

Tesis Doctoral

Malnutrición proteica como modelo de adversidad perinatal y su influencia sobre el desarrollo de capacidades cognitivas y socioemocionales

Belluscio, Laura María

2014

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Belluscio, Laura María. (2014). Malnutrición proteica como modelo de adversidad perinatal y su influencia sobre el desarrollo de capacidades cognitivas y socioemocionales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Belluscio, Laura María. "Malnutrición proteica como modelo de adversidad perinatal y su influencia sobre el desarrollo de capacidades cognitivas y socioemocionales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento de Química Biológica

**Malnutrición proteica como modelo de adversidad
perinatal y su influencia sobre el desarrollo de capacidades
cognitivas y socioemotivas.**

Tesis presentada para optar el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Lic. Laura María Belluscio

Director de Tesis: Eduardo Tomás Cánepa

Consejero de Estudios: Eduardo Tomás Cánepa

**Lugar de Trabajo: Departamento de Química Biológica,
FCEyN, UBA**

Malnutrición proteica como modelo de adversidad perinatal y su influencia sobre el desarrollo de capacidades cognitivas y socioemocivas.

El desarrollo perinatal representa un período crítico en la vida de un individuo caracterizado por una sensibilidad extrema a experiencias e interacciones con el medio ambiente que originan efectos duraderos, y muchas veces permanentes, sobre la estructura y función del cerebro. La calidad del período embrionario como la calidad del ambiente y experiencias postnatales tempranas tienen una enorme influencia sobre el desarrollo emocional y cognitivo con consecuencias que se extienden durante toda la vida.

Una de las causas más difundidas entre la población mundial y con consecuencias más deletéreas sobre el desarrollo y la plasticidad neuronal es la que proviene de la desnutrición o la malnutrición. Esta provoca, según su severidad, desde problemas y retardos en el aprendizaje hasta retrasos mentales con profundas consecuencias en la sociabilidad del sujeto a lo largo de toda su vida.

Los modelos en roedores han demostrado ser útiles ya que se observaron alteraciones neuroanatómicas comparables y deficiencias similares en las capacidades de aprendizaje y memoria(1). Estas evidencias convergentes sugieren una relación causal entre malnutrición proteica y alteraciones neurofisiológicas.

Sin embargo, y pese a los avances realizados al respecto en los últimos años, diversos interrogantes permanecen aún sin respuesta. Algunas de estas cuestiones abiertas se refieren a cuáles son las alteraciones conductuales y cognitivas afectadas por la malnutrición en la etapa perinatal, si las deficiencias observadas presentan dimorfismo sexual, cuáles son los mecanismos moleculares que median los efectos permanentes de la malnutrición en etapas tempranas de la vida y si los efectos observados son transmitidos a las siguientes generaciones que no hayan sido sometidas a esta adversidad perinatal.

En este trabajo de tesis nos centramos en el establecimiento de un modelo de malnutrición proteica perinatal en ratones, estudiando el efecto sobre el comportamiento de las crías a diferentes edades, con el fin de dilucidar si las diferencias encontradas en la bibliografía se debían a la edad a la que se realizaron los estudios. Además se trabajó con crías machos y hembras con el objeto de identificar posibles efectos diferenciales de la dieta de acuerdo al sexo.

Nuestra evaluación inicial del desarrollo morfológico y neurológico de las crías reveló un claro retraso en el grupo cuyas madres sufrieron una reducción del 55% en el contenido proteico de la dieta. Estas últimas sufrieron una alteración en su comportamiento tanto en lo referido al cuidado dedicado a las crías como en la presencia de un comportamiento de tipo ansioso.

Este comportamiento de tipo ansioso también fue observado en las crías mediante los test de laberinto elevado en cruz y de campo abierto, junto con una menor motivación exploratoria revelada por el test de escape de la jaula.

En relación a las capacidades cognitivas de las crías se encontró un defecto en la memoria declarativa de largo término y la memoria espacial de corto término solamente en machos. En hembras se evidenció además un mayor componente de comportamiento tipo depresivo, que no fue observado en machos.

Con el fin de develar las bases moleculares de los defectos observados, realizamos un análisis de la expresión de génica y de los niveles de modificaciones epigenéticas, a diferentes edades en ambos sexos. Encontrando una disminución en la cantidad de mensajero de la neurotrofina BDNF y una acetilación diferencial global de las histonas 3 y 4. Este hallazgo resulta interesante debido a que está ampliamente documentado que BDNF es fundamental para el desarrollo del sistema nervioso y cumple diversos roles en procesos de aprendizaje y memoria. Además se ha visto que su expresión se encontraba disminuida en ratones que sufrieron de un estrés perinatal (como períodos de separación materna), y en modelos de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Por otro lado, la expresión de este gen es finamente regulada a través de diversas modificaciones epigenéticas por lo que es sensible a factores ambientales. En nuestro modelo, la acetilación anormal observada en ratones malnutridos perinatalmente podría producir un desbalance general en la expresión de diversos genes que podría llevar a una menor expresión de BDNF. Ambas alteraciones moleculares observadas podrían formar parte de los mecanismos moleculares causantes de las deficiencias cognitivas y conductuales observados.

Finalmente, los diferentes niveles de acetilación observados, posibilitarían la herencia de las diferencias observadas a una generación sucesiva que nunca fue expuesta a este tipo de malnutrición. Un estudio preliminar realizado a partir de la descendencia de ratones que sufrieron de una malnutrición hipoproteica perinatal, mostró una tendencia hacia un retraso en el desarrollo de estas crías y a una alteración en la conducta motivacional, tal como se había visto en sus progenitores.

En resumen, los resultados aquí presentados demostraron que una malnutrición materna durante una etapa perinatal afecta la maduración del sistema nervioso, provocando cambios que perduran a lo largo de la vida, más allá del tiempo de exposición a la dieta deficiente. Estos cambios se pueden observar a nivel molecular y en un amplio rango de comportamientos. Cabe destacar también que el trabajo de la presente tesis permitió establecer dicho modelo de estrés perinatal, el cual servirá de base para futuros estudios en el laboratorio y que podrá utilizarse para generar y responder numerosas preguntas.

Protein malnutrition as a model of perinatal adversity and its influence on the development of cognitive and socioemotional skills

Perinatal development represents a critical period in the life of an individual. It is characterized by extreme sensitivity to experiences and environmental interactions which may cause lasting and often permanent changes in brain's structure and function. The quality of the embryonic period as the quality of the environment and early postnatal experiences, have a huge influence on emotional and cognitive development with consequences that extend throughout life.

A common cause of poor development that has deep deleterious effects on brain's growth and plasticity is that which comes from under nutrition or malnutrition. This provokes from problems and delays in learning to mental retardation with profound consequences for the sociability of the subject throughout his life.

Rodents have proven useful as a model as they mimic the neuroanatomical disturbances and the learning and memory deficiencies observed in humans. These multiple evidences point to a causal relationship between protein malnutrition and neurophysiological alterations.

However, despite the progress made in recent years in this regard, many questions remain unanswered. Some of these open questions concern which are the behavioral and cognitive alterations affected by malnutrition in the perinatal period, if these deficiencies are sexually dimorphic, which are the molecular mechanisms that mediate the permanent effects of malnutrition in early stages of life and whether the observed effects are transmitted to subsequent generations that have not been subjected to perinatal adversity.

During this thesis we focused on the establishment of a perinatal protein malnutrition (pregnancy and lactation) model in mice, and studied the effect on the offspring behavior at different ages, in order to determine whether the differences found in the literature were due to the age at which the studies were conducted. We analyzed male and female offspring in order to identify possible differential effects of diet according to sex.

Our initial evaluation of the offspring morphological and neurological development revealed a clear delay in the group whose mothers experienced a 55% reduction in the

protein content of the diet. The latter suffered an alteration in their behavior both in terms of the care dedicated to the pups and in the presence of an anxiety-like behaviour.

This anxiety-like behaviour was also observed in the offspring through the elevated plus maze and open field tests, along with a smaller exploratory motivation revealed by the cage escape test.

We also found a defect in long-term declarative memory and spatial short-term memory, restricted to male individuals of the offspring. There was also evidence of a depression-like behaviour restricted to females.

In order to unravel the molecular basis of the defects observed we analyzed gene expression and epigenetic modifications levels at different ages in both sexes. We found reduced BDNF mRNA levels and a differential global acetylation of histones 3 and 4. This is an interesting finding because it has been extensively reported that BDNF is crucial for brain development and has different roles in memory and learning. A reduced expression of BDNF has also been described in mice that had suffered from maternal separation during lactation, and for several neurological and psychiatric diseases models. Furthermore, BDNF expression is tightly regulated by epigenetic modifications so it is sensitive to environmental factors. In our model, the abnormal acetylation observed in perinatally malnourished mice could produce an overall imbalance in the expression of various genes that could lead to a lower expression of BDNF. Together, these molecular alterations could be part of the molecular mechanisms causing the cognitive and behavioral deficits observed.

Finally, the different levels of acetylation observed would enable the inheritance of the observed differences to a later generation that was never exposed to this type of malnutrition. A preliminary study from the offspring of mice who suffered perinatal low-protein malnutrition, showed a trend towards a delay in the development of these offspring and an alteration in motivational behavior, as was seen in their parents.

In summary, the results presented here demonstrate that the quality of maternal nutrition during the perinatal stage affect maturation of the nervous system and causes changes that persist throughout life, even long after the exposure to the poor diet. These changes can be observed at the molecular level and in a wide range of behaviors. It is also noteworthy that the work of this thesis allowed us to establish a model of perinatal stress, which will be the basis for future studies in the laboratory and can be used to generate and answer many questions.

Agradecimientos:

En primer lugar, antes que nada, a Edu. Por confiar en mí cuando más lo necesité, sin él esta tesis no hubiera sido posible. Por todas las peleas, los debates, y sobre todo por el apoyo incondicional.

