran en estructuras relacionadas con procesos cognitivos (Spruston, 2008). Se caracterizan por tener un soma triangular y estructuralmente se dividen en dos dominios: basal y apical, cada uno con proyecciones dendríticas distintas. Tienen un axón que surge de la base y se ramifica para crear diversos contactos glutamatérgicos (Fig. 2; Monroy y cols, 2010). Las aferencias que reciben provienen de distintos núcleos y se distribuyen

en diferentes regiones de la neurona. Las sinapsis inhibitorias gabaergicas las reciben el soma y el axón, mientras que las excitatorias (principalmente glutamatergicas) llegan a las dendritas, las cuales están cubiertas de espinas (DeFelipe y Fariñas, 1992). Presentan espinas proximales y distales, dependiendo de la distancia del soma a la que se encuentren, las primeras son sitios postsinapticos de regiones corticales muy cercanas a la CmPF, mientras que las distales reciben sinapsis de núcleos corticales más profundos subcorticales, como el tálamo o la amígdala. (Elston y DeFelipe, 2002).

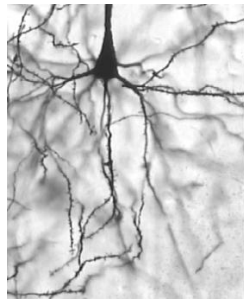


Figura 2. Neurona piramidal de la corteza media prefrontal capa III.

La forma, ramificación y extensión del árbol dendrítico, así como la cantidad de espinas dendríticas, son parámetros de la morfología neuronal que varían en torno a los cambios del medio (Fiala y cols, 2008)

Los períodos prolongados de separación de la madre están asociados con aumento de la apoptosis y disminución de la producción de factores neurotróficos, del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento neuronal (NGF). Todos los anteriores factores son responsables de los cambios en la citoarquitectura y de la reparación neuronal, aumentan la producción de nuevos brotes terminales y estimulan la sinaptogénesis. El BDNF y el NGF estimulan los microtúbulos, la reparación celular y el crecimiento de las células musgosas del hipocampo que se conectan con las células de la capa CA3 y las células colaterales. La disminución en la producción de los factores protectores neuronales ocasiona atrofia y muerte de las células de la capa CA3 y de las células musgosas (Kehoe, 1999).

3.8 NEUROPLASTICIDAD

Neuroplasticidad, plasticidad neural, plasticidad neuronal o plasticidad sináptica. La Organización Mundial de la Salud (1982) define el término neuroplasticidad como la capacidad de las células del sistema nervioso para regenerarse anatómicamente y funcionalmente, después de estar sujetas a influencias patológicas ambientales o del desarrollo, incluyendo traumatismos y enfermedades.

Nuestro cerebro nos permite percibir e interactuar con el mundo exterior. Las conexiones sinápticas entre las neuronas se pueden ajustar para responder con flexibilidad a los cambios en el medio ambiente, por ejemplo, cuando se aprende.

En la figura 4 se encuentran los mecanismos de plasticidad sináptica de cada fase de desarrollo. Los cambios postsinápticos que se producen en las sinapsis glutamatérgicas excitatorias en el hipocampo y la corteza cerebral en ratas y ratones. (Lohmann y Kessels, 2014).

La capacidad de las sinapsis de someterse a cambios plásticos de las respuestas postsinápticas se determina por muchos factores. Estructura sináptica y transmisión sináptica (receptores). Fundamental para muchos mecanismos de plasticidad son quinasas y fosfatasas que median o influyen en la plasticidad sináptica. Es importante destacar que estos componentes moleculares de la plasticidad sináptica son las demandas cambiantes para la adaptación neuronal durante el desarrollo (Lohmann y Kessels, 2014). Estructura sináptica: durante las primeras semanas las neuronas de desarrollo sufren alteraciones estructurales sustanciales: dendritas y axones crecen a un ritmo rápido y establecen nuevos contactos sinápticos. La presencia de las espinas dendríticas maximiza la conectividad dentro del volumen disponible de tejido. Composición receptor AMPA: la mayoría de las sinapsis utilizan α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) –tipo de receptores de glutamato (AMPA) para la transmisión rápida de señales a través de la sinapsis. La eficacia por la que las señales se transmiten a través de la sinapsis depende del número de AMPARs en el sitio postsináptica. La potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) de la fuerza sináptica se expresan mediante la adición y eliminación de

AMPA sinápticas (Bassani y cols., 2013). Composición receptor NMDA: NMDARs son receptores ionotrópicos que mediante la transmisión de iones de calcio median múltiples formas de plasticidad sináptica (Malenka y Nicoll, 1993). Además, NMDARs desempeñan un papel estructural y pueden estabilizar las sinapsis (Alvarez y cols. 2007). Mecánicamente importante es su regulación sofisticada del poro de iones. Quinasas y fosfatasa: eventos de plasticidad sináptica están mediados por la alteración de las interacciones de proteínas a través de la fosforilación. Los objetivos de fosforilación comprenden una gran variedad de proteínas sinápticas - incluyendo NMDAR y AMPAR. Aquí, nos centramos en aquellos Ser / Thr quinasas / fosfatasa que son considerados clásicamente el más importante para la plasticidad sináptica: la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC) y la CaMKII, y las fosfatasa PP1, PP2A y la calcineurina (PP2B;Lohmann y Kessels, 2014).

FASES DE DESARROLLO DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA

Etapas postnatales tempranas del desarrollo de la sinapsis, PD 0-4 (FIG. 3A)

El comportamiento del roedor recién nacido se basa en gran medida en los reflejos. Por ejemplo, el reflejo de succión requiere olfato y sensación táctil, y está mediada por el tronco cerebral. El hipocampo y la corteza reciben información sensorial, única experiencia limitada durante los primeros días de vida (Colonnese y cols., 2010). La densidad de las sinapsis es aún muy baja en el hipocampo (Fiala y cols., 1998) y la corteza (De Felipe y cols., 1997),

Cabe destacar que una de las subunidades del receptor de glutamato de cola larga, GluA4, se expresa al máximo durante este período. Como AMPARs contiene GluA4-se pueden incorporar en las sinapsis durante las primeras etapas de la formación de sinapsis (Sia y cols. 2007).

El desarrollo de sinapsis antes de la aparición de la experiencia visual y auditiva, PD5-14 (FIG. 3B).

La segunda fase postnatal del desarrollo del cerebro conduce hasta el momento en que los ratones y las ratas abren los ojos, el oído y comienzan a interactuar con el medio ambiente al final de la segunda semana de vida. Numerosas sinapsis

aumentan de manera constante, a una velocidad de máxima en el hipocampo (Fiala y cols., 1998) y casi al máximo en la corteza (De Felipe y cols., 1997).

El GABA actúa como transmisor de despolarización durante la primera semana de vida y se convierte en inhibidora sólo durante la segunda semana. La causa del cambio de despolarización a la acción de hiperpolarización de GABA es una reducción en la concentración de cloruro intracelular durante la segunda semana postnatal, que está mediada a su vez por los cambios en la expresión del transportador de cloruro (Rivera y cols., 1999). Es importante destacar que, en las sinapsis GABAérgicas las despolarizaciones pueden quitar el bloqueo de magnesio de NMDAR durante esta etapa del desarrollo (Leinekugel y cols., 1997) y por lo tanto pueden contribuir directamente a la plasticidad (Chancey y cols. 2013).

Durante las próximas 2 semanas cuando los animales jóvenes comienzan a explorar el entorno, aumentan la densidad de sinapsis rápidamente en la corteza y el hipocampo (De Felipe y cols., 1997).

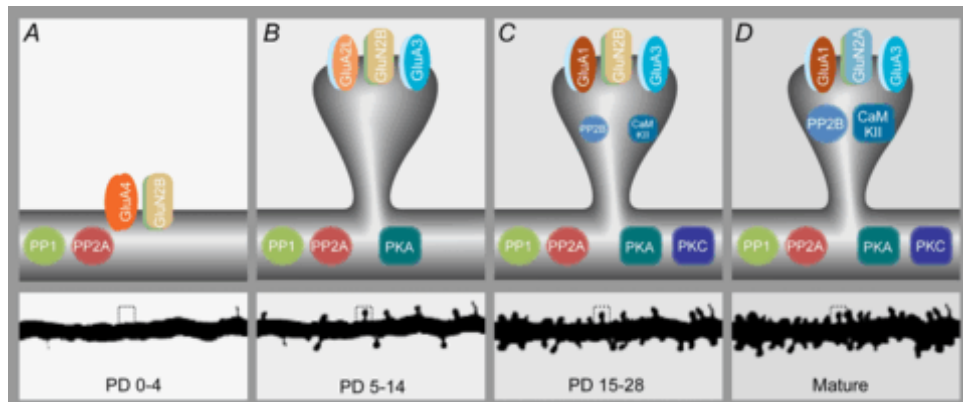


Figura 3. Etapas fundamentales de la sinapsis.

Esquemática de la estructura y de plasticidad en cuatro etapas fundamentales del desarrollo de moléculas de sinapsis glutamatérgicas.

A, entre el día postnatal 0 y 5 la mayoría de las sinapsis se encuentran en el eje dendrítico, AMPARs solamente consistir en GluA4 y NMDARs tener toda GluN2B. Fosfatasa PP1 y PP2A están presentes, pero las quinasas primos son todavía ausentes. B, entre los días postnatales 5 y 14 sinapsis son todavía escasos, pero empezar ocurre en las espinas, GluA2long está temporalmente la subunidad

dominante de cola larga AMPAR, mientras AMPAR de cola corta subunidades GluA2 / 3 también empezar a ser expresado. PKA está convirtiendo en la quinasa dominante. C, en la tercera y cuarta semanas después de los números de la columna vertebral a luz a aumentar exponencialmente. Dos tipos de AMPARs dominan de este momento en adelante: Glu-A1 / 2s y GluA2 / 3s. La quinasa PKC está alcanzando niveles máximos. Los niveles de expresión de la calcineurina (PP2B) CaMKII y van en aumento. D, cuando el roedor está maduro, los números de la columna vertebral maximizar, el interruptor del desarrollo de GluN2B a GluN2A ha ocurrido y CaMKII y la calcineurina (PP2B) han alcanzado niveles máximos. (Lohmann y Kessels, 2014).

En la primera fase de desarrollo temprano de roedores, se emplean mecanismos de plasticidad sináptica para crear la red sináptica. En la segunda fase de desarrollo de conexiones sinápticas están siendo afinados para preparar de manera óptima el cerebro para interpretar y responder al mundo exterior. Durante la tercera fase, la plasticidad sináptica se utiliza para procesar, interpretar y codificar toda esta nueva información en el cerebro. En la fase cuatro, el hipocampo y la corteza madura utilizan plasticidad sináptica para aprender, adaptar el comportamiento y crear recuerdos. (Lohmann y Kessels, 2014).