A mi familia. A mi mamá y mi hermana que me convirtieron en la persona que soy, y por ayudarme siempre a levantarme. A mi sobrino, por ser sobrino, tan lindo y tan buen argumentador que da miedo. A mi papá por enseñarme, con los pros y contras que eso conlleva, a buscar siempre más.

A la Silvi, Reina en nuestros corazones de QB, por su amistad, su paciencia, el cariño, la oreja, por no dejarme caer en la desesperación, la bomba, la cerveza, los cánticos e infinitas cosas más. A vos Silvi divine, un espacio especial (a que no lo puedo decir de una), entre los agradecimientos.

A Brunito querido, que sin él tampoco habría tesis. Por compartir la enorme carga de las horas de bioterio, por su delicado sentido del humor que nunca dejará de sorprenderme y su siempre excelente disposición.

A Nadina, otra del grupo del delicado sentido del humor, por ser tan buena compañera y tener siempre una sonrisa para dar. También por su gran ayuda con las espinas demoníacas, que no se hubieran hecho sin ella.

A la bella bella Dani, por compartir la carga de la mesada y por estar siempre dispuesta a dar una mano. Por tener una personalidad que admiro mucho y a ver si se me pega un poquito...

A Nico, por los mates de cada mañana, de valor infinito para arrancar la mañana, junto con esos diez minutos de conversación que te marcan el día. Siempre dispuesto a dar una mano en absolutamente todo, y si no sabe, lo busca.

A Lu, por dulce, por el excelente compañerismo y disposición para dar una mano en todo. Por siempre saber como hacer las cosas de la forma correcta. A Juli, por su amistad y por la música en el laboratorio. A Flopy, por enseñarme varias cosas del laboratorio apenas arranqué, su buen espíritu y simpatía interminable. A Marie divine, por hacerme siempre reír y que todo siempre sea un poco más divertido.

A Octa y Marie, los nuevos y excelentísimos compañeros del labo. A Octa muchas gracias por la realización del seguimiento de la segunda generación junto con la Silvi. A Marie muchas gracias por todo lo que me va a enseñar.

A los amigos de siempre. A Flora compañera de interminables aventuras y por ahorrarme infinita plata en terapia. Por muchas experiencias más. A Arielito, mi antiguo carne y uña, compañero de gran parte de la carrera y de una etapa fundamental de mi vida. A Dami, amigo de toda la carrera, por sus opiniones honestas en todo y por compartir el gusto por lo bizarro. A Pepo, el artista que todo grupo necesita, un lindo dulce que hace que todo sea un poco más bello. A los padres Lipper, por cuidarme tanto y tanto cariño.

A los nuevos amigos, con los que descubrí una nueva vida que me enseñó que hay cosas más importantes que la carrera. Lean, Max y Guille, excelentísimos caballeros de los que aprendí y sigo aprendiendo un montón de cosas. Por los viajes, por los gustos compartidos en escalada y otras nerdeadas. A Clau, nuevísima amiga, por su honestidad, amistad e incondicionalidad. A Jor y Lau por llevar la conversación siempre a lugares menos nerds.

Y especialmente a Charly, por todo lo que me enseñó y con quien tuve la suerte de vivir muchos momentos lindos.

A nuestros compañeros de sala de comportamiento, por todo lo que me enseñaron.

A mucha gente que me enseñó todo lo que necesitaba para poder seguir con esta tesis. A la gente del grupo de Flavia Saravia, a Juan, Flavia y Patricio por la ayuda con el vibrátomo y el microscopio. A Charly por ser mi salvador estadístico y a todos por aceptar a la vecina molesta que pide todo el tiempo cosas.

A la gente del bioterio un lugar especial. A Sabrina y Ale por siempre dar una mano con todo. Y especialmente a Ayelén por su amistad durante esas eternas guardias de los fines de semana, y por lo mates, la infinidad de mates, gracias.

A Euge del grupo de Uchitel, por su ayuda con las fijaciones y los cortes, fundamentalísima para esta tesis. Y a Vero de la Fuente y Arturo Romano por su ayuda con el Fear Conditioning.

A Ale y a su familia, que fueron claves en un momento en que mi vida cambió de rumbo.

Al departamento de Química Biológica por darme un lugar de trabajo. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET, por hacer posible el trabajo de esta tesis. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA por formarme como bióloga y como persona.

A mi mamá

Índice:

Abreviaturas:	- 1 -
<i>Introducción</i>	- 3 -
1. Estrés perinatal y su efecto sobre el desarrollo del sistema nervioso.	5
1.1. Estrés prenatal.	6
1.2. Estrés posnatal.	7
1.3. Estrés perinatal en humanos.	8
1.4. Influencia del comportamiento materno.	10
1.5. Efectos diferenciales del estrés perinatal de acuerdo al sexo.	11
2. Malnutrición.	12
2.1. La nutrición como problemática social.	13
2.2. Malnutrición proteica.	14
2.3. Malnutrición proteica en modelos animales.	15
3. Plasticidad Neuronal.	17
3.1. Neurogénesis y apoptosis.	17
3.1.1. Neurogénesis.	17
3.1.2. Apoptosis.	18
3.2. Modelado de espinas dendríticas.	19
4. Expresión Génica, Desarrollo y Plasticidad.	20
4.1. Neurotrofinas.	20
4.2. Genes de expresión temprana.	21
4.3. Mecanismos epigenéticos.	21
5. Comportamiento y cognición.	22
6. Plasticidad y recuperación.	25
7. Mecanismos de Heredabilidad.	26
<i>Objetivos e Hipótesis</i>	- 28 -
Objetivos:	- 29 -
Hipótesis	- 30 -
<i>Resultados</i>	- 31 -
1. Establecimiento del modelo de malnutrición proteica: Colonia e hipoproteicidad.	- 32 -
1.1. Utilización de la cepa C57BL/6J.	- 32 -
1.2. Utilización de la colonia CF-1 y elección del porcentaje de proteínas de la dieta.	- 33 -

2. Caracterización de la F0. Cambios físicos. Fecundidad y comportamiento materno.		- 34 -
2.1. Variación en el peso corporal de las madres durante la preñez y la lactancia.	_____	- 34 -
2.2. Fecundidad de la F0.	_____	- 35 -
2.3. Comportamiento materno.	_____	- 36 -
2.3.1. Cuidado de las crías.	_____	- 36 -
2.3.2. Madres HP presentan un comportamiento de tipo ansioso.	_____	- 37 -
3. Crías de madres hipoproteicas presentan un retraso en el desarrollo físico y neurológico.		- 39 -
3.1. Evaluación del desarrollo físico.	_____	- 39 -
3.2. Desarrollo neurológico.	_____	- 42 -
4. Evaluación de distintos aspectos comportamentales de la F1.		- 45 -
4.1. Características sociales de la F1.	_____	- 45 -
4.1.1. Juegos juveniles.	_____	- 45 -
4.1.2. Interacción social.	_____	- 49 -
4.1.3. Dominancia social.	_____	- 49 -
4.2. Estudio del nivel de motivación exploratoria de la F1.	_____	- 50 -
4.3. Crías malnutridas perinatalmente poseen un comportamiento de tipo ansioso.	_____	- 51 -
4.3.1. Test de campo abierto.	_____	- 51 -
4.3.2. Laberinto elevado en cruz	_____	- 53 -
4.4. Hembras malnutridas perinatalmente presentaron un comportamiento de tipo depresivo medido por el test de suspensión por la cola.	_____	- 55 -
5. Evaluación de diversas características cognitivas en la F1.		- 55 -
5.1. Aprendizaje espacial.	_____	- 56 -
5.1.2. Alternancia espontánea en el laberinto en Y.	_____	- 56 -
5.1.2. Aprendizaje espacial. Memoria de corto término.	_____	- 56 -
5.2. Memoria declarativa. Reconocimiento de un objeto novedoso.	_____	- 58 -
5.2.1. Memoria de largo término.	_____	- 59 -
5.2.2. Memoria de trabajo y preferencia exploratoria.	_____	- 60 -
5.3. Condicionamiento de miedo.	_____	- 61 -
6. Estudios de los efectos de la malnutrición proteica sobre el número de neuronas hipocampales y sus sinapsis.		- 63 -
6.1. Crías hipoproteicas poseen una menor densidad de neuronas diferenciadas en distintas zonas del hipocampo.	_____	- 63 -
6.2. Determinación de la densidad de espinas dendríticas.	_____	- 65 -
7. Estudio de la expresión génica en el modelo de malnutrición perinatal.		- 67 -
7.1. Neurotrofinas y sus receptores.	_____	- 67 -
7.2. Genes inmediatos tempranos.	_____	- 69 -

7.3. Otros genes relacionados con cognición. _____	- 72 -
7.4. Influencia de la dieta materna durante el desarrollo sobre el estado epigenético de la cromatina. _____	- 75 -
8. Efectos transgeneracionales de la malnutrición proteica. _____	- 78 -
8.1. Desarrollo físico y neurológico. _____	- 78 -
8.2. Estudios comportamentales en la F2. _____	- 82 -
8.2.1. Las crías CP y HP de la F2 no presentan diferencias en el comportamiento de tipo ansioso. _____	- 83 -
8.2.2. Las hembras HP poseen una menor motivación exploratoria. _____	- 83 -
8.2.3. Los machos HP presentan un mayor componente de tipo depresivo en su comportamiento. _____	- 84 -
Discusión _____	- 86 -
Materiales y Métodos _____	101
1. Animales y dietas. _____	102
2. Evaluación del desarrollo. _____	103
2.1. Desarrollo físico. _____	103
2.2. Desarrollo neurológico. _____	104
3. Observaciones y test comportamentales. _____	105
3.1. Comportamiento materno. _____	105
3.2. Test comportamentales en la F1. _____	105
3.2.1. Juego juvenil. _____	106
3.2.2. Interacción social. _____	107
3.2.3. Dominancia social. _____	108
3.2.4. Laberinto elevado en cruz. _____	108
3.2.5. Campo abierto. _____	109
3.2.6. Escape de la jaula. _____	110
3.2.7. Test de suspensión por la cola. _____	110
3.2.8. Laberinto en Y. Alternancia espontánea. _____	111
3.2.9. Laberinto en Y. Testeo con clave. _____	112
3.2.10. Reconocimiento del objeto novedoso. _____	113
3.2.10.1. Testeo de memoria de corto término. _____	113
3.2.10.2. Testeo de memoria de largo término. _____	114
3.2.11. Condicionamiento del miedo. _____	114
4. Análisis de la expresión génica. _____	115
4.1. Extracción de corteza e hipocampo. _____	115
4.2. Análisis de ARNm por RT-PCR. _____	115
4.2.1. Extracción de ARN. _____	115

4.2.2. Síntesis de cDNA. _____	116
4.2.3. PCR semi-cuantitativa. _____	117
4.2.4. Electroforesis en gel de agarosa. _____	118
4.3. Análisis de proteínas por western blot. _____	119
4.3.1. Extracción de proteínas. _____	119
4.3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida. _____	119
4.3.3. Transferencia a membrana. _____	119
4.3.4. Detección de proteínas. _____	120
5. Análisis histológicos. _____	121
5.1. Obtención de cortes de cerebro. _____	121
5.2. Inmunofluorescencia. _____	121
5.3. Tinción de Nissl. _____	122
5.3. Tinción de Golgi-Cox. _____	123
6. Análisis estadístico. _____	123
<i>Bibliografía</i> _____	125

Abreviaturas:

ACTH: Adrenocorticotropina, hormona polipeptídica producida por la hipófisis. Componente importante de la regulación del eje HPA.

BDNF: Neurotrofina de la familia de NGF. Por sus siglas en inglés *brain derived neurotrophic factor*.

CP: Dieta con niveles normales (control) de proteínas. El grupo CP puede referirse a la F0 que fue alimentada con esta dieta, a la F1 que estuvo en contacto con la misma durante la preñez y la lactancia, o a la F2, que nunca recibió este alimento.

CDK5: Quinsa dependiente de ciclina 5.

CRH: Hormona liberadora de corticotropina. Sintetizada por el hipotálamo, regula la secreción de ACTH.

H3: Histona 3.

H3ac: Histona 3 acetilada.

H4: Histona 4.

H4ac: Histona 4 acetilada.

HP: Dieta con niveles bajos (hipoproteica) de proteínas. El grupo HP puede referirse a la F0 que fue alimentada con esta dieta, a la F1 que estuvo en contacto con la misma durante la preñez y la lactancia, o a la F2, que nunca recibió este alimento.

HPA: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

LG: Comportamiento de acicalado de las crías por parte de las madres. Por sus siglas en inglés *licking and grooming*.

NGF: Proteína pequeña secretada de la familia de las neurotrofinas. Por sus siglas en inglés *nerve growth factor*.

Introducción

El período perinatal es un momento crítico en la vida de los individuos, donde se produce el mayor crecimiento del sistema nervioso. El desarrollo del mismo durante esta etapa es particularmente sensible a cambios ambientales, los cuales pueden producir efectos permanentes sobre las conexiones neuronales que se establecen durante este período.

Durante el desarrollo las células nerviosas adquieren su identidad y establecen conexiones sinápticas precisas y ordenadas en respuesta a factores genéticos y ambientales. Entre estos factores se encuentran el linaje celular, las interacciones tróficas entre células, las claves que guían la migración celular y el crecimiento axonal, el reconocimiento entre células, y el refinamiento de las conexiones dependiente de la actividad (2). Para crear la arquitectura neural precisa del sistema nervioso durante el desarrollo, el número y tipo correcto de neuronas deben ser generadas, asumir su posición adecuada, y realizar sinapsis con células blanco apropiadas.

El desarrollo del sistema nervioso comienza entre las 2-3 semanas de gestación en humanos (3) y en el día embrionario (DE) 7,5 en roedores con el plegado y fusión de una capa de células de origen neuroectodérmico, la placa neural, para dar origen al tubo neural. A continuación la porción anterior del tubo neural se ensancha, comprime y pliega formando tres vesículas que darán lugar al prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, mientras que la porción más caudal dará lugar a la médula espinal. A partir de estas tres vesículas y mediante una serie de complejos eventos de duplicación, migración y diferenciación celular, se formarán las diferentes regiones del cerebro. Estos eventos deben ocurrir de forma dinámica y ordenada, y su sucesión está determinada genéticamente, dirigida epigenéticamente, por cambios estables y heredables en la expresión génica, y es susceptible a la influencia ambiental (3).

La maduración del sistema nervioso no es lineal. Existen períodos durante los cuales un proceso determinado (p.ej. diferenciación de un tipo celular) se desarrolla más rápidamente. Se considera que dicho proceso es más susceptible a un estrés ambiental durante este período de máximo crecimiento (Figura 1.1). Además, si este no ocurre en el tiempo programado, se produce un déficit funcional permanente (4)

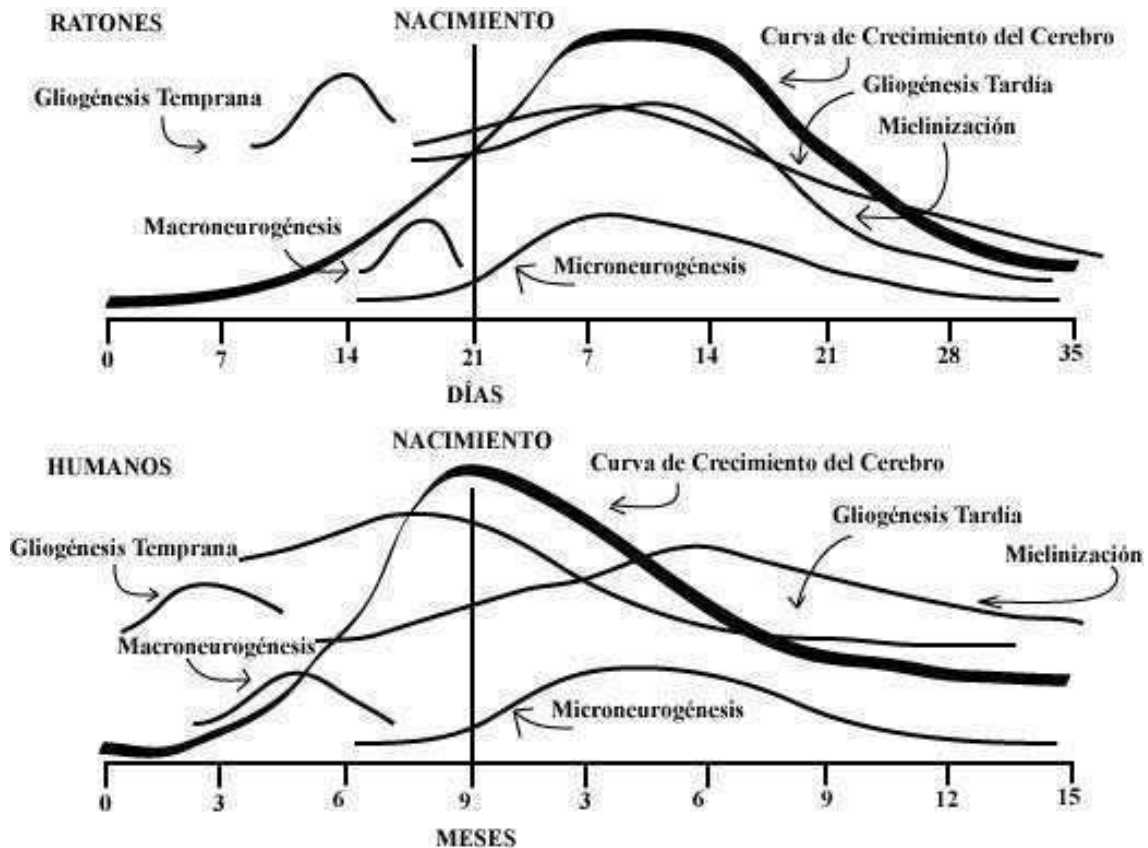


Figura 1: Curvas comparativas de la tasa, duración e inicio de los diferentes procesos de desarrollo, superpuestas con la curva de crecimiento del cerebro en negrita. Gliogénesis temprana: glía radial; gliogénesis tardía: oligodendroglía; macroneurogénesis: neuronas piramidales; microneurogénesis: células granulares del giro dentado; bulbo olfatorio y cerebelo. Adaptado de (4)

Es importante destacar que en comparación con el desarrollo del cerebro humano, en donde la mayor tasa de crecimiento se produce alrededor del nacimiento, en ratones la misma se encuentra desplazada hacia la etapa de la lactancia (Figura 1.1).

Al compararlo con el adulto, el cerebro en desarrollo es particularmente vulnerable a su entorno debido a que las diferencias en la funcionalidad de la barrera hematoencefálica y la actividad de las enzimas metabólicas, entre otras, crean una oportunidad para que una injuria ambiental interfiera con el proceso de desarrollo(5).

1. Estrés perinatal y su efecto sobre el desarrollo del sistema nervioso.

La vida es posible gracias al mantenimiento de un equilibrio complejo del ambiente interno, denominado "homeostasis", el cual es constantemente desafiado por diversos factores estresantes (6). El **estrés** puede definirse como una amenaza a ese estado de

homeostasis o como la percepción de una amenaza al mismo (7), e incluye en su definición a los mecanismos con los que el cuerpo reacciona a esa afrenta. Cuando el evento adverso se presenta tempranamente, durante las etapas críticas del desarrollo, el mismo constituye un factor de **estrés perinatal**.

El ambiente perinatal cumple un rol significativo en el modelado del desarrollo neurocognitivo (8). Investigaciones clínicas, epidemiológicas y de laboratorio, sugieren que eventos comunes en el embarazo como la dieta, el estrés, los contaminantes ambientales y el ejercicio, afectan significativamente el desarrollo neurológico futuro de los niños (9).

1.1. Estrés prenatal.

El efecto sobre la descendencia de una alteración ambiental producida durante la preñez, dependerá del momento preciso en el que este ocurra en relación con los procesos neurogénicos que estén sucediendo.