3.9 NEUROGENESIS

La neurogénesis, es decir, el proceso que implica la generación de nuevas neuronas, se ha demostrado que se producen en el hipocampo y en el bulbo olfativo en mamíferos adultos, lo que sugiere que las células madre neuronales persisten durante toda la vida útil. Los precursores primarios han sido identificados en regiones especializadas llamadas nichos neurogénicos. Curiosamente, las células que dan lugar a las nuevas neuronas en el cerebro adulto expresan marcadores de células gliales, un linaje celular que es un largo camino de la de las neuronas. Estudios llevados a cabo durante el desarrollo del cerebro han demostrado que las células gliales radiales no sólo dan lugar a astrocitos, sino también a las neuronas, oligodendrocitos y células ependimales. Además, se sabe

que las células gliales radiales son también los precursores de las células madre neuronales en el cerebro adulto (Arrias-Carrión y cols., 2007).

AMNESIA INFANTIL

Los adultos son incapaces de recordar eventos específicos de nuestros primeros años de vida, fue nombrado amnesia infantil por Sigmund Freud hace más de 100 años (Freud 1900 , 1914). Propone que la pérdida de memoria en los bebés y los niños se debe a los altos niveles de neurogénesis postnatal en el hipocampo.

Los recuerdos episódicos se forman durante el primer período postnatal se olvidan rápidamente, un fenómeno conocido como "amnesia infantil ". A pesar de esta pérdida de memoria, las experiencias tempranas influyen en el comportamiento de adultos, planteando la cuestión de qué mecanismos subyacen los recuerdos infantiles y amnesia. Una experiencia aprendida durante el período de amnesia infantil se almacena como una huella de memoria latente durante mucho tiempo. La formación y el almacenamiento de esta memoria latente requiere el hipocampo, sigue un límite temporal agudo y se produce a través de mecanismos típicos de los períodos críticos del desarrollo, incluyendo el interruptor de expresión de las subunidades del receptor de NMDA, que es dependiente de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y metabotrópicos del receptor de glutamato 5 (mGluR5; Travaglia y cols., 2016).

Existen dos ideas sobre la amnesia infantil, se debe a que las estructuras clave para la formación y el almacenamiento de memoria ("inmaduras del cerebro") o, el proceso de maduración en curso interfieren con la consolidación de la memoria estable (teorías "en curso de maduración cerebral"). Las dos regiones clave para la memoria declarativa, la corteza y el hipocampo, muestran el desarrollo postnatal prolongada (Eriksson y cols., 1998)

Curiosamente, los niveles de la neurogénesis y la estabilidad de la memoria son inversamente proporcionales: La incapacidad para formar, memorias estables persistentes en la vida temprana coincide con un período de alta neurogénesis, mientras que la capacidad de formar, memorias estables persistentes solamente emerge en períodos posteriores del desarrollo como la tasa de la disminución de

la neurogénesis (Figura 4). Sugieren la hipótesis neurogénica de los ideales de Campbell y Spears (1972) en la que las “nuevas neuronas” degradan memorias existentes, ya sea aumentando la excitabilidad (y por lo tanto la inestabilidad) de las redes de memoria del hipocampo o la sustitución de las conexiones sinápticas en el hipocampo preexistentes en los circuitos de memoria. A esta se le integran las visiones contemporáneas de forma continua la neurogénesis impactos del hipocampo función del circuito y de almacenamiento de información (Chambers y cols., 2004).

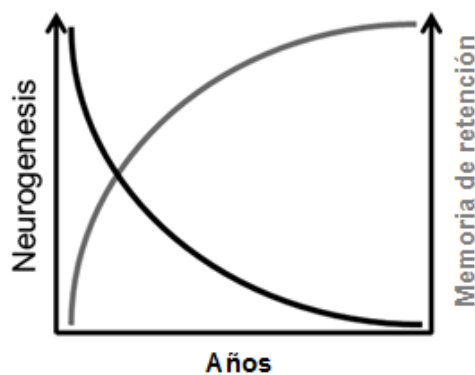


Figura 4. La hipótesis neurogénica de la amnesia infantil.

Los niveles de neurogénesis (negro) y la estabilidad de la memoria / retención (gris) son inversamente proporcionales: La incapacidad para formar memorias estables persistentes en la vida temprana coincide con un período de alta neurogénesis, mientras que la capacidad de formar, memorias estables persistentes solamente emerge en adelante períodos de desarrollo como la tasa de disminución de neurogénesis (Josselyn y Frankland, 2012).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los roedores, durante las primeras dos semanas de vida se encuentran bajo un período de desarrollo, donde la responsividad a estímulos estresantes es casi ausente (período hiporesponsivo). Se ha propuesto que el cuidado materno es esencial para que este proceso ocurra adecuadamente. Así, nos planteamos la siguiente pregunta ¿En qué medida la ausencia de cuidados maternos durante los

día 4 al 14 postnatales, afecta la citoarquitectura de áreas involucradas en regular las respuestas emocionales como el Hv y la CmPF?

5. JUSTIFICACIÓN

Los fundamentos teóricos y clínicos de la neuropsicología infantil se basan en la neuropsicología del adulto, pero estos tienen muchas diferencias. Por ello la importancia de hacer estudios en la etapa infantil para obtener resultados más precisos.

En ratas adultas se ha reportado que la separación maternal total y crianza artificial modifica negativamente el desarrollo de varias conductas sociales como la conducta materna, la conducta sexual masculina, y la agresión (Gonzalez y Cols., 2001; Fleming y Cols., 2002; Melo y Cols., 2006). Como solución han dado estimulación corporal revirtiendo los efectos negativos. Sin embargo se desconoce si la separación materna total y crianza artificial en etapa infantil modifica negativamente la citoarquitectura de las neuronas en distintas áreas del cerebro.

A pesar de que existen investigaciones que evalúan la importancia de los cuidados maternos en los adultos, los resultados son poco claros, debido en parte a las diferentes formas de evaluación. Asimismo los estudios publicados hasta la fecha no han evaluado la morfología dendrítica de hipocampo ventral y corteza media prefrontal en etapa infantil en animales de crianza artificial. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto de la crianza artificial sobre la morfología dendrítica a 14 DPN. Así como el efecto de la estimulación táctil corporal.

6. HIPÓTESIS

La ausencia de cuidados maternos en ratas de 14 días posnatal afecta la citoarquitectura del hipocampo ventral y corteza media prefrontal capa III y V disminuyendo la densidad de espinas y longitud dendrítica.

7. OBJETIVO GENERAL

Explorar la participación de la experiencia sensorial y social, a través de la separación maternal total y crianza artificial, durante el día posnatal 14 sobre la modificación de la citoarquitectura de las neuronas del hipocampo y corteza media prefrontal.

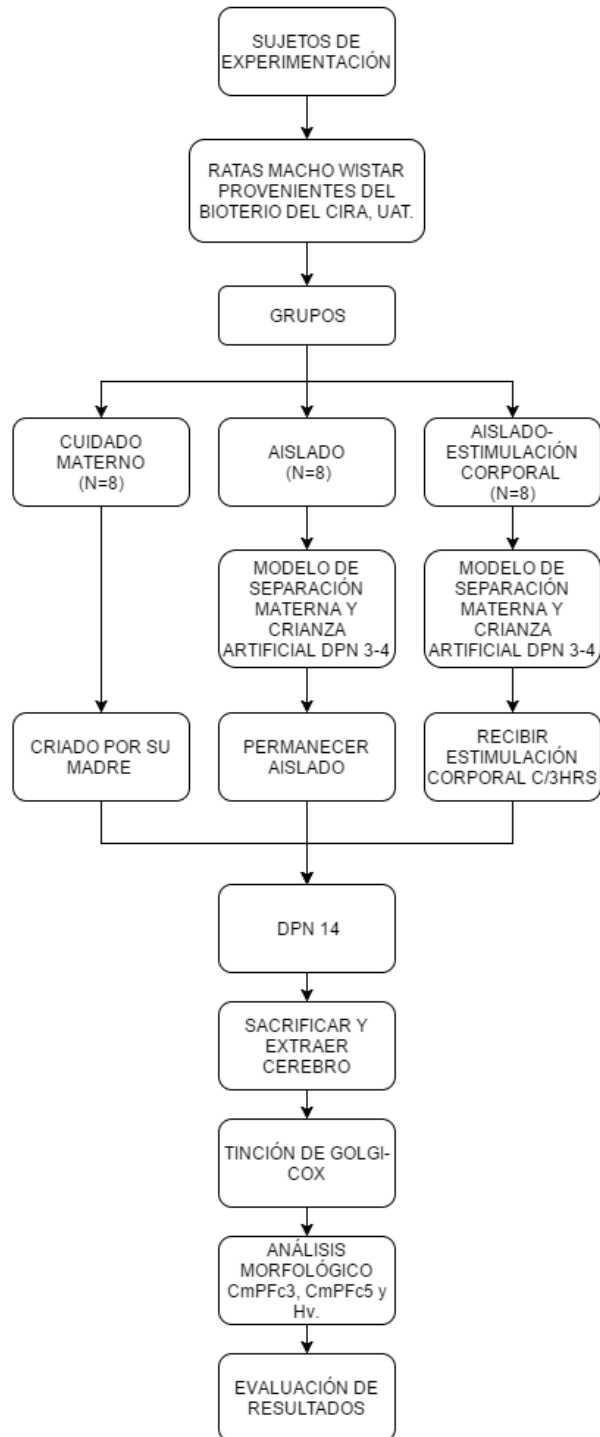
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar los efectos de la separación materna total y crianza artificial sobre la morfología dendrítica de Hv, CmPF c-III y V al 14 días postnatales (DPN).
- Determinar si la estimulación táctil corporal previene los efectos negativos.

8. METODOLOGÍA

ESQUEMA DE TRABAJO

MODELO DE CRIANZA ARTIFICIAL DPN 14 Y GOLGI COX.



REPRODUCCION DEL MODELO DE SEPARACION MATERNA TOTAL Y CRIANZA ARTIFICIAL.

EL MODELO DE CRIANZA ARTIFICIAL.

La SMT consiste en separar a crías totalmente del nido a partir del día 3-4 de vida, colocarlas y mantenerlas dentro de un sistema de crianza artificial (Fig.5), para proveerles de calor, protección, y nutrientes, hasta el destete (22 días de edad). (Melo y cols. 2013).



Figura 5. Sistema de crianza artificial.

Se muestra el sistema de crianza artificial, el cual consiste en un acuario de agua caliente, dentro del cual se colocan recipientes con aserrín. Después de implantar un catéter en la mejilla de las crías, se colocan dentro de los recipientes. A través de un sistema de catéteres se conectan a una jeringa llena de leche artificial y ésta se fija sobre una bomba de infusión la cual infunde leche durante 10 minutos cada hora, durante las 24 horas del día.