Una interrupción en el desarrollo durante la etapa de formación del tubo neural, puede resultar en anencefalia (ausencia de una gran proporción del cerebro, cráneo y cuero cabelludo), espina bífida (falla en la fusión o formación de la espina dorsal) y craneoquisis (cierre incompleto del cráneo con eventual degeneración del cerebro)(10), así como otras anomalías como la hidrocefalia (acumulación de líquido cerebroespinal en los ventrículos cerebrales) y hernia de la médula espinal(11).

La etapa posterior, correspondiente al segundo trimestre de embarazo en humanos, es una etapa con un elevado nivel de desarrollo neural, en donde las células progenitoras siguen un programa de diferenciación que dicta sus características finales. Se ha demostrado que la exposición a diversos agentes ambientales, como por ejemplo el uso de anestésicos, el etanol, los pesticidas, el humo de tabaco y la administración de hormonas estrogénicas, durante esta etapa crítica, puede alterar la neurogénesis (5).

La alteración del estado psicológico de las madres durante la preñez, ya sea por estrés, ansiedad o depresión, influye profundamente sobre el desarrollo de las crías. Estudios realizados en roedores han demostrado que la restricción física materna durante esta etapa produce una disminución en el número y la proliferación de las células madre neurales derivadas de la zona subependimaria de los ventrículos laterales (zona de activa neurogénesis en el cerebro adulto que se encuentra por debajo del epéndima), en roedores recién nacidos (12).

Durante la última etapa de la preñez en roedores se generan las neuronas de tres regiones del sistema límbico. La **amígdala**, estructura formada por varios grupos de núcleos involucrada en el procesamiento de la memoria y respuestas emocionales, el **hipocampo**, involucrado en la consolidación de la memoria y en la navegación espacial, y el **núcleo accumbens**, relacionado con el placer, miedo y adicciones. Cuando las madres durante la etapa final de la preñez fueron sometidas a un estrés, tal como períodos de restricción acompañados de una intensa iluminación, se encontró una disminución significativa del número de células proliferantes en el núcleo accumbens y el hipocampo en crías de diez días de edad (P10) (13), sin afectar la neurogénesis en el bulbo olfatorio (14).

Otro tipo de estrés es el producido por una infección y consecuente activación del sistema inmune durante la preñez. El mismo puede producir diversos efectos en las crías de acuerdo a la gravedad y al momento en el que se produce. Estos incluyen la aparición de comportamientos de tipo ansioso y depresivo, una alteración en la respuesta a estrés, una reducción del número de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas, una disminución de la expresión de la neurotrofina BDNF, la aparición de síntomas esenciales del autismo, entre otros desórdenes cognitivos, comportamentales y psiquiátricos (15),(16),(17).

1.2. Estrés posnatal.

Como se puede observar en la figura 1.1, diversos eventos que en humanos comienzan en el tercer trimestre de embarazo, en roedores se desarrollan durante la etapa de la lactancia. Por ejemplo la etapa inicial de sinaptogénesis, donde se produce la mayor tasa de formación de conexiones neuronales, ocurre durante el tercer trimestre de gestación, y continúa hasta los dos años de edad, con la formación de nuevas sinapsis asociadas a diferentes experiencias (18,19). En roedores, esta etapa de elevada sinaptogénesis se produce durante la lactancia. Una diferencia temporal similar se observa entre roedores y humanos en la etapa de mayor crecimiento del cerebro (Figura 1.1). Es por esto que estudios realizados en roedores durante la preñez abarcan, a grandes rasgos, los eventos que tienen lugar durante los primeros dos trimestres del embarazo en humanos. Aquellos trabajos en donde el factor estresante es presentado durante la lactancia en roedores, intentan modelar el efecto de una alteración ambiental ocurrida durante el tercer trimestre y la primera época posnatal en humanos.

Un modelo muy utilizado de adversidad temprana posnatal en roedores es aquel mediante el cual se separa diariamente a las crías de la madre durante un tiempo

determinado. Esta situación de estrés produce cambios en la modulación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), que afectan el funcionamiento del sistema nervioso y el comportamiento emocional en los adultos (20), (21). La influencia de la separación materna sobre el comportamiento de las crías ha arrojado resultados dispares. Por un lado se ha reportado que múltiples períodos de separación materna producen un aumento en la manifestación de comportamientos de tipo ansioso (22,23) mientras que eventos cortos, provocarían una disminución de dicho comportamiento y una menor respuesta al estrés (24,25). De manera similar, se ha reportado que períodos cortos de separación materna durante la lactancia resultan en una menor ingesta voluntaria de alcohol en ratas machos; mientras que períodos prolongados de separación materna durante la etapa posnatal provocan un aumento de la misma. Resulta interesante que en lo que se refiere a la ingesta voluntaria de alcohol, las hembras de la misma especie, no fueron afectadas por la separación materna (26).

Modelos de estrés posnatal por destete temprano, también indican que el mismo afecta el eje HPA, provocando cambios en la respuesta al estrés, un aumento en el comportamiento de tipo ansioso y una disminución de actividades de juego (27). Resulta interesante destacar que este tipo de estrés, provocado durante la etapa final del desarrollo, también fue acompañado de un menor nivel de mielinización en individuos machos (28). Este hallazgo es consistente con la noción de que un proceso, en este caso la mielinización, es más susceptible a un evento disruptivo en la etapa en la que dicho proceso se desarrolla más rápidamente (Figura 1.1).

1.3. Estrés perinatal en humanos.

Estudios clínicos y epidemiológicos realizados en humanos han aportado diversas evidencias acerca de cómo la influencia del ambiente, a través de la interacción materno-fetal, tienen consecuencias permanentes sobre la descendencia. Por ejemplo, una eventual infección materna durante la preñez o la lactancia aumenta la probabilidad de daño cerebral neonatal y puede tener consecuencias permanentes en las funciones cerebrales (29). Por otro lado se ha hipotetizado que la esquizofrenia podría estar causada en algunos casos por una infección viral que interrumpiría el desarrollo de circuitos inhibitorios que controlan la transmisión glutamatérgica, provocando así una excitotoxicidad selectiva, llevando eventualmente a la neurodegeneración.

Se estima que entre el 12% y el 18% de las mujeres embarazadas exhiben durante el tercer trimestre síntomas significativos de depresión clínica (30) (31). Esta puede tener efectos adversos en la descendencia como una mayor prevalencia de desórdenes del espectro autista (32), y de problemas emocionales y comportamentales (33). Además se ha visto una asociación entre la depresión materna y un menor crecimiento intrauterino y mayor incidencia de nacimientos prematuros (34).

Otro factor de estrés perinatal es la presencia de contaminantes ambientales. Por ejemplo, el metilmercurio es capaz de atravesar la placenta y su exposición ocurre frecuentemente de a pequeñas dosis a través del consumo de pescado. Aunque toda la población se encuentra en riesgo de exposición, los más vulnerables son las mujeres embarazadas y los niños. La exposición perinatal a metilmercurio puede provocar déficits visuales, dificultades motrices, y déficits cognitivos generales (35).

Estos ejemplos sirven para ilustrar como una adversidad durante períodos críticos del desarrollo puede tener consecuencias adversas permanentes para la descendencia. La importancia del momento en la que se presenta la adversidad puede subrayarse observando las secuelas de la epidemia de rubeola a mediados de 1960 en Estados Unidos, la cual tuvo como resultado el nacimiento de alrededor de 20.000 bebés con diferentes deficiencias (36). Los hijos de madres que fueron expuestas a la enfermedad durante el primer trimestre del embarazo, un período de rápido crecimiento y organogénesis, mostraron defectos generalizados, incluyendo anomalías cardíacas e intestinales, cataratas, sordera y desórdenes cognitivos. En contraste, los hijos de las madres que fueron expuestas en períodos posteriores de la preñez presentaron un menor peso al nacimiento y desórdenes cognitivos. Este y otros estudios proveen evidencias de que existe una ventana de vulnerabilidad para cada proceso, donde el mismo es más sensible a un estrés con capacidad de interrumpirlo. Aún queda complementar el conocimiento acerca de como estas adversidades durante un período de desarrollo determinado, se traducen en cambios micro y macroscópicos en el cerebro (5).

A continuación se describirá la importancia del cuidado materno durante el desarrollo posnatal, siendo que un déficit en el mismo constituye un factor de estrés.

1.4. Influencia del comportamiento materno.

En mamíferos la interacción entre la madre y la cría, y el cuidado que les provee durante el período posparto, influyen en el desarrollo de los sistemas neuronales que regulan las capacidades cognitivas y el comportamiento social (37).

Los cuidados parentales en roedores pueden dividirse en dos categorías: comportamientos activos y quiescentes (38). El cuidado quiescente está asociado a la lactancia, en donde la madre se ubica en posición de amamantamiento sobre o en estrecho contacto con las crías. Por otro lado la construcción del nido, ya sea el transporte de material o el armado del mismo, es considerada una forma de cuidado activo, al igual que traslado activo al nido de las crías que se encuentran dispersas. Esto lo pueden realizar levantándolas con la boca, cuando la distancia es larga, o empujándolos con el hocico, cuando es corta. Finalmente, uno de los comportamientos activos más estudiados es el de acicalado de las crías (LG por las siglas en inglés de “*licking and grooming*”). Los parentales dedican bastante tiempo al lamido de las crías, un comportamiento que las mantiene limpias, aumenta su actividad motriz y estimula la eliminación de orina (38). El acicalado tiene además, como se discutirá en esta sección, efectos a largo plazo en el desarrollo emocional, endócrino y sexual de las crías. Este tipo de interacción es más frecuente durante la primera semana posnatal y muestra una variabilidad considerable entre individuos, siendo estable dentro de cada individuo. Esta dispersión entre individuos sigue una distribución normal y permite caracterizar a las madres de acuerdo al tiempo (alto, medio, bajo) que dedican a esta actividad (37,39).

Estas diferencias naturales en el nivel de cuidado materno producen cambios en la expresión génica y la función neuroendócrina de las crías. Al evaluar la respuesta al estrés producido por la restricción física en las crías, se encontró que aquellas que habían sido cuidadas por madres de bajo LG presentaban un aumento más prolongado en los niveles de adrenocorticotropina (ACTH) -hormona liberada por la hipófisis que estimula las glándulas suprarrenales- y corticosterona -glucocorticoide producido por las glándulas suprarrenales mediador de la respuesta a estrés- y una menor expresión del mensajero del receptor de glucocorticoides en hipocampo y niveles elevados del mensajero de la hormona liberadora de corticotropina (CRH)-hormona hipotalámica que estimula la liberación de ACTH (40) (41). La liberación de corticosterona luego de la activación del eje HPA tiene un feedback negativo a través de la interacción de la hormona con los receptores de glucocorticoides del hipocampo. La disminución de la expresión de los mismos, mantiene la respuesta al estrés

activa por más tiempo, explicando así la elevada actividad del eje HPA en crías de madres de bajo LG y la dificultad para restaurar los niveles basales de corticosterona una vez eliminado el estrés (42). La disminución en la expresión del gen de glucocorticoides es provocada por una mayor metilación del mismo, y constituye un mecanismo de herencia comportamental, debido a que este aumento se encuentra ausente en crías de madres de bajo LG que fueron adoptadas por madres de alto LG durante la lactancia(37).

Los cambios neuroendócrinos observados en las crías de madres de bajo LG, se vieron reflejados en una disminución de la actividad exploratoria, la manifestación de comportamientos de tipo depresivo, y deficiencias en el desempeño en tests de aprendizaje y memoria. Respecto a la expresión génica, estos animales mostraron una reducción en los niveles de mensajero de BDNF y de la proteína sinaptofisina en el hipocampo (43).

En humanos, diversos factores pueden influir sobre el comportamiento materno durante la preñez y la lactancia. La depresión materna puede presentarse no sólo durante el embarazo, como se mencionó en la sección anterior, sino también durante el período de los 6 meses posparto cuando tiene una alta incidencia. La misma muchas veces pasa desapercibida debido a que muchos de los malestares del período posparto son similares a los síntomas de depresión (44) conduciendo a un menor cuidado de los infantes, que puede llevar a un déficit cognitivo y social de la descendencia (45).

Las víctimas de abuso sexual o físico durante la infancia, presentan un mayor riesgo de sufrir, ya adultos, de obesidad, diabetes y enfermedades cardíacas y psiquiátricas. Aun en ausencia de abuso físico, chicos que crecen en condiciones de abandono emocional o un entorno familiar conflictivo, pueden ver su desarrollo físico y cognitivo afectado y tienen mayor riesgo de sufrir de obesidad de adultos y de trastornos depresivos y de ansiedad (46).

1.5. Efectos diferenciales del estrés perinatal de acuerdo al sexo.

Durante los últimos años se ha comenzado a dar cada vez más importancia a los efectos sexo dependientes del estrés perinatal. Estudios de exposición de las madres a agentes estresantes durante la preñez, han arrojado resultados opuestos acerca del efecto sobre la cognición entre machos y hembras, observándose una disminución en el desempeño de los machos y un aumento en el de las hembras (47). También se ha visto que la respuesta al estrés alterada de las crías cuyas madres habían sido expuestas a una adversidad, estaba restringida a los machos, y que esta diferencia entre géneros podría tener origen en la regulación diferencial de diversos genes en la placenta y la maquinaria

epigenética de la misma (48). La exposición a toxinas tiene un efecto diferencial de acuerdo al sexo sobre la metilación, y consecuente expresión, de los genes de las enzimas DNMT1 y DNMT3A. Estas proteínas están involucradas en la regulación de la expresión de diversos genes de forma tejido específica a través de su metilación, por lo que una alteración en los niveles de las mismas, podría afectar directamente la expresión de múltiples genes (49) (50). Estas diferencias de acuerdo al sexo tienen una base epigenética que podría originarse durante el desarrollo debido a las diferencias génicas y hormonales entre ambos géneros (51) (52).

2. Malnutrición.

La alimentación materna durante la etapa de la gestación y la lactancia es fundamental para el correcto desarrollo de la prole y es uno de los principales factores que impactan en el desarrollo del cerebro.

El término desnutrición indica que, pese a que todos los nutrientes requeridos se encuentran disponibles en la dieta, la cantidad ingerida es insuficiente. El término malnutrición implica, en cambio, que uno o varios de estos nutrientes esenciales o las calorías necesarias no están presentes en las proporciones adecuadas (4).

La Organización de las Naciones Unidas, a través de la FAO, informa que, según estadísticas de 2012, 842 millones de personas sufren algún grado de desnutrición, es decir cerca del 12% de la población mundial. Se estima que más de 1/3 de estas personas corresponden a mujeres en edad fértil (FAO, 2012 “Food Insecurity in the World”). Se estimó que para el 2011 había 19 millones de niños menores de 5 años, la mayoría en el sudeste asiático y en África subsahariana, que sufrían de malnutrición o desnutrición severa aguda, y que más del 7% de las muertes a esta edad eran debidas a esta condición (53). En caso de no producir la muerte, las consecuencias más comunes de la desnutrición son: perturbaciones en el comportamiento y la cognición (como se elaborará en mayor profundidad) y un mayor riesgo en la prevalencia de enfermedades metabólicas, como la diabetes mellitus tipo 2, y enfermedades cardiovasculares (54).

La desnutrición materna afecta el desarrollo del sistema nervioso del embrión y tiene consecuencias que se mantienen aún en el adulto. Un ejemplo ilustrativo es el de la llamada “hambruna holandesa”, la cual ocurrió en ese país durante la Segunda Guerra Mundial, cuando un amplio sector de la población fue sometido a una extrema escasez de

alimentos, que en 1944 provocó la muerte de alrededor de 20.000 personas por falta de alimentos. Estudios realizados en adultos nacidos de mujeres que estuvieron embarazadas durante este período, indicaron que el desarrollo embrionario durante el mismo estuvo asociado a una duplicación del riesgo de sufrir deficiencias neurológicas (55) (56). Resulta interesante además, que la exposición a la hambruna durante el primer trimestre de embarazo mostraba una correlación directa con un riesgo a sufrir esquizofrenia, mientras que la exposición durante el segundo y tercer trimestres, estaba relacionada con una mayor incidencia de desórdenes afectivos (57) (56). Nuevamente resaltando la importancia del momento que se ve afectado por el agente externo, y los procesos de desarrollo que se están llevando a cabo.

La malnutrición podría afectar diferencialmente a los individuos de acuerdo al sexo. Estudios hechos con niños en India han indicado que el efecto de la malnutrición sobre el aprendizaje y la memoria es sexo dependiente, siendo los varones los más afectados en este aspecto (58).

2.1. La nutrición como problemática social.

Si bien la desnutrición a nivel mundial ha ido retrocediendo en los últimos 20 años debido a un aumento en la producción de alimentos y a las políticas implementadas por las Naciones Unidas a través de la FAO, los índices de malnutrición, por el contrario, se han incrementado. Los niveles de malnutrición, con especial énfasis en la derivada de una deficiente ingesta de proteínas o de las calorías ingeridas, alcanzan al 37% de la población. Aunque con una mayor prevalencia en países con menores recursos, la misma no debe pensarse como una condición restringida a países con bajo desarrollo sino que se encuentra con frecuencia en países altamente industrializados entre los sectores sociales menos favorecidos (59).

Casi la mitad de las muertes de niños en todo el mundo se vinculan a la malnutrición. La resistencia a la infección es menor en los niños malnutridos que tienen mayor propensión a morir por causa de enfermedades infantiles comunes, como las enfermedades diarreicas y las infecciones de las vías respiratorias. La mayor frecuencia de estas enfermedades ocasiona que los que sobreviven tiendan a seguir malnutridos y sujetos enfermedades recurrentes y a la perturbación en el crecimiento (60).

La situación de pobreza a la que se encuentra ligada la desnutrición está asociada generalmente a un escaso acceso las distintas etapas educativas. Estas circunstancias dificultan la salida de esta situación desafortunada, exponiendo también a las futuras

generaciones a una carencia alimenticia. La intervención del estado es obligatoria y fundamental para tratar de recuperar estas amplias franjas de ciudadanos que se ven privados de sus necesidades básicas. Cuando un estado entra en una crisis económica la misma termina alcanzando con el tiempo a la alimentación de los ciudadanos. Con la reciente crisis y las medidas de austeridad tomadas, se calcula que actualmente hay 50000 niños en la comunidad de Cataluña que sufren de privación alimenticia (61). Esta privación puede revertirse en caso de cambiar la situación económica, pero los efectos de la malnutrición, como se ha desarrollado, son más duraderos.

2.2. Malnutrición proteica.

Los efectos biológicos de la desnutrición y la malnutrición suelen superponerse, pero no son exactamente iguales. Una de las formas de malnutrición más extendidas en el mundo es aquella que resulta de una ingesta pobre en proteínas, teniendo esta un fuerte impacto sobre el desarrollo del sistema nervioso (58). La misma, al igual que otras formas de malnutrición, puede encontrarse aún en países altamente industrializados entre aquellos sectores sociales menos favorecidos, o por una mala alimentación debida a diversos aspectos culturales.

Como se mencionó, la malnutrición materna es quizás la causa principal de deficiencias en el desarrollo del cerebro del embrión. Si bien todos los nutrientes en mayor o menor medida tienen influencia sobre la maduración del cerebro, las proteínas representan uno de los componentes de la dieta más críticos para el desarrollo neurológico (4). Salvo ciertas inmunoglobulinas, las proteínas no cruzan la placenta en cantidades significativas. Por lo tanto el valor nutricional de las proteínas reside principalmente en los aminoácidos individuales que son absorbidos por el tracto digestivo materno. Los aminoácidos son precursores de proteínas estructurales que son esenciales para el crecimiento de los tejidos incluido el cerebro o precursores de moléculas con actividad biológica como enzimas, hormonas peptídicas o neurotransmisores (62) (63). Algunos de estos aminoácidos tienen, por sí mismos, actividad neurotransmisora. Es evidente, entonces, que la función de los aminoácidos en el sistema nervioso va más allá de su participación en la síntesis de proteínas.