La SMT y crianza artificial, tiene algunas características: 1) permite criar a la progenie dentro de un ambiente controlado sin la madre, sin los hermanos de camada, sin el olor del nido, y sin la leche materna, 2) las crías no son privadas de nutrientes ya que el peso corporal y de diversos órganos internos (hígado, cerebro, intestinos) de estas crías no difiere del de las criadas por su madre, 3) es posible evaluar de manera específica la participación de cada uno de los estímulos sensoriales /sociales/hormonales involucrados durante este período crítico de desarrollo, 4) la temperatura corporal no se modifica ya que permanecen en un

ambiente con temperatura controlada. De hecho, ratas adultas que sufrieron SMT y criadas en el sistema de crianza artificial presentan (Fig.6): 1) déficit de atención e hiperactividad, 2) déficit de aprendizaje social, 3) reducción de la respuesta inhibitoria al prepulso (PPI, prepulse inhibition, elemento utilizado como modelo de esquizofrenia, 4) déficit en la expresión de la conducta sexual masculina, y en la conducta materna, 5) cambios en la respuesta a anfetaminas, 6) incremento en la respuesta al estrés, 7) incremento en la agresividad materna y territorial en el macho, 8) mayor impulsividad, 9) altos niveles de depresión y ansiedad, 10) reducción en los niveles de sinaptosina (proteína de las sinapsis), N-Cam (moléculas de adhesión celular), GAP-43 (proteínas para la elongación de los axones) y factor neurotrófico derivado del cerebro en varias regiones del cerebro como la corteza prefrontal y el núcleo accumbens, 11) reducción en la longitud de dendritas, y el número de espinas dendríticas, de la corteza prefrontal y el hipocampo ventral (CA1). Además, la adición de estímulos sensoriales (con una brocha de pelos de camello) o sociales (se colocan crías de la misma edad dentro de los recipientes de aislamiento) durante el aislamiento, previenen parcialmente algunos de los efectos negativos de la SMT. (Melo y cols. 2013).

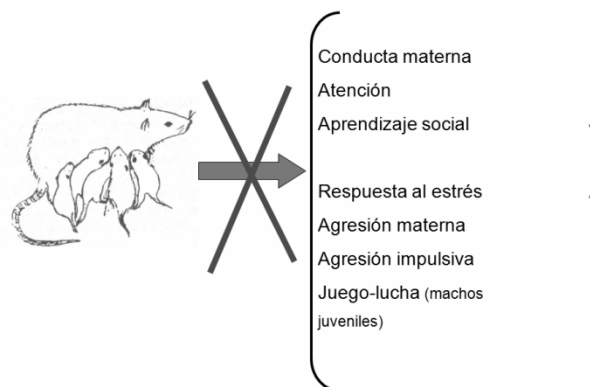


Figura 6. Efectos de la separación materna total y crianza artificial.

Se muestran los efectos de la separación materna total y crianza artificial durante el período postnatal. Como se observa en el esquema, el aislamiento produce: déficit de la CM, déficit de atención y de aprendizaje social. Además, incrementa la

respuesta al estrés, la agresión materna (hembras) e impulsiva (machos), y la conducta de juego-lucha en machos juveniles, entre otras alteraciones.

Estas estimulaciones de hisopado reemplazan el lamido materno crítico para la normalidad del desarrollo de la función endocrina y fisiológica, incluyendo la inducción de la defecación y la micción (Burton y cols., 2006; Lovic y Fleming, 2004; Melo y cols., 2006). Las manipulaciones en la cantidad de estimulaciones somato-sensorial de todo el cuerpo se han encontrado para moderar el efecto de la privación materna (Lovic & Fleming, 2004).

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar obtenidas del bioterio de producción del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV. Las ratas crías fueron sometidas al sistema de crianza artificial durante los días 4 al 14 de edad, sacrificadas al día 14 para extraer cerebro y proceder con su análisis.

PROCEDIMIENTO GENERAL

Tres o cuatro días después del nacimiento de las ratas, se retiraron de sus nidos. De las veinticuatro ratas macho 8 se regresaron inmediatamente para ser criadas por su madre (grupo control CM), los otros machos restantes se les implantó un catéter PE-10 en la mejilla (Lomanowska y cols., 2011). Fueron colocados dentro de un sistema de crianza artificial (CA), sin compañeros (CA y CA-T), y alimentados con fórmula láctea (leche preparada). La leche se administró a través del catéter hasta el día 14 postnatal.

CIRUGIA

La cirugía consiste en implantar un catéter en la mejilla del neonato para alimentarlo. Para esto se requirió un catéter de polietileno PE-10 (*Intramedic Clay Adams Brand*) de diez centímetros de longitud, aproximadamente. Un extremo del catéter es previamente expuesto al calor para redondearlo y se coloca en ese sitio una pieza circular de plástico (rondana) que sirve como anclaje en la pared de la

mejilla interna de la cría. Posteriormente se coloca dentro del catéter un cable guía de acero inoxidable de 0.24 cm. de diámetro y 7.2 cm. de longitud. Además, con un tubo de silastic se cubre un extremo para evitar lastimar a la cría. Poco antes de implantar el catéter se humedece con aceite el extremo donde se encuentra el tubo de silastic, para asegurar un deslizamiento adecuado a través de la mejilla de la cría.

En el día del implante (DPN 4), se pesa a cada cría y se anestesia con hielo en la parte que se va a implantar. A continuación se introduce el catéter por el extremo cubierto de silastic empujando con presión de la mejilla interior de la boca a la parte externa de la mejilla, se pasa lentamente hasta que el extremo que tiene la rondana toque la pared interna de la mejilla. Después se retira el tubo de silastic y el cable guía, y se aplica crema antibacterial (Terramicina) en la parte perforada. Se coloca otra rondana en el extremo exterior de la pared de la mejilla seguido por un pedazo corto de catéter PE-50 (Intramedic Clay Adams Brand) que sirve para asegurar que el catéter no se salga.

La cría se coloca dentro del recipiente de aislamiento, y éste dentro de una incubadora de agua caliente (38-39°C). A partir de este día, el peso corporal de cada cría se registra todos los días hasta el destete.

CRIANZA ARTIFICIAL.

Posterior a la cirugía, cada cría se aloja dentro de un recipiente de plástico (11 mm. de diámetro x 20 mm. de profundidad), cuyo piso es previamente cubierto con aserrín estéril. El recipiente se coloca dentro de un segundo recipiente que se encuentra flotando en un acuario con el agua a una temperatura de 39°C +/- 1, de esta forma la temperatura dentro del recipiente oscila entre los 34-36°C. Conforme las crías van creciendo, la temperatura del agua se reduce de manera gradual hasta los 31-32°C al final del periodo cuando las crías ya tienen pelo.

El catéter implantado en la mejilla es conectado a otro más grande (PE-50) y éste a su vez, a una jeringa desechable con leche artificial (fórmula tomada de la Universidad de Iowa; Messer y cols., 1969, modificada por Smart y cols., 1983) para su alimentación. La jeringa es montada en una bomba de infusión

programable Harvard (Harvard Apparatus Syringe Pumps, PHD 2000). Ésta a su vez, se programa para infundir leche cada hora durante diez minutos, las 24 horas del día.

La velocidad de infusión se ajusta cada día de acuerdo al peso corporal promedio de las crías conectadas a la bomba (Gonzalez y cols., 2001). Para el primer día dentro del sistema de crianza artificial (DPN 4 de la cría), la cantidad corresponde al 33% del peso corporal promedio, es decir, el peso promedio de las crías se multiplica por 0.33, el resultado (corresponde a la cantidad total de leche que consumirán por 24 horas) se divide entre 240 (número total de minutos de infusión por día) y el resultado corresponde a la velocidad de infusión. En los siguientes días la velocidad se ajusta de acuerdo al peso promedio de todas las crías aumentando al 1% cada día hasta un máximo del 45% del peso promedio.

Cada mañana a la misma hora, la bomba se detiene y las crías son pesadas, los catéteres PE-10 y PE-50 limpiados con agua destilada tibia y las jeringas se reemplazan por otras nuevas con leche tibia (en baño maría). Todas las crías reciben estimulación en la región anogenital dos veces al día, durante 30-45 segundos con un pincel húmedo de cerdas de camello en dirección de arriba hacia abajo, simulando los lamidos de la madre, en la región anogenital para estimular la defecación y micción (Gonzalez y cols., 2001).

GRUPOS EXPERIMENTALES

Se formaron los siguientes grupos experimentales:

- 1) CM, criados con su camada por su madre.
- 2) CA, recibieron estimulación en la región anogenital dos veces al día para inducir la micción y defecación.
- 3) CA-T, recibieron estimulación en el cuerpo con un pincel, cada 3 horas durante 5 veces al día y dos veces al día estimulación anogenital para inducir la micción y defecación.

PREPARACIÓN DE FÓRMULA LÁCTEA

La fórmula láctea fue provista por la Universidad de Iowa, E. U. A. (Dieta Messer; Messer y cols., 1969) cuya fórmula contiene: $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, KCl y $MgCl_2$, además metionina, triptófano, vitamina mix, Fosfato de Calcio Tribásico y Ácido Deoxicólico marca (Sigma), leche evaporada (Carnation), agua estéril, proteína de soya y aceite de maíz.

ESTUDIO MORFOLÓGICO

Camillo Golgi ideó uno de los métodos de impregnación de células nerviosas, que aún mantiene un sitio de honor dentro del campo de la descripción morfofuncional del sistema nervioso. Este método permite la impregnación selectiva de las células nerviosas y sus prolongaciones con la reacción del nitrato de plata y el dicromato de potasio o de sodio (Alvarado, 1994). La modificación que utilizamos en este trabajo es la que realizó Cox (1891) donde es sustituida la plata por el mercurio. A pesar de los cambios que se han hecho a través de los años es una técnica que se sigue utilizando con buenos resultados.

PROTOCOLO DE LA TINCIÓN DE GOLGI-COX.

- a) Después de realizar la crianza, al día 14 posnatal anestésiar a las ratas con una sobredosis de pentobarbital sódico una dosis de 60 mg/Kg.
- b) Perfundir con solución salina al 0.9% por el ventrículo izquierdo del corazón, realizando un corte a la arteria aorta descendente con la finalidad de quitar los eritrocitos del tejido cerebral.
- c) Remover los cerebros para ser fijados en 20 ml de la solución de Golgi-Cox y almacenar en la oscuridad durante 21 días.
- d) Después de este tiempo drenar la solución de Golgi-Cox y reemplazar por una solución de sacarosa al 30%. Los cerebros fueron almacenados en la oscuridad por 2 días más antes de cortar.
- e) Montar el cerebro en la platina del vibratómetro utilizando pegamento cianoacrílico y sumergirlo en agua destilada
- f) Cortar el tejido haciendo rebanadas de 200 μm de grosor.

- g) Montar las rebanadas en laminillas gelatinizadas al 2 % presionándolos uniformemente con papel filtro húmedo.
- h) Mantener las laminillas en una cámara húmeda durante el tiempo de corte de todo el cerebro.
- i) Hacer revelado de los cortes obtenidos.

PROTOCOLO DE REVELADO DE LA TINCIÓN DE GOLGI-COX.

El procedimiento se realiza en total oscuridad (Gibb y Kolb, 1998).

- 1) Enjuagar con agua destilada, 1 minuto.
- 2) Hidróxido de amonio, 30 minutos.
- 3) Enjuagar con agua destilada, 1 minuto.
- 4) Fijador rápido de Kodak al 50%, 30 minutos.
- 5) Enjuagar con agua destilada, 1 minuto.
- 6) Deshidratar el tejido con concentraciones crecientes de etanol, 50, 70 y 95%, 1 minuto en cada uno, para finalizar con 5 minutos en alcohol absoluto (2 veces).
- 7) 15 minutos en xileno.
- 8) Cubrir el tejido con resina sintética (al 60% en xilol, marca Hycel) y
- 9) Resguardar en oscuridad para su secado.

TRAZADO DE NEURONAS CONTRASTADAS CON LA TINCIÓN DE GOLGI-COX.

Una vez que se localizó el área de interés con ayuda de Paxinos y Watson 1986, en este caso la corteza media prefrontal y el hipocampo ventral, procedimos a identificar las neuronas, mediante su observación a 40X utilizando un microscopio óptico marca Leica modelo DMSL acoplado a una cámara lúcida marca Leica. Con este mismo equipo se procedió al trazado de las espinas dendríticas utilizándose una distancia de 30 micrometros de longitud por cada dendrita neuronal, dicha observación se realizó a 100X.

CORTEZA MEDIA PREFRONTAL

Las neuronas características de la corteza son de tipo piramidal cuyo soma tiene la forma de una pirámide o de un triángulo isósceles cuyo vértice superior se prolonga hacia la superficie del cerebro como dendrita apical o prolongación; del cuerpo de la célula surgen un número de dendritas basales que se arborizan en la vecindad de la célula las cuales reciben estímulos equitadores tanto de la misma área como de áreas adyacentes. Tanto las dendritas apicales como las basales tienen espinas dendríticas y constituyen el sitio de sinapsis glutamatérgica, siendo el número de espinas el número mínimo de contactos sinápticos de la neurona (Spruston 2008; Figura 7).

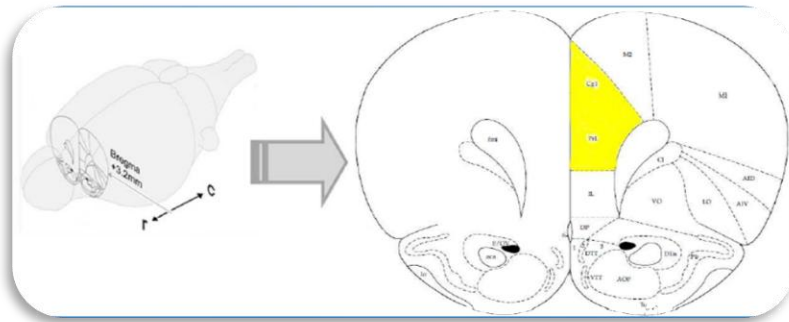


Figura 7. Localización de la corteza media prefrontal.

Corte coronal de cerebro de rata, donde podemos localizar perfectamente la CmPF a Bregma 3.20mm (Paxinos y Watson, 1998).

HIPOCAMPO

La formación hipocámpal en la rata se asemeja a una estructura con forma de C extendida desde la parte septal hacia la zona basal del prosencéfalo siguiendo la línea rostródorsal. A lo largo de la formación hipocámpal, sobre el eje septotemporal es la región dorsal; y la porción más caudal es lo que llamamos hipocampo ventral (Figura 8; Witter y Amaral, 2004).

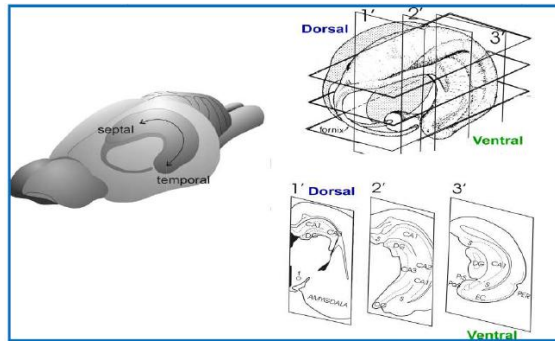


Figura 8. Localización del hipocampo.

Esquema que representa tridimensional y bidimensionalmente la región hipocampal del cerebro de rata (Modificado de Witter y Amaral, 2004).

Las neuronas piramidales del hipocampo ventral presentan un soma triangular característico. Del ápice del soma emerge el árbol dendrítico apical que se extiende hacia la fisura hipocampal. De la base del soma presenta de 5-15 dendritas basilares que se extienden hacia el stratum (Fig. 9; Juárez y cols., 2008).

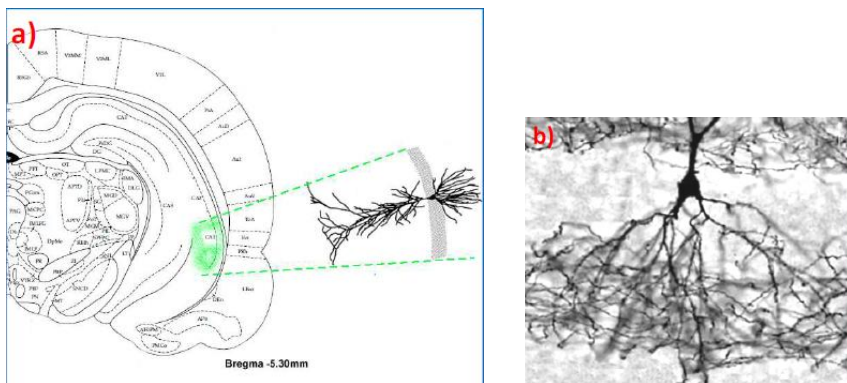


Figura 9. Localización de hipocampo ventral.

a) Lámina de atlas de Paxinos y Watson (1998) a nivel de Bregma -5.30mm, donde se encuentra la región CA1 ventral, b) Microfotografía de una neurona piramidal de la región CA1 del hipocampo ventral (Juárez y cols., 2008).

ESPINAS

Las espinas dendríticas son minúsculas protuberancias protoplasmáticas que revisten la superficie de muchas neuronas y representan el sitio de contacto sináptico de tipo excitador por excelencia. La densidad de estas va de 1 a 10 por micrómetro a lo largo de la longitud de la dendrita. Algunas neuronas como las del

hipocampo contienen miles de espinas a lo largo de la arborización dendrítica (Sorra y Harris, 2000).

ANÁLISIS DE RESULTADOS MORFOLÓGICOS

La evaluación de los datos morfológicos se realizó mediante el análisis de Sholl (Fig. 10; Sholl, 1953), el cual consiste en iluminar de diferentes colores las dendritas de acuerdo a sus bifurcaciones, contándose como primaria a la dendrita que surge del soma, secundaria, terciaria y sucesivamente hasta n orden, después colocar una plantilla transparente de una serie de círculos concéntricos alrededor del cuerpo de la neurona (el centro debe coincidir con el soma) y de esta manera determinar el número de dendritas que interceptan cada uno de los círculos. Para el análisis, cada caso fue representado por el valor promedio obtenido por cada círculo de radio diferente (10 μm de diferencia entre cada círculo que antecede a otro), estos datos nos permite evaluar la longitud dendrítica total (indicador de la complejidad del árbol dendrítico), así como la longitud por número de orden (medida de la complejidad de las dendritas; Stephens y cols., 2005). Para obtener el número de espinas dendríticas, se buscó un segmento de 30 μm de las dendritas distales al soma, se dibuja y contabiliza las espinas en estos segmentos y se hace un promedio del número de espinas (Vega y cols., 2004; Solís y cols., 2007).

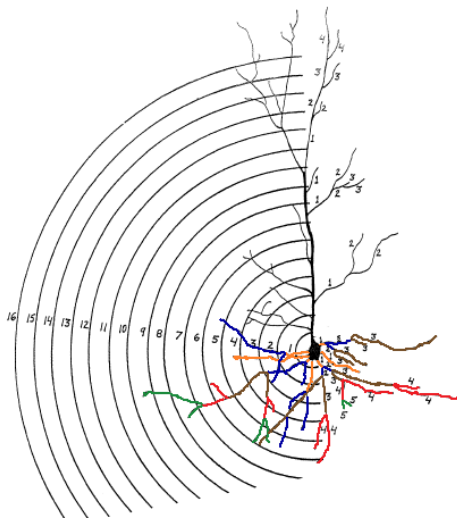


Figura 10. Plantilla de discos concéntricos para el análisis de Sholl.

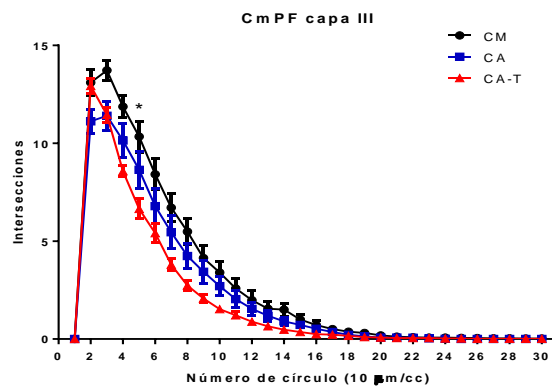
Cada disco concéntrico esta calibrado para que el primer círculo corresponda a un radio de 10 μm , el segundo a 20 μm y sucesivamente todos representan 10 μm más.

9. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la morfología dendrítica utilizando la técnica de Golgi-Cox realizada a 24 animales tanto experimentales como controles. Los parámetros evaluados en este análisis comprenden: la arborización dendrítica, el número máximo de orden, la longitud dendrítica total y la densidad de espinas dendríticas en 10 μm . Estos parámetros fueron evaluados a neuronas piramidales de hipocampo ventral y corteza media prefrontal capa III y V.

9.1 CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA III ARBORIZACIÓN DENDRÍTICA DE LA CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA III

Los resultados en el parámetro de arborización dendrítica de la corteza media prefrontal capa III se observa cambios del grupo táctil con respecto al grupo control.

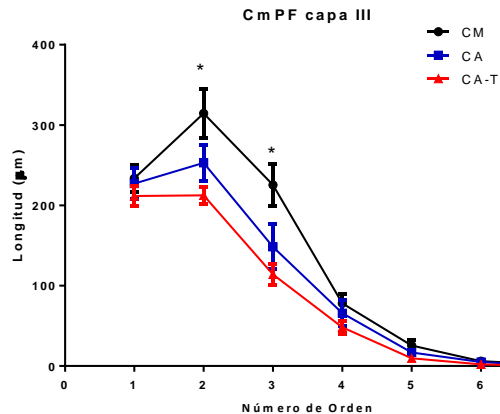


Gráfica 1. Arborización dendrítica CmPF c-III.