Como se mencionó previamente el desarrollo de una correcta arquitectura del sistema nervioso requiere de la migración, diferenciación e interacción celular, en una sucesión de pasos secuenciales y ordenados, regulados por una serie de reacciones

metabólicas. Las mismas están determinadas genéticamente, pero dependen también del estado nutricional. Factores exógenos como la malnutrición, pueden interferir con la síntesis proteica y con la incorporación apropiada de lípidos en diversas estructuras cerebrales. Los efectos de la malnutrición proteica en el cerebro en crecimiento no resultan en una anatomía cerebral aberrante, lesiones focales microscópicas definibles, ni en retardos mentales evidentes, sino más bien en un desarrollo intelectual y comportamental subóptimo y permanente (58). Además, en caso de existir un retraso en la proliferación o migración neuronal, las mismas pueden no llegar al sitio blanco a tiempo para recibir los *inputs* adecuados. Esto podría resultar en una alteración de la organización funcional de las áreas cerebrales involucradas, sin presentar alteraciones morfológicas evidentes (64).

Estudios clínicos realizados en niños expuestos a malnutrición proteica muestran cambios en el comportamiento que se mantienen aún en la etapa adulta. Estos cambios involucran problemas de atención, hiperactividad, agresividad y otras conductas antisociales (65,66). Numerosas evidencias demuestran que la desnutrición en el período prenatal y de lactancia incrementa el riesgo de enfermedades psiquiátricas tales como la depresión, desórdenes de la personalidad y esquizofrenia (67,68). Estas evidencias convergentes sugieren una relación causal entre malnutrición proteica y alteraciones neurofisiológicas y conductuales. Sin embargo, los mecanismos moleculares que median los efectos permanentes de la malnutrición en etapas tempranas de la vida no han sido aún completamente dilucidados.

2.3. Malnutrición proteica en modelos animales.

Los modelos de roedores de malnutrición proteica perinatal muestran alteraciones comportamentales similares a las observadas en humanos, por lo que resultan muy útiles para el estudio de las bases moleculares y celulares de las mismas (69). Estos modelos se generan a través de la alteración del contenido proteico de la dieta de la madre, sin restringir la cantidad de alimento suministrada ni su contenido calórico, y se pueden circunscribir a la etapa pre o posnatal, o abarcar ambas. Una dieta baja en proteínas durante la lactancia, provoca en las madres la producción de leche con un menor contenido de nitrógeno y un mayor contenido de ácidos grasos lo cual se traduce en una alteración de la calidad de la dieta de las crías (70).

Diversos trabajos experimentales en roedores han estudiado las consecuencias de la malnutrición proteica en el desarrollo del cerebro y en el comportamiento. La malnutrición proteica durante las primeras etapas de la vida puede afectar la neurogénesis, la migración celular, la diferenciación y la plasticidad (71) (72) (73) (74). Además, se ha reportado en ratas que aquellos individuos que habían sufrido de una malnutrición pre y posnatal presentaban una reactividad emocional a los estímulos aversivos o de dolor (75), una alteración en la evaluación de riesgo (76), una reducción en la flexibilidad cognitiva (77) y problemas de aprendizaje y memoria (78). Resulta importante destacar que estos estudios han sido realizados con una reducción en dos tercios en la proporción de proteínas de la dieta. **Esta reducción es mayor a la que se puede encontrar en países desarrollados** (79) (80).

Por otro lado, pese a que el efecto de la malnutrición proteica ha sido ampliamente estudiado, **los efectos de este tipo de malnutrición en particular sobre el desarrollo físico y de los reflejos neurológicos**, ha recibido una menor atención(64) (81) (58).

La incidencia de diversas enfermedades relacionadas con el desarrollo neurológico difiere ampliamente entre sexos. Mientras que el autismo y la esquizofrenia tiene mayor incidencia en hombres que en mujeres, los trastornos depresivos son dos veces más comunes en mujeres que en hombres. Sin embargo pese a las obvias diferencias de género en la incidencia de diversos desórdenes comportamentales, **poco se sabe acerca de la posible dependencia del sexo de los efectos de la malnutrición sobre la cognición** (82).

Finalmente, la duración y la magnitud de la malnutrición está directamente relacionada con la persistencia de sus efectos sobre el desarrollo del cuerpo y de los cambios comportamentales (69). Estudios en animales y humanos indican que la combinación de la malnutrición pre y posnatal tiene efectos más deletéreos que la malnutrición restringida al período prenatal (4). Teniendo en cuenta la alta incidencia de la inseguridad nutricional dentro de la población de menores ingresos, es probable que la mayoría de los niños que han sufrido de una privación nutricional durante la gestación, sigan expuestos a la misma durante la etapa de la lactancia (83) (58,81,84).

3. Plasticidad Neuronal.

La plasticidad cerebral puede entenderse como una serie de mecanismos que le permiten al cerebro adaptarse a un entorno en constante cambio e integrar nuevas experiencias. Entre estos mecanismos de adaptación se encuentran aquellos que involucran el remodelado de sinapsis (por reforzamiento, debilitación o eliminación de las existentes o agregado de nuevas conexiones), reformado de axones y dendritas, remoción o agregado de nuevas células a los circuitos ya existentes y la regulación de la expresión de diversos genes involucrados en estos procesos (3) (85) .

Esta plasticidad está presente a lo largo de toda la vida de un individuo, pero es máxima durante la etapa de desarrollo (54). De esta capacidad del cerebro de cambiar e incorporar nueva información dependen los procesos de aprendizaje y memoria.

A continuación se discutirán algunos procesos de plasticidad neuronal.

3.1. Neurogénesis y apoptosis.

3.1.1. Neurogénesis.

La neurogénesis ocurre a lo largo de toda la vida en el cerebro adulto de mamíferos, incluyendo el humano (86). En roedores la misma se lleva a cabo principalmente en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, y en la zona subventricular del ventrículo lateral (87). El proceso de generación de nuevas neuronas consiste principalmente en cuatro etapas: proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular. Estas nuevas neuronas se integran a los circuitos neuronales funcionales en diversas regiones, sugiriendo que la neurogénesis desempeñaría un papel importante en las funciones cerebrales (88,89). Cada vez hay más evidencias experimentales que otorgan a la neurogénesis hipocampal un rol fundamental en el aprendizaje, en la formación de diversos tipos de memoria y en la consolidación de las conductas de un individuo (88,90). Además la misma poseería un rol fundamental en el aprendizaje, en la formación de diversos tipos de memoria y en la consolidación de las conductas de los individuos (88,90). Más aún, el hecho de que esta neurogénesis sea incrementada por la persistencia en un ambiente estimulante o el ejercicio y negativamente afectada por diversos desórdenes neurológicos como la depresión, Parkinson, Alzheimer o isquemia cerebral, muchas de las cuales están asociadas a un déficit cognitivo, refuerzan esta hipótesis (91,92).

La neurogénesis se lleva a cabo en un ambiente único, o nicho neurogénico, que está conformado por células endoteliales, astrocitos, microglia, células endimarias y neuronas maduras, así como la progenie de los precursores neurales adultos (89). La misma está además regulada, en condiciones normales y patológicas, por una serie de señales extrínsecas, intrínsecas y por estímulos ambientales. Estas señales afectan la proliferación de los precursores neurales, la activación de los mismos, la especificación y diferenciación neural y su incorporación al circuito maduro del giro dentado (93).

Entre las señales extracelulares se destacan la neurotrofina BDNF, la cual promueve la proliferación celular, la diferenciación neuronal y la sinaptogénesis, y la proteína reelin, la cual controla la migración de las neuronas recientemente generadas. Entre las intracelulares se encuentran el factor de transcripción CREB, el cual media los efectos de promoción de crecimiento de espinas dependiente de la actividad, la formación de nuevas sinapsis y la supervivencia de neuronas generadas a partir de un aumento en la actividad de los neurotransmisores GABA y glutamato (94). Dentro de esta categoría también se encuentran las proteínas de unión a islas CpG metiladas, MBD1 y MeCP2. La primera inhibiendo a diversos microRNAs controlando así el balance entre proliferación y diferenciación, y la segunda regulando la maduración y la formación de espinas de nuevas neuronas. Otra proteína celular que interviene en la regulación de la neurogénesis es la histona desacetilasa 2 (HDAC2) (89). Esta inhibe la expresión del factor de transcripción Sox2, el cual es necesario para la maduración y supervivencia de las neuronas recién generadas.

Factores ambientales o externos al nicho neurogénico tienen la capacidad de regular la generación de nuevas neuronas. Entre los estímulos ambientales que estimulan la neurogénesis se destacan el ejercicio físico, el cual aumenta la proliferación de los precursores tipo gliales; un ambiente enriquecido, el cual promueve la supervivencia de las nuevas neuronas (93); las tareas de aprendizaje, que regulan la supervivencia de las nuevas neuronas. El estrés crónico y el envejecimiento, por otro lado, son factores que provocan una disminución en la proliferación de los precursores neurales (89,93-95).

3.1.2. Apoptosis.

Durante el desarrollo del sistema nervioso central y periférico un gran número de neuronas sufre apoptosis principalmente durante el proceso de sinaptogénesis. Esta apoptosis masiva es crucial para dar forma a la compleja arquitectura del cerebro de modo de establecer los circuitos neuronales necesarios que permitirán la ejecución de las

funciones motoras, de aprendizaje, memoria, etc. (96,97). Sin embargo, y en contraste con el rápido recambio celular en los tejidos proliferativos, las neuronas, en un sentido general, sobreviven durante toda la vida del individuo, siendo esta característica de permanencia, imprescindible para el mantenimiento de las redes neuronales mencionadas. Es por ello que, al contrario que durante el desarrollo, la progresiva apoptosis neuronal en el cerebro adulto es causa de patologías irreversibles denominadas enfermedades neurodegenerativas, tales como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica entre otras (98). Los estímulos y factores genéticos, fisiológicos o ambientales que promueven la apoptosis neuronal son variados. Entre ellos, el limitado acceso a factores neurotróficos (99), procesos de excitotoxicidad (100) y el aumento de radicales libres producidos por estrés oxidativo que causan daño al DNA (101). La neurodegeneración también es causada por mutaciones genéticas y disfunciones metabólicas y la acción de toxinas ambientales. Otro factor externo que afecta la supervivencia neuronal es el cuidado materno. **Crías de madres de bajo LG presentaron mayores niveles de apoptosis y menor proliferación celular que aquellas que fueron criadas por madres de alto LG** (102) (103).

La estabilidad de las neuronas durante un largo período de la vida del organismo necesaria, como ya se dijo, para mantener sus funciones y el hecho de que la mayoría de estas células no se dividan luego del desarrollo sugieren que, durante la evolución, se ha ejercido una fuerte presión sobre el sistema nervioso de modo de desarrollar diversos mecanismos que lo protejan contra la muerte celular. Las dramáticas consecuencias de la neurodegeneración enfatizan la importancia de estos mecanismos que promueven la supervivencia y plasticidad neuronal.

3.2. Modelado de espinas dendríticas.

Los circuitos neuronales son definidos por las estructuras de axones y dendritas, y las sinapsis conectadas por estos. La plasticidad sináptica en los circuitos neuronales en el cerebro adulto involucran o bien el fortalecimiento o debilitamiento de sinapsis persistentes, o una plasticidad estructural que incluye la formación o eliminación de sinapsis (104). Esta plasticidad es fundamental para el aprendizaje, la formación de la memoria y su capacidad de almacenamiento y su recuperación luego de una injuria o stress en el cerebro. Si bien la morfología de axones y dendritas es muy estable, hay una importante variación en la aparición y desaparición de espinas dendríticas que modulan el número de sinapsis lo que contribuye en gran medida a la plasticidad neuronal (105) (106).

Las espinas dendríticas son los receptores primarios de los impulsos excitatorios del sistema nervioso central y proveen los compartimentos bioquímicos que controlan localmente los mecanismos de señalización en las sinapsis. Las espinas del hipocampo muestran una plasticidad estructural importante y este proceso está en la base de la respuesta a cambios en el medio ambiente. La magnitud de esta plasticidad se corresponde con la eficacia con la que el sujeto se aprende y memoriza dichos cambios y, por ende, la posibilidad de adaptarse a ellos, lo que en definitiva define su comportamiento. La formación y eliminación de espinas es regulada por mecanismos moleculares que son afectados por las experiencias del sujeto (107,108).

4. Expresión Génica, Desarrollo y Plasticidad.

4.1. Neurotrofinas.

Las neurotrofinas constituyen una familia de proteínas estrechamente relacionadas identificadas, en principio, como factores de supervivencia neuronal pero que, actualmente se sabe, controlan muchos aspectos del funcionamiento del sistema nervioso central. En mamíferos esta familia está constituida por cuatro miembros: NGF (nerve growth factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin 3) y NT-4 (neurotrophin 4). Las neurotrofinas actúan a través de dos clases de receptores. Cada una de ellas activa uno o más de los receptores de tirosina quinasas TrkA, TrkB y TrkC y todas ellas interactúan con el receptor p75NTR (109).

Las neurotrofinas además de ser fundamentales para el correcto desarrollo del sistema nervioso central, desempeñan un papel fundamental en el cerebro adulto donde controlan la función sináptica, la plasticidad neuronal y la supervivencia, morfología y diferenciación de las células neurales (110).

Mutaciones o defectos en la expresión de las neurotrofinas son causa de enfermedades neurodegenerativas y también han sido reportadas en patologías que presentan defectos en la percepción sensorial, disminución de capacidades cognitivas y alteraciones en la personalidad (111,112).

La expresión de BDNF puede estar influenciada por el ambiente perinatal. Se ha reportado una disminución de esta neurotrofina en el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala de ratones de madres de bajo LG (113) (114). Otro estudio en ratas indica

además que la exposición a un estrés durante la preñez, altera la expresión de BDNF en el hipocampo de las crías (115).

4.2. Genes de expresión temprana.

Entre los genes cuya expresión normal es más relevante para una correcta plasticidad neuronal están los genes de expresión temprana (immediate early genes, IEG), cuya expresión y activación es una de las etapas primarias en la cascada de eventos para la formación de la memoria. Entre estos genes se encuentran Egr-1, Arc, CREB, c-fos, c-jun y JunB. Todos ellos han sido relacionados con procesos de aprendizaje y formación de memoria (116-118).

Ha sido reportado que la expresión de **Egr-1 y Arc está alterada en crías que recibieron bajos niveles de cuidado materno** o fueron expuestas a otro tipo de estrés posnatal, y que esta alteración en su expresión estaría regulada epigenéticamente y dependería del sexo (119) (120).

4.3. Mecanismos epigenéticos.

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo del sistema nervioso y el apropiado funcionamiento de las neuronas, requiere la expresión regulada de un gran número de genes. Los cambios epigenéticos, que se refieren a modificaciones estables y heredables en la cromatina, constituyen un mecanismo regulatorio de la expresión de genes (121). Estos cambios están dados principalmente por el grado de metilación del ADN, la presencia de diversas modificaciones postraduccionales de histonas y la expresión de ARN no codificantes. Los primeros dos regulan el grado de compactación de la cromatina y en consecuencia la accesibilidad al ADN de la maquinaria de transcripción (122), mientras que los ARN no codificantes son capaces además de silenciar la expresión génica a nivel postranscripcional (54).

Estas modificaciones epigenéticas no están limitadas en su plasticidad a las etapas iniciales del desarrollo, sino que pueden ser modificadas a lo largo de la vida en respuesta a una amplia variedad de estímulos (56). De esta forma se genera un nuevo nivel de regulación de la expresión génica que puede ser modulado por estímulos provenientes del propio desarrollo y del medio ambiente (123-125).

Estos mecanismos epigenéticos pueden provocar, en ciertas circunstancias, una alteración en la expresión de genes en múltiples tejidos, incluyendo el cerebro, con

consecuencias en el funcionamiento y conectividad de los circuitos neurales, lo cual puede generar un aumento en el riesgo a sufrir enfermedades físicas o psiquiátricas (56).

En humanos la exposición a una privación social severa, por ejemplo la institucionalización luego del nacimiento, o el sometimiento a situaciones de abuso durante la infancia, ha sido asociada con una alteración en el perfil de metilación del ADN (50) (126).

También se observó una metilación diferencial de los genes de BDNF y Reelin en ratones sujetos a un estrés posnatal, junto con una menor acetilación global de H3 en lisina 9 en el hipocampo de los mismos (122).

Diversos tejidos, incluyendo el cerebro, exhiben un dimorfismo sexual en la proporción de genes que expresan (127). **Cada sexo presenta una sensibilidad especial a los cambios ambientales durante el desarrollo y la vida adulta, y esto se traduce a su vez en una marcación epigenética diferencial de sus genes.** Es más, esta marcación diferencial es responsable en gran parte del dimorfismo en la expresión génica mencionado previamente (54). Por ejemplo, variaciones en la acetilación de H3 presentan dimorfismo sexual en el cerebro en desarrollo del ratón, y los patrones de acetilación, pero no de metilación, se encuentran “masculinizados” en hembras por la presencia de testosterona en el útero (128).

La malnutrición también podría actuar a través de estos mecanismos epigenéticos. Por ejemplo, se ha demostrado que deficiencias nutricionales conducen a un patrón alterado de expresión génica en el sistema nervioso (129-131). Estos cambios en el patrón de expresión génica podrían ser producidos por alteraciones en las modificaciones epigenéticas (132)

5. Comportamiento y cognición.

Como ya se ha discutido en secciones anteriores, resultados de trabajos en animales y humanos sugieren que la exposición a eventos estresantes durante la primera etapa de la vida puede incrementar el riesgo a diversas psicopatologías en el adulto. Por ejemplo, una separación materna de 24 h a una edad temprana en roedores, ha sido asociada con alteraciones comportamentales similares a las presentes en psicopatologías del desarrollo como la depresión y la esquizofrenia (133). Durante el desarrollo embrionario es la placenta la que al funcionar como una interfase entre la madre y el feto, media el efecto de las alteraciones ambientales sobre el desarrollo. Estas pueden producir cambios dinámicos

en esta estructura endócrina temporaria, mediados en parte a través de la regulación epigenética de la expresión génica, que podrían tener implicancias significativas en el crecimiento y desarrollo (56).

La esquizofrenia es un desorden crónico remitente asociado con el deterioro progresivo de las funciones cognitivas, psicológicas y comportamentales (134). El mismo está caracterizado por una serie de síntomas negativos (interrupción de comportamientos normales) como falta de expresividad, discurso monótono o monosilábico, falta de interés general y anhedonia (incapacidad de sentir placer) entre otros; y un conjunto de síntomas positivos (ausentes en condiciones normales) como delirios, alucinaciones y presencia de pensamiento desorganizado (135). La misma tiene una prevalencia de 1.4-4.6 y una incidencia de 0.16-0.42 cada 1000 personas anualmente (136).

Estudios epidemiológicos han establecido una correlación entre la malnutrición y el aumento de riesgo de sufrir de un trastorno del espectro esquizofrénico. Entre los nutrientes cuya falta ha sido vinculada a este desorden se encuentran la vitamina D, el ácido fólico, el hierro y las proteínas (137) (138).