Arborización dendrítica de neuronas de la corteza media prefrontal capa III al 14 DPN. Cada grupo con $n=8$, ANOVA de una vía con una $*p<0.05$. Se observa una tendencia de un decremento de las intersecciones del grupo táctil con respecto al control.

NÚMERO DE ORDEN DE LA CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA III

Los resultados en el parámetro de número de orden de la corteza media prefrontal capa III se observa cambios en los grupos aislado y táctil, respecto al grupo control.

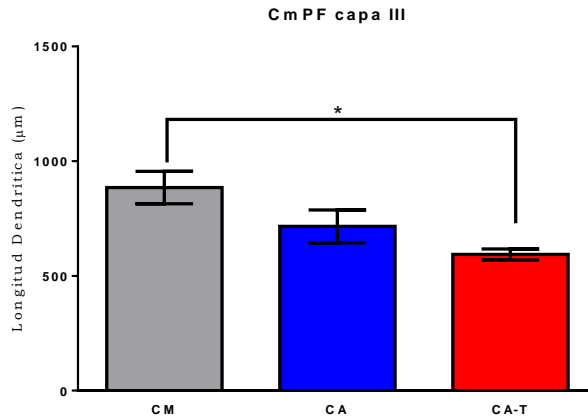


Gráfica 2. Número de orden CmPF c-III.

Número de orden de la corteza media prefrontal capa III al 14 DPN. Cada grupo con $n= 8$. ANOVA de una vía con una $*p<0.05$. Se observa diferencias significativas en una disminución del orden 2 y 3 de los grupos aislado y táctil con respecto al control.

LONGITUD DENDRÍTICA DE LA CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA III

Los resultados en el parámetro de longitud dendrítica de la corteza media prefrontal capa III se observa cambios en del grupo táctil, respecto al grupo control.

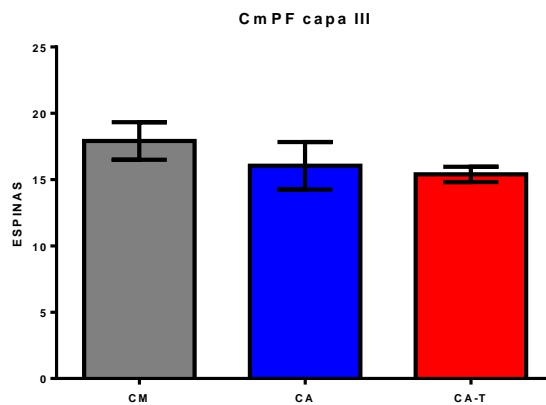


Gráfica 3. Longitud dendrítica CmPF c-III.

Longitud dendrítica de la corteza media prefrontal capa III al 14 DPN. Cada grupo con n= 8. ANOVA de una vía con una $*p<0.05$. Se observa diferencia significativa en una disminución del grupo táctil respecto al control.

DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS DE LA CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA III

Los resultados en el parámetro de densidad de espinas dendríticas de la corteza media prefrontal capa III presenta algunas variaciones pero no son diferencias significativas en los grupos aislado y táctil, respecto al grupo control.



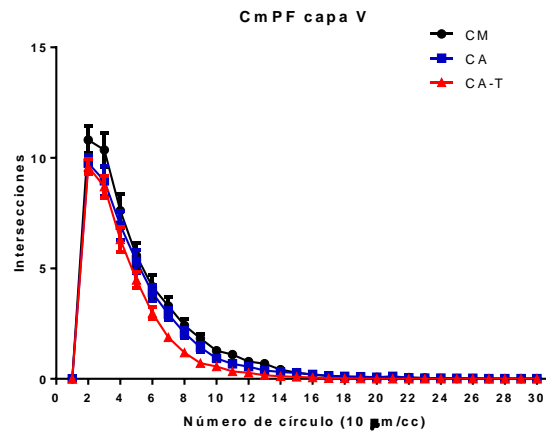
Gráfica 4. Densidad de las espinas dendríticas CmPF c-III.

Densidad de espinas dendríticas de la corteza media prefrontal capa III al 14 DPN. Cada grupo con n= 8. ANOVA de una vía con una $*p<0.05$. No se observa diferencias significativas.

9.2CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA V

ARBORIZACIÓN DENDRÍTICA DE LA CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA V

Los resultados en el parámetro de arborización dendrítica de la corteza media prefrontal capa V no se observa cambios en los grupos aislado y táctil, respecto al grupo control.

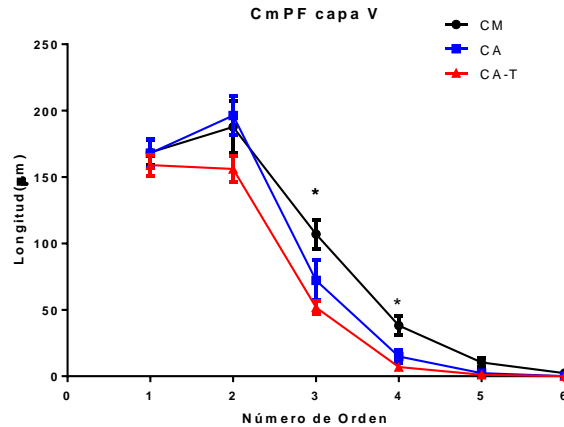


Gráfica 5. Arborización dendrítica CmPF c-V.

Arborización dendrítica de neuronas de la corteza media prefrontal capa V al 14 DPN. Cada grupo con n= 8, ANOVA de una vía con una * $p < 0.05$. No se observa diferencias significativas.

NÚMERO DE ORDEN DE LA CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA V

Los resultados en el parámetro de número de orden de la corteza media prefrontal capa V se observa cambios en los grupos aislado y táctil, respecto al grupo control.

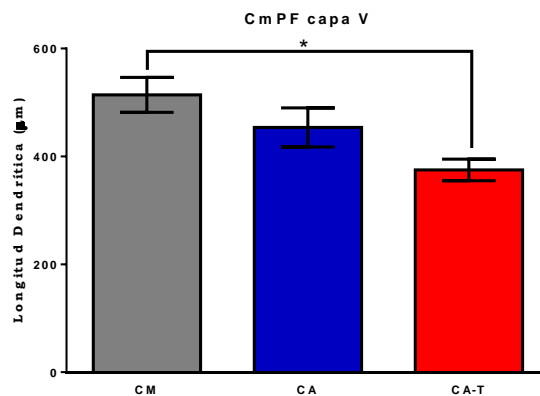


Gráfica 6. Numero de orden CmPF c-V.

Número de orden de la corteza media prefrontal capa V al 14 DPN. Cada grupo con $n=8$. ANOVA de una vía con una $*p<0.05$. Se observa diferencias significativas en una disminución del orden 3 y 4 de los grupos asilado y táctil con respecto al control.

LONGITUD DENDRÍTICA DE LA CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA V

Los resultados en el parámetro de longitud dendrítica de la corteza media prefrontal capa V se observa cambios en el grupo táctil, respecto al grupo control.

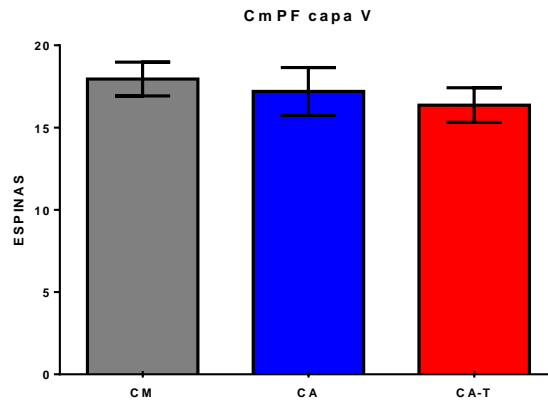


Gráfica 7. Longitud dendrítica CmPF c-V.

Longitud dendrítica de la corteza media prefrontal capa V al 14 DPN. Cada grupo con $n=8$. ANOVA de una vía con una $*p<0.05$. Se observa diferencia significativa en una disminución del grupo táctil respecto al control.

DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS DE LA CORTEZA MEDIA PREFRONTAL CAPA V

Los resultados en el parámetro de densidad de espinas dendríticas de la corteza media prefrontal capa V presenta algunas variaciones pero no son diferencias significativas en los grupos aislado y táctil, respecto al grupo control.



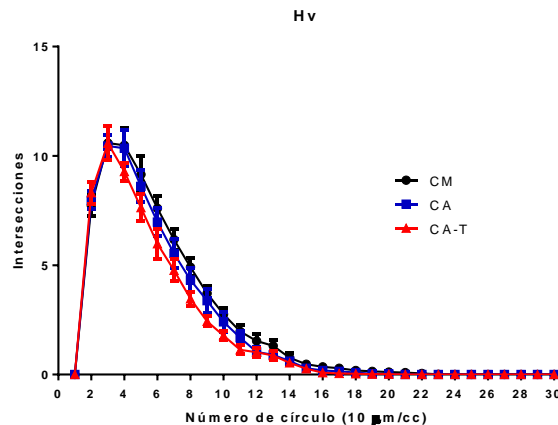
Gráfica 8. Densidad de espinas dendríticas CmPF c-V.

Densidad de espinas dendríticas de la corteza media prefrontal capa V al 14 DPN. Cada grupo con n= 8. ANOVA de una vía con una $*p<0.05$. No se observa diferencias significativas.

9.3 HIPOCAMPO VENTRAL

ARBORIZACIÓN DENDRÍTICA DEL HIPOCAMPO VENTRAL

Los resultados en el parámetro de arborización dendrítica del hipocampo ventral no se observa cambios en los grupos aislado y táctil, respecto al grupo control.

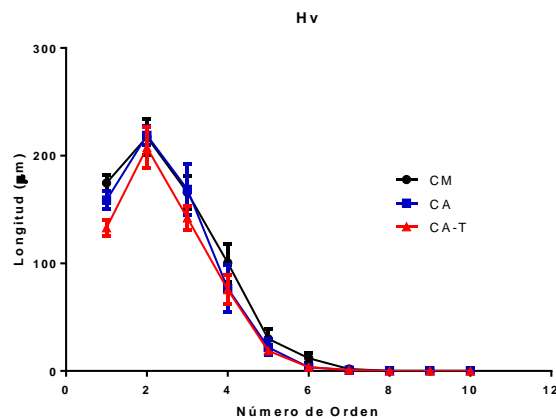


Gráfica 9. Arborización dendrítica Hv.

Arborización dendrítica de neuronas del hipocampo ventral al 14 DPN. Cada grupo con n= 8, ANOVA de una vía con una *p<0.05. No se observa diferencias significativas.

NÚMERO DE ORDEN DEL HIPOCAMPO VENTRAL

Los resultados en el parámetro de número de orden del hipocampo ventral no se observa cambios en los grupos aislado y táctil, respecto al grupo control.

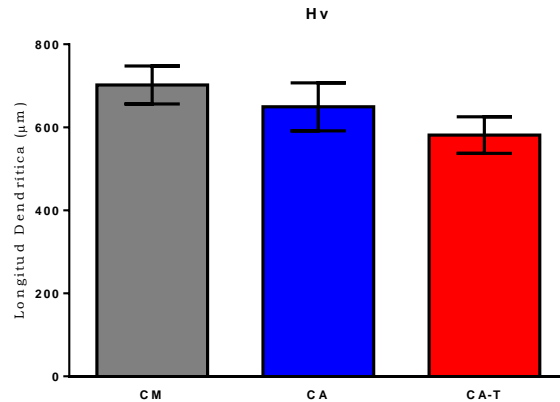


Gráfica 10. Número de orden Hv.

Número de orden del hipocampo ventral al 14 DPN. Cada grupo con n= 8. ANOVA de una vía con una *p<0.05. No se observa diferencias significativas.

LONGITUD DENDRÍTICA DEL HIPOCAMPO VENTRAL

Los resultados en el parámetro de longitud dendrítica del hipocampo ventral no se observa cambios en los grupos aislado y táctil, respecto al grupo control.

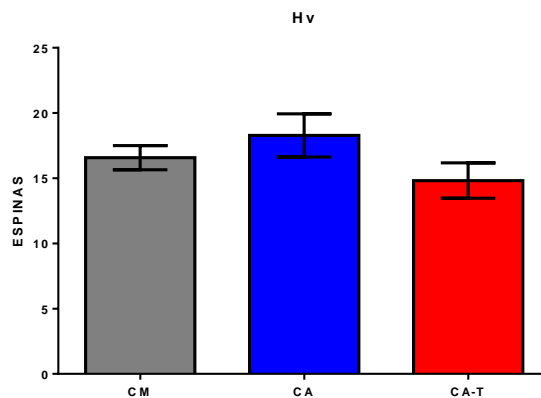


Gráfica 11. Longitud dendrítica Hv.

Longitud dendrítica del hipocampo ventral al 14 DPN. Cada grupo con n= 8. ANOVA de una vía con una *p<0.05. No se observa diferencias significativas.

DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS DEL HIPOCAMPO VENTRAL

Los resultados en el parámetro de densidad de espinas dendríticas del hipocampo central presentan algunas variaciones pero no son diferencias significativas en los grupos aislado y táctil, respecto al grupo control.



Gráfica 12. Densidad de espinas dendríticas Hv.

Densidad de espinas dendríticas del hipocampo ventral al 14 DPN. Cada grupo con n= 8. ANOVA de una vía con una *p<0.05. El valor del grupo CA es mayor que el CM, pero las diferencias no son significativas.

10. DISCUSION DE RESULTADOS

El propósito de este trabajo fue determinar si los efectos de los cuidados maternos durante los primeros 14 días de vida o posnatales (DPN) en ratas participaban en el desarrollo de la morfología dendrítica a nivel de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal capa III y V y el hipocampo ventral. Así como determinar si la privación materna total a través de la crianza artificial afectaba la morfología dendrítica de las anteriores áreas neurales. Además, evaluar si la estimulación táctil corporal a través de una brocha de cerdas finas durante la crianza artificial podía prevenir los posibles efectos negativos del aislamiento.

Este trabajo es parte de un proyecto grande cuyo objetivo principal es hacer un análisis sistematizado de la ontogenia de la morfología dendrítica de áreas neurales del sistema límbico, principalmente, durante todo el período postnatal pre-destete. Así que el objetivo principal del presente trabajo es determinar el efecto de la privación materna total a través de la crianza artificial sobre la morfología dendrítica en dos áreas neurales importantes del sistema límbico, así como el papel que juegan los estímulos táctiles corporales sobre dichos procesos plásticos.

El modelo animal de crianza artificial ha sido utilizado para probar la importancia de la conducta materna desplegada hacia las crías, así como los estímulos sensoriales, compañeros de camada, olor del nido, etc.

Durante las dos primeras semanas de vida (en la rata) el cuidado materno, así como otros factores extrínsecos, juega un papel importante en la maduración de algunos sustratos neuronales y/o neuroendocrinos como los que regulan el estrés (McCarthy y cols., 1997), la conducta materna (Coniglio y cols., 1973) y la conducta sexual masculina. Se ha propuesto para los tres casos anteriores que el lamido en la región perineal y corporal que la madre provee a las crías macho es el componente clave que modula dicha maduración postnatal (Melo y cols., 2013). Dentro del circuito neural que se ha propuesto (circuito maternal) que regula la conducta materna, se incluye al sistema límbico, entre los que se encuentra el hipocampo y la corteza media prefrontal, estructuras que están relacionadas con

el almacenamiento de la memoria y el aprendizaje, así como regulación del comportamiento emocional.

Champagne y cols. (2007) propuso que el cuidado materno (lamido-caricia) en la rata durante la infancia, influye a largo plazo en las respuestas ante el estrés y en procesos cognitivos de las crías. Han encontrado un árbol dendrítico corto y menor densidad de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo de las crías adultas con bajo cuidado materno respecto a los cuidados por su madre. Esto sugiere que los cuidados maternos pueden alterar, a largo plazo, el funcionamiento cognitivo óptimo. También se ha reportado disminución de la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la corteza media prefrontal capa III y del hipocampo en sujetos que padecieron esquizofrenia (Glantz y Lewis, 2000). Se ha reportado alteraciones en la morfología en neuronas piramidales de la corteza media prefrontal capa III debido a la privación materna del 1-14 DPN, durante dos horas diarias (Sánchez, 2008). Datos preliminares han mostrado los efectos de la crianza artificial al 7 DPN en NAcc sin encontrar alteraciones y en ABL en la que la estimulación corporal previene los efectos de aislamiento. También se evaluó al 21 DPN en hipocampo ventral e hipocampo dorsal, obteniendo resultados positivos al aplicar estimulación corporal. De los trabajos mostrados, sugiere que la condición de la desatención materna afecta la morfología dendrítica.

Un estudio de Meaney mostró que las crías de ratas muy cuidadas, presentaban un elevado nivel del receptor de glucocorticoides en hipotalámico y lóbulo frontal y ello terminaba traduciéndose en un menor nivel de factor liberador de corticotrofina en el hipotálamo, es decir, una menor respuesta endocrina al estrés (Kappeler L y Meaney MJ, 2010). Los glucocorticoides estimulan la formación del BDNF. Las neurotrofinas están relacionadas con la plasticidad cerebral.

En la rata, la mayoría de las neuronas se producen durante las dos primeras semanas de vida postnatal, coincidiendo con el periodo hiporesponsivo al estrés (Schlessinger y cols., 1975). Este se caracteriza por tener concentraciones basales bajas de glucocorticoides y una respuesta disminuida de la glándula suprarrenal al estrés. Pero algunos estresores como la separación maternal

prolongada pueden elevar las concentraciones de glucocorticoides aun durante el periodo hiporesponsivo (Levine, 1994).

Durante las primeras dos semanas el número de nuevas sinapsis se incrementa en forma exponencial en el período posnatal. La neurogénesis y la sinaptogénesis aumentan la posibilidad de modificación en la función cerebral, que depende de las primeras experiencias. Por el contrario, si la relación madre-hijo es deficiente, como sucede en la separación materna, se presentan fenómenos de poda neuronal, apoptosis e hiperactividad del eje HHA, relacionados con mayor vulnerabilidad al estrés, disminución de la respuesta inmunológica y presentación de cuadros de ansiedad y depresión, que a su vez incrementan la morbi-mortalidad.

Meaney evidencia que un entorno ambiental desfavorable puede tener un efecto positivo, a través del aumento de la resiliencia (capacidad de sobreponerse a situaciones adversas) del individuo; o bien negativo aumentando la vulnerabilidad del individuo, haciéndolo susceptible lo que resultará en daño cerebral (atrofia de las estructuras neurales con disminución de las arborizaciones y desarrollo de espinas dendríticas).

La forma, ramificación y extensión del árbol dendrítico, así como la cantidad de espinas dendríticas, son parámetros de la morfología neuronal que varían en torno a los cambios del medio (Fiala, 2008)

Los resultados morfológicos de hipocampo ventral de los parámetros analizados, longitud dendrítica total, arborización dendrítica, número máximo de orden y densidad de espinas dendríticas. Se encontró que no hay diferencias significativas en los grupos aislado y táctil respecto al criado por su madre.

En los resultados morfológicos de corteza media prefrontal capa III con los mismos parámetros analizados, los datos muestran que hay diferencias significativas en comparación con el grupo criado por su madre en los grupos aislado y táctil en longitud por número de orden. También una disminución sólo del táctil en arborización dendrítica y longitud dendrítica total.

En corteza media prefrontal capa V, las diferencias significativas comparadas con el grupo criado por su madre muestran disminución en longitud por número de

orden de los grupos aislado y táctil. Sólo hay disminución de longitud dendrítica total en el grupo táctil

En la mayoría de los datos muestran que no hay modificación significativa en la morfología neuronal en las áreas evaluadas y contrario a la información recopilada de trabajos realizados en adultos, en los que el aislado presenta tendencia negativa y el táctil revierte esos efectos, en este caso el grupo táctil muestra valores más negativos incluso que el aislado, esto contradice los datos esperados en la morfología neuronal. Existen algunas posibles explicaciones: 1) durante los primeros 14 días de vida las crías se encuentran dentro del periodo hiporesponsivo al estrés, por lo que su respuesta al estrés esta disminuida y a pesar de separarlos de su madre, sin embargo, se ha reportado que las crías aisladas dentro del sistema de crianza artificial no padecen de estrés crónico temprano (Lomanowska y Kraemer, 2011; Ver, Lomanowska y Melo, 2016), como ocurre con las crías sometidas a separación materna parcial (Sánchez, 2008), 2) debido a que éstas crías tienen suficiente BDNF como para contrarrestar el efecto del aislamiento sobre la plasticidad cerebral y así poder adaptarse a las circunstancias, 3) tienen sistemas muy activos como lo es la sinaptogénesis que ayuda al crecimiento de las ramificaciones dendríticas y la neurogénesis haciendo nuevas neuronas para compensar las que se estén perdiendo. Por otro lado, aunque no significativo, los datos provenientes del grupo de CA-Táctil muestran una tendencia negativa en ambas estructuras analizadas. Esto podría deberse a: 1) los estímulos táctiles que las crías reciben de la madre durante los primeros 14 DPN no son suficientes para ejercer una acción positiva sobre la morfología dendrítica y requieren de los estímulos agregada durante los siguientes 7 días, i.e., al destete (DPN 21), 2) quizá se requiera de mayor intensidad/frecuencia de estímulos táctiles durante este período para ejercer una acción positiva (7-8 veces al día??). Si se habla de la hipótesis de amnesia infantil quizás eso suceda en el modelo, debido a la alta neurogénesis se forman muchas neuronas y no se proyecta la diferencia de lo que se está perdiendo, pero las neuronas que sobrevivan a la poda neuronal, apoptosis, etc. Contendrán la información a largo

plazo, lo que pensando en el futuro, se pueden desarrollar enfermedades causadas por la alteración del sistema nervioso central.

Se ha mostrado la importancia que tiene el medio de desarrollo en la etapa infantil, ya que sí esta es desfavorable afecta a varios sistemas causando alteraciones a corto y largo plazo. Pero si durante esta etapa se compensa de otra forma (reemplazo de estímulos táctiles y/o sociales), se pueden prevenir los efectos negativos.

No se indica una comparación con algunos otros datos reportados ya que los trabajos en etapa infantil son escasos y morfología dendrítica en estas áreas a 14 DPN no hay reportes.

11. CONCLUSION

Los efectos de la separación materna total y crianza artificial al 14 DPN no modifican la citoarquitectura de las neuronas en Hipocampo ventral y Corteza media prefrontal capa III y V.

Al aplicar estimulación táctil corporal para revertir los efectos negativos, no hay modificación de la citoarquitectura en la etapa infantil.

La ausencia de cuidados maternos tiene efectos negativos detectados generalmente en la etapa adulta, pero estos pueden ser tratados desde la infancia para poder revertirlos y de ser posible anularlos.

Gracias a la importancia que se le ha dado a la etapa infantil hay varias investigaciones, pero aún falta mucho por investigar.

12. PERSPECTIVAS

- Análisis de hipocampo dorsal, amígdala, núcleo accumbens y área preóptica.
- Agregar otros grupos de estudio (Aislado-Estimulación anogenital y Aislado-Social).
- Evaluar morfología y conducta a animales con este protocolo a edades adultas

- Incrementar el número de crías del grupo CA-T. Los datos no son concluyentes.
- Con los datos obtenidos y la información que se adquiriera, en un futuro se debe hacer el diseño de tratamientos farmacológicos que sean eficaces en la mejora de la recuperación de la ausencia de los cuidados maternos

13. BIBLIOGRAFÍA

- Ader, R. y Grotta, L.J. (1969). Effects of early experience on adrenocortical reactivity. *Physiology and Behavior*. 4: 303–305.
- Aguilera, G., Subburaju, S., Young, S., Chen, J. (2008). The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Progress in Brain Research*. 170:29-39.
- Alberts, J. R. (1978). Huddling by rat pups: group behavioral mechanisms of temperature regulation and energy conservation. *J Comp Physiol Psychol*. 92(2): 231-45.
- Alvarado, J. R. (1994). A 120 años del método de Golgi. *MedULA*. 2: 3-4.
- Alvarez, V. A., Ridenour, D. A. y Sabatini, B. L. (2007). Distinct structural and ionotropic roles of NMDA receptors in controlling spine and synapse stability. *J Neurosci*. 27: 7365 – 7376 .
- Anderson, K. E. y Wagner, G. Physiology of penile erection. *Physiol Rev*. 1995; 75 (1): 191-236.
- Arellano, J. A. (2016). La crianza materna favorece el desarrollo neuronal en la rata al día 21 posnatal en hipocampo dorsal y ventral (Tesis de pregrado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Arias-Carrión, O., Olivares-Buñuelos, T. y Drucker-Colín, R. (2007). Neurogenesis in the adult brain. *Rev Neurol*. 44 (9):541-50.
- Bassani, S., Folci, A., Zapata, J. y Passafaro, M. (2013). AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cell Mol Life Sci*. 70(23):4411-30.
- Bloom, F. E., Battenberg, E. L., Rivier, J., Vale, W. (1982). Corticotropin releasing factor (CRF): immunoreactive neurones and fibers in rat hypothalamus. *Regulatory Peptides*. 4(1):43-48.
- Bock, J., Gruss, M., Becker, S. y Braun, K. (2005). Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. *Cerebral Cortex*. 15:802-8.
- Bowlby, J. (1954). Los efectos contraproducentes de la privación de los cuidados maternos. En su: *Los cuidados maternos y la salud mental*. Organización Mundial de la Salud serie de monografías. Washington, E.U.A. pp. 13-80.
- Bowlby, J. (1951). Maternal care and mental health. *Bull World Health Organ*. 3(3):355-533.
- Brake, W.G., Zhang, T.Y., Diorio J., Meaney, M.J. y Gratton, A. (2004). Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *European J Neurosci*. 19 (7):1863-74.
- Burton, C., Lovic, V. y Fleming, A. S. (2006). Early adversity alters attention and locomotion in adult Sprague-Dawley rats. *Behav Neurosci*. 120(3):665-75.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Darlene, F., Plotsky, P. M. y Meaney, M. J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *PNAS*. 95: 5335-5340.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Darlene, F., Plotsky, P.M. y Meaney M.J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *PNAS*. 95: 5335-5340.
- Carlson, P. J., Singh, J. B., Zarate, C. A., Drevets, W.C. y Manji, H.K. (2006). Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets. *NeuroRx*. 3(1):22-41.
- Chambers, R. A., Potenza, M. N., Hoffman, R. E. y Miranker, W. (2004). Simulated apoptosis/neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks. *Neuropsychopharmacology*. 29: 747–758.
- Champagne, F. A., Curley, J. P., Keverne, E. B. y Bateson, P. P. (2007). Natural variations in postpartum maternal care in inbred and outbred mice. *Physiol Behav*. 91(2-3): 325-334.
- Chancey, J. H., Adlaf, E. W., Sapp, M. C., Pugh, P. C., Wadiche, J. I. y Overstreet-Wadiche, L. S. (2013). GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons . *J Neurosci*. 33: 6614–6622.
- Colonnese, M. T., Kaminska, A., Minlebaev, M., Milh, M., Bloem, B, Lescure, S., Moriette, G., Chiron, C., Ben-Ari, Y. y Khazipov, R. (2010). A conserved switch in sensory processing prepares developing neocortex for vision. *Neuron*. 67: 480–498.
- Colorado R.A., Shumake J., Conejo N.M., Gonzalez-Pardo H. y Gonzalez-Lima F. (2006). Effects of maternal separation, early handling and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rat. *Behav Processes*. 71:51-58.
- Coniglio, L. P., Paup, D.C. y Clemens, L. G. (1973). Hormonal factors controlling the development of sexual behavior in the male golden hamster. *Physiology and Behavior*. 10(6):1087-1094.
- DeFelipe, J, Marco, P., Fairen, A. y Jones, E. G. (1997). Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. *Cereb*

Cortex. 7: 619–634.

- DeFelipe, J. y Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol.* 39(6):563-607.
- DeFelipe, J., Elston, G. N., Fujita, I., Fuster, J., Harrison, K. H., Hof, P. R., Kawaguchi, Y., Martin, K. A., Rockland, K. S., Thomson, A. M., Wang, S. S., White, E.L. y Yuste, R. (2002). Neocortical circuits: evolutionary aspects and specificity versus non-specificity of synaptic connections. Remarks, main conclusions and general comments and discussion. *J Neurocytol.* 31 (3-5):387-416.
- De Kloet, E. R., Vreugdenhil E., Oitzl M. S. y Joels, M. (1998). Brain Corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews.* 19 (3): 269-301.
- De Kloet, E. R., Joëls, M. y Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience.* 6: 463-475.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. y Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 4:1313–1317.
- Fanselow, M. S. y Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron.* 65(1):7-19.
- Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V. y Harris, K. M. (1998). Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci.* 18: 8900–8911.
- Fiala, J. C., Spacek, J. y Harris, K. M. (2008). Dendritic structure, Chapter 1. En: *Dendrites*, second edition. Greg Stuart. Oxford University Press. pp. 1-41.
- Fish, E. W., Shahrokh, D., Bagot, R., Caldji, C., Bredy, T., Szyf, M. y Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. *Ann N Y Acad Sci.* 1036:167-180.
- Fleming, AS, Vaccarino, F., Tambosso, L., y Chee, P. (1979). Vomeronasal y la modulación del sistema olfativo del comportamiento materno en la rata. *Ciencia.* 203: 327-337.
- Fleming, AS, y Rosenblatt, JS (1974). La regulación olfativa de la conducta materna en ratas: I. Efectos de la eliminación bulbo olfatorio en lactantes y en bicicleta hembras con y sin experiencia. *Revista de Fisiología Comparada.* 87: 221-232.
- Flores G, Wood G K, Liang J, Quirion R y Srivastava L K. (1996). Enhanced amphetamine sensitivity and increased expression of dopamine D2 receptors in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience.* 16: 7366-7375.
- Forero, J. (2005). Cuidados posnatales y neuroplasticidad cerebral. *Rev. Avances.* 6 (1): 168-175.
- Francis, D., Champagne, F., Liu, D. y Meaney, M.J. (1999). Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 896:66-84.
- Francis, D.D., Diorio, J., Plotsky, P.M. y Meaney, M.J. (2002). Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci.* 22:7840-7843.
- Freud S. 1900. *The interpretation of dreams.* Macmillan, New York, NY.
- Freud S. 1914. *Psychopathology of everyday life.* The Macmillan Company, New York, NY.
- Gibb, R. y Kolb, B. (1998). A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods.* 79: 1-4.
- Gonzalez, A., Lovic, V., Ward, G.R., Wainwright, P.E. y Fleming, A.S. (2001). Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. *Dev Psychobiol* 38: 11-32.
- Hall, WG (1975). El destete y el crecimiento de las criadas artificialmente ratas. *Ciencia.* 397: 726-735.
- Hsu F., Zhang G., Raol Y., Valentino R. y Coulter D. (2003). Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABA_A receptors and behavioral stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences(PNAS).* 100:12213-18.
- Josselyn, S. A. y Frankland, P. W. (2012). Infantile amnesia: neurogenic hypothesis. *Learning and Memory.* 19 (9):423-433.
- Juarez, I., Gratton, A. y Flores, G. (2008). Ontogeny of altered dendritic morphology in the rat prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens following Cesarean delivery and birth anoxia. *J Comp Neurol.* 507:1734-1747.
- Kalinichev, M., Easterling, K.W., Plotsky, P.M. y Holtzman, S.G. (2002). Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 73(1):131-40.
- Kappeler, L. y Meaney, M. J. (2010). Epigenetics and parental effects. *Bioassays.* 32 (9):818-827.
- Kehoe, P. y Bronzino, D.J. (1999). Neonatal stress alters LPT in freely moving male and female adult rats. *Hippocampus.* 9: 651-8.
- Kim, J. J. y Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews: Neuroscience.* 3: 453-462.
- Ladd, C.O., Huot, R.L., Thiruvikraman, K.V., Nemeroff, C.B. y Plotsky, P.M. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamopituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol. Psychiatry.* 55: 367-375.
- Lee, MHS, y Williams, DI (1974). Los cambios en el comportamiento de lamer siguientes manejo de los jóvenes. *Comportamiento de los animales.* 2: 2679-2681.
- Leigh, H., y Hofer, M. (1973). Efectos fisiológicos y de comportamiento de la eliminación de la misma camada en la única de las crías y madres que quedan en el período pre-destete en ratas. *Psicosomática.* 35: 497-508.
- Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. y Khazipov, R. (1997). Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA_A and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron.* 18: 243–255.

- Levine, S., Berkenbosch, F., Suchecki, D. y Tilders, F.J. (1994). Pituitary-adrenal and interleukin-6 responses to recombinant interleukin-1 in neonatal rats. *Psychoneuroendocrinology*. 19(2):143-53.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. y Meaney, M.J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 277: 1659-1662.
- Lohmann, C y Kessels, H. W. (2014). The developmental stages of synaptic plasticity. *J Physiol*. 592 (1):13-31.
- Lomanowska, A. M., Chatterjee-Chakraborty, M., Steiner, M. y Kraemer, G. W. (2011). Effects of motherless rearing on basal and stress-induced corticosterone secretion in rat pups. *Stress*, 14: 685-696.
- Lomanowska, A. M., Chatterjee, M., Steiner, M. y Kraemer GW. (2011). Effects of motherless rearing on basal and stress-induced corticosterone secretion in rat pups. *Stress*. 14(6):685-696.
- Lomanowska, A. M. y Melo, A. I. (2016). Deconstructing the function of maternal stimulation in offspring development: Insights from the artificial rearing model in rats. *Horm Behav*. 77: 224-236.
- Lovic, V. y Fleming, A. S. (2004). Artificially-reared female rats show reduced prepulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task--reversal of effects with maternal-like licking stimulation. *Behav Brain Res*. 148 (1-2):209-19.
- McCarthy, M. M., Besmer, H. R., Jacobs, S. C. y Gibbs, R. B. (1997). Influence of maternal grooming, sex and age on Fos immunoreactivity in the preoptic area of neonatal: implications for sexual differentiation. *Development Neuroscience*. 19 (6): 488-496
- Malenka, R. C. y Nicoll, R. A. (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci*. 16: 521 – 527 .
- Markram, K. y Markram, H. (2010). The intense world theory - a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front Hum Neurosci*. 4: 224.
- Martínez, M. R. I. (2009). Efectos del aislamiento social sobre la morfología neuronal de Corteza prefrontal, Núcleo Accumbens e Hipocampo en etapas críticas del desarrollo en la rata Sprague Dawley (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.
- Meaney, M.J., Tannenbaum, B., Francis, D., Bhatnagar, S., Shanks, N., Viau, V., O'Donnell, D., Plotsky, P.M. (1994). Early environmental programming hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *The Neurosciences*. 6: 247-259.
- Melo, A. I., Aguilar, C., Toriz, C. G. y Flores, M. (2013). Participación de la experiencia temprana sobre el desarrollo de la conducta sexual masculina en la rata. En su: *Biología celular y molecular de las conductas reproductivas*. Universidad de Tlaxcala. Tlaxcala, México. pp. 89-108.
- Melo, A. I., Toriz, C., Martínez, A., Flores, M., Aguilar, C., Corona, F. y Hoffman, K. (2013). Participación de la prolactina de la leche materna durante el periodo posnatal temprano sobre el desarrollo de la progenie de la rata. En su: *Biología celular y molecular de las conductas reproductivas*. Universidad de Tlaxcala. Tlaxcala, México. pp. 111-125.
- Melo, A. I. y Fleming, A. S. (2006). La conducta materna como modelo para estudiar el desarrollo del sistema nervioso. *Revista Cinvestav*. 1(3), 10-15.
- Melo, A. I., Lovic, V., González, A., Madden, M., Sinopoli, K. y Fleming, A. S. (2006). Maternal and littermate deprivation disrupts maternal behavior and social-learning of food preference in adulthood: Tactile stimulation, nest odor, and social rearing prevent these effects. *Developmental Psychobiology*. 48: 209-219.
- Melo, A. I., Toriz, C. y Kinsley, C. (2013). Regulación hormonal, sensorial y social de la conducta materna en mamíferos: Efectos sobre la madre y sobre el desarrollo de la progenie. Curso Pre-congreso AIBIR. *Procesos fisiológicos, Conductuales y Toxicológicos de la Reproducción*. Pp 38.
- Monroy, E., Hernández-Torres, E. y Flores, G. (2010). Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *J Chem Neuroanat*. 40(2):93-101.
- Moore, C. L. (1982). Maternal behavior in rats is affected by hormonal condition of pups. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 96: 123-129.
- Moore, C. L. (1988). Maternal and self-grooming in Norway rats. Mechanisms and consequences of dissociable components. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 525: 425-427.
- Moore, C. L. y Morelli, G. A. (1979). Mother rats interact differently with male and female offspring. *J Comp Physiol Psychol*. 93: 677-684.
- Moore, CL (1984). Contribución materna para el desarrollo de la conducta sexual masculina en ratas de laboratorio. *Psicobiología del Desarrollo*. 17: 347-356.
- Morgane, P. J., Galler, J. R. y Mokler, D.J. (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol*. 75(2):143-60.
- Nishi, M., Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T. y Matsunaga W. (2013). Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents. *Gen Comp Endocrinol*. 181:306-9.
- Paxinos G. y Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. Fourth edition.
- Poehlmann, J., Schwichtenberg, A. J., Schlafer, R. J., Hahn, E., Bianchi, J. P., y Warner, R. (2011). Emerging self-regulation in toddlers born preterm or low birth weight: differential susceptibility to parenting?. *Dev Psychopathol*. 23(1):177-193.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarna, M. y Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*. 397: 251-255.
- Rivier, C. y Vale, W. (1983). Modulation of stress-induced ACTH release by CRF, catecholamines, and vasopressin. *Nature* 305 (5932): 325-327.
- Roceri, M., Cirulli, F., Pessina, C., Peretto, P., Racagni, G. y Riva, M.A. (2004). Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry*. 55: 708-14.
- Sánchez, K. D. (2016). Efecto de la crianza artificial al DP 7 sobre la morfología del NAcc y ABL en la rata (Tesis de pregrado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Sánchez, O. C. P. (2008). *Efecto de la privación materna neonatal sobre la densidad de espinas dendríticas de las*

neuronas de la corteza media prefrontal y del hipocampo de rata adulta (Tesis de pregrado). ENCB-IPN, México, D.F.

- Sapolsky, Walker, C. D., R.M., Meaney, M.J., Vale, W.W. y Rivier C. L. (1986). Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat. *Endocrinology*. 119(4):1816-21.
- Schapiro, PIRO S. (1962). Pituitary ACTH and compensatory adrenal hypertrophy in stress-non-responsive infant rats. *Endocrinology*. 71:986-9.
- Schelling, G. (2004). Stress doses of hydrocortisone, traumatic memories, and symptoms of posttraumatic stress disorder in patients after cardiac surgery: a randomized study. *Biological Psychiatry*. 55: 627–633.
- Schlessinger, A.R., Cowan, W.M. y Gottlieb, D.I. (1975). An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol*. 159 (2):149-75.
- Sesack, S. R., Deutch, A. Y., Roth, R. H. Y Bunney BS. (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol*. 290 (2): 213-42.
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices on the cat. *J Anat*. 87: 387- 406.
- Sia, G. M., Beique, J. C., Rumbaugh, G., Cho, R., Worley, P. F. y Haganir, R. L. (2007). Interaction of the N-terminal domain of the AMPA receptor GluR4 subunit with the neuronal pentraxin NP1 mediates GluR4 synaptic recruitment. *Neuron*. 55: 87–102.
- Smart, J. L., Stephens, D. N. y Katz, H. B. (1983). Growth and development of rats artificially reared on a high or a low plane of nutrition. *Br J Nutr*. 49:497-506.
- Solis, O., Limón, D. I., Flores, J. y Flores, G. (2007). Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse*. 61(6):450-8.
- Song, C. y Leonard, B. E. (2005). The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 627–647
- Sorra, K. E. y Harris, K. M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*. 10: 501—511.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci*. 9(3):206-21.
- Stephens, B., Mueller, A. J., Shering, A. F., Hood, S. H., Taggart, P., Arbutnott, G. W., Bell, J. E., Kilford, L., Kingsbury, A. E., Daniel, S. E. y Ingham, C. A. (2005). Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 132: 741-754.
- Swanson L.W., McKellar S. (1979). The distribution of oxytocin-and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey, *J Comp Neurol*. 188: 87-106.
- Swenson, A. J., & Louis, E. K. S. (2006). Computed tomography findings in thiamine deficiency induced coma. *Neurocritical Care*. 5(1): 45-48.
- Thierry, A. M., Gioanni, Y., Dégénétais, E. y Glowinski, J. (2000). Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*. 10: 411-419.
- Travaglia, A., Bisaz, R., Sweet, E. S., Blitzler, R. D. y Alberini, C. M. (2016). Infantile amnesia reflects a developmental critical period for hippocampal learning. *Nature Neuroscience* 19(9):1225-33.
- Ugarte, A., Cortés, M. C., Eguibar, J. R. y Melo, A. I. (2013). La conducta materna: efectos sobre el cerebro materno y sobre el desarrollo de la progenie. En su: *Biología celular y molecular de las conductas reproductivas*. Universidad de Tlaxcala. Tlaxcala, México. pp. 137-173.
- Vázquez, B. P.E. (2008). Proyecciones de la corteza prefrontal a los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo: vías y receptores implicados. Tesis Doctoral, U.B., Barcelona, España, pp.1-9.
- Vega, E., Gómez, M. de J. y Flores, G. (2004). Alteration in dendritic morphology of pyramidal neurons from the prefrontal cortex of rats with renovascular hypertension. *Brain Res*. 1021(1):112-8.
- Weaver, I., Cervoni, N., Champagne, F., D'Alessio, A., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M. y Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*. 7 (8): 847 -854.
- Witter, M. P., & Amaral, D. G. (2004). Hippocampal Formation. En G. Paxinos, *The rat nervous system* (pags. 636-637). San Diego: Elsevier Academic Press.
- Zandio, M., Ferrín, M. y Cuesta, M. J. (2002). Neurobiology of depression. *An Sist Sanit Navar*. 25(3): 43-62.
- Zou B., Golarai G., Connor J. y Tang A. (2001). Neonatal exposure to a novel environment enhances the effects of corticosterone on neuronal excitability and plasticity in adult hippocampus. *Developmental Brain Research*. 130:1-7.