Los desórdenes depresivos se caracterizan por la presencia de un estado de ánimo triste, vacío e irritable, acompañado por cambios somáticos y cognitivos que interfieren con la vida del individuo (135). El ánimo depresivo puede estar acompañado de una pérdida del interés por el placer, una alteración en el apetito y el peso, insomnio o hipersomnias, agitación o retardo psicomotriz, fatiga y pérdida de energía, una capacidad disminuida de concentración y hasta de pensamientos suicidas, en el caso de un trastorno depresivo mayor (139). Se estima que entre un 8-12% de personas en el mundo sufren en algún momento de sus vidas de un desorden del espectro depresivo (140).

Los trastornos de ansiedad pueden dividirse en cuatro categorías. Trastorno de ansiedad generalizada, caracterizado por una preocupación constante, no específica, e irracional en situaciones e interacciones sociales generalmente seguras, con una duración de al menos 6 meses. Las fobias están relacionadas con la ansiedad provocada por un evento u objeto particular, o en el caso de las fobias sociales, con la exposición a ciertos eventos o situaciones sociales. El trastorno de pánico está caracterizado por la ocurrencia de ataques de pánico (intenso miedo o temor) o ansiedad, de encontrarse en lugares o situaciones sin escapatoria. Finalmente, el trastorno obsesivo compulsivo es un desorden

caracterizado por obsesiones que provocan ansiedad y la ejecución de compulsiones para aliviarla (141) (142).

Tanto la ansiedad como la depresión, son trastornos relacionados con un mal manejo del estrés y posterior recuperación de la homeostasis, siendo su prevalencia mayor entre mujeres (143). Como ya se ha mencionado estudios epidemiológicos han vinculado al estrés perinatal y a la malnutrición con un aumento del riesgo de sufrir de estos desórdenes. Sin embargo, los modelos en roedores de malnutrición temprana han arrojado resultados contradictorios en cuanto a su relación con la ansiedad y poco se conoce en cuanto a un posible efecto de este estrés sobre la depresión (144) (145) (146).

Los modelos animales de desórdenes psiquiátricos son limitados en cuanto a su capacidad de reproducir el conjunto de sintomatologías que los caracterizan, limitándose a la modelación de algunas de ellas, pero permiten un estudio de las bases moleculares de estos trastornos, así como del desarrollo de terapias.

Resulta interesante notar, tal como se ha desarrollado en las secciones anteriores, que tanto la calidad de la alimentación en etapas tempranas de la vida, al igual que el cuidado materno, impactan de forma similar sobre las funciones cognitivas (147) (148).

Una estructura cerebral, el hipocampo, podría ser el vínculo entre los efectos del estrés perinatal sobre la cognición y el comportamiento ya que ese ha visto que el mismo está involucrado tanto en tareas de aprendizaje y memoria como en la respuesta al estrés (149). Esta estructura cerebral es particularmente sensible a la influencia ambiental debido a su marcada plasticidad, la elevada presencia de receptores de hormonas de respuesta al estrés y un importante desarrollo posnatal. En humanos este desarrollo ocurre desde el tercer trimestre del embarazo hasta los 16 años de edad y, en roedores, entre el día prenatal 18 y la 2da o 3ra semana posparto (150).

Estudios realizados en ratones malnutridos perinatalmente indicaron que los mismos exhibían defectos en tareas aprendizaje espacial, las cuales dependen del hipocampo (151). Además se ha encontrado que alteraciones en la dieta materna durante el desarrollo afectan la neurogénesis hipocampal, la complejidad dendrítica, la densidad de espinas sinápticas y reducen el tamaño de las células granulares del giro dentado (152) (150) (153). Estos resultados obtenidos sobre su morfología indicarían que el hipocampo de estos individuos tendría una plasticidad reducida, lo cual explicaría en parte los déficits

cognitivos observados (150). Por lo tanto, el hipocampo podría ser la estructura afectada de forma común en los modelos de estrés perinatal por bajo cuidado materno y en los de malnutrición.

6. Plasticidad y recuperación.

El elevado nivel de plasticidad asociado a etapas tempranas de la vida podría servir al recién nacido como mecanismo de adaptación a las nuevas condiciones ambientales. La presencia de un estrés durante esta etapa de máxima plasticidad, trae como consecuencia defectos físicos y comportamentales, probablemente debido a que su acción se ejerce en el momento en el que el organismo es más vulnerable a la influencia del ambiente. A su vez, sin embargo, manipulaciones posnatales en roedores, como adopciones por madres que proveen elevado cuidado materno (154), y el enriquecimiento ambiental (155) tienen la potencialidad de revertir estos efectos (156). Esta capacidad de reversión está asociada también con la capacidad plástica del cerebro el cual, frente a una alteración externa, es capaz de generar cambios celulares, moleculares y estructurales (157).

El enriquecimiento ambiental consiste de una combinación de estímulos cognitivos, físicos y sociales. El uso de jaulas de mayor tamaño que las de rutina permite la inclusión de un mayor número de individuos (enriquecimiento social) y la incorporación de juguetes, túneles y escaleras. Este ambiente más rico y complejo es capaz de inducir una mejora en el aprendizaje y la memoria en roedores (158). Estos efectos se han visto asociados con un aumento en el peso del cerebro, en el contenido de neurotransmisores, en la gliogénesis, en la plasticidad sináptica (formación y maduración de espinas), en la expresión de neurotrofinas y en la neurogénesis hipocampal en el adulto (159) (160).

Varios de los efectos beneficiosos de un ambiente enriquecido pueden ser reproducidos por el ejercicio. El correr en una rueda incrementa, en roedores, la neurogénesis hipocampal, la densidad de espinas dendríticas, la plasticidad sináptica, los niveles de neurotrofinas y la memoria espacial (157,161). El agregado de una rueda en la jaula de ambiente enriquecido potencia el efecto del mismo sobre el aprendizaje y la memoria.

Los efectos beneficiosos del ejercicio y de la estimulación cognitiva han sido comprobados también en humanos. La ejecución de juegos que requieren ejercicios en niños con autismo, disminuye la frecuencia de movimientos estereotipados y mejora las

funciones ejecutivas (162,163). En personas mayores la bicicleta fija disminuye la declinación cognitiva (164), mientras que el ejercicio de fortalecimiento muscular mejora los síntomas de demencia temprana (165) y provoca un aumento en el tamaño del cerebro (166). Esto último es además evidencia de que el cerebro conserva cierta capacidad de recuperación hasta edades avanzadas de la vida.

Estas evidencias de plasticidad en individuos adultos indican que, bajo las condiciones adecuadas, puede haber cierto grado de recuperación de las capacidades cognitivas.

7. Mecanismos de Heredabilidad.

La transmisión de los diferentes rasgos a sucesivas generaciones ha sido asociada exclusivamente con la herencia de la información genética contenida en la secuencia de ADN. Sin embargo, múltiples evidencias obtenidas durante los últimos años, indican que existiría un nuevo nivel de herencia de información medido por la presencia de diversas modificaciones epigenéticas.

En el ejemplo de bajo cuidado materno (sección 1.4), existe evidencia de transmisión posparto de este comportamiento de la madre a las crías hembras. Es decir que las crías de madres que dispensaban bajos niveles de cuidado (bajo LG), reproducían este comportamiento. Estudios de adopciones cruzadas entre madres de bajo y alto LG demostraron que esta herencia no es genética, sino comportamental y está mediada por mecanismos epigenéticos (167) (168). En particular, en crías de bajo LG, el gen del receptor de estrógenos se encuentra metilado en el área preóptica medial del hipotálamo, la cual está involucrada en la regulación del comportamiento materno. Esta metilación provoca una disminución en la expresión del receptor de estrógenos, que es esencial para mediar los efectos de la hormona, entre los cuales se encuentra la activación de la expresión de oxitocina, hormona fundamental para la expresión del comportamiento materno (37)

Este es un ejemplo de como el ambiente -cuidado materno- afecta el comportamiento de las crías de forma estable y heredable, a través de información no contenida en la secuencia del ADN (169). Sin embargo esta herencia es mantenida por la interacción entre la madre y la cría, y se pierde en caso de adopción por una madre de alto cuidado materno. Entonces, ¿es posible la herencia de características epigenéticas

adquiridas a lo largo de la vida a futuras generaciones que nunca estuvieron en contacto con el agente que promovió dicho cambio? Diversos trabajos han indicado que la experiencia de los progenitores, aún antes de la concepción de las crías, puede transmitirse a la descendencia por medio de cambios epigenéticos. Esto se ha visto principalmente en *C. elegans* y *D. melanogaster*, aunque nuevos estudios indicarían que este mecanismo también existe en mamíferos. Por ejemplo en ratones, el estrés por separación materna durante la lactancia provoca un aumento de comportamiento tipo depresivo en las crías (F1). Cuando los machos de la F1 eran puestos a aparear con hembras *naive*, las crías de la F2 exhibían los mismos rasgos de comportamiento aunque nunca hubieran estado en contacto con el progenitor macho. Los machos de la F1 presentaban además una alteración en la metilación general de diversos genes en los espermatozoides, mientras que los machos de la F2 presentaban un patrón similar en sus cerebros (170).

Un trabajo reciente utilizó un modelo de condicionamiento de miedo asociado al olor para demostrar que la descendencia, obtenida por inseminación in vitro de padres que habían sido entrenados en este paradigma, mostraba la misma respuesta de miedo para la que habían sido entrenados sus progenitores(171).

Estos resultados muestran como las experiencias de los padres, aún antes de la concepción de la descendencia, influyen en la estructura y función del sistema nervioso de las generaciones futuras. Este fenómeno podría contribuir, a la transmisión del riesgo de enfermedades neuropsiquiátricas tales como fobias, ansiedad y estrés postraumático observadas en humanos (172). Por otro lado esta transferencia de información podría servir para “informar” a la descendencia acerca de la importancia de ciertas características ambientales que pueden llegar a encontrar en su futuro entorno (171).

Objetivos e Hipótesis

Objetivos:

La nutrición durante el desarrollo y el principio de la vida extrauterina constituye una de las variables más importantes que influyen sobre la formación, crecimiento y organización funcional de un organismo. En particular, una alimentación deficiente durante este primer período de vida redundaría en un desarrollo inadecuado del cerebro conduciendo a cambios en su estructura y función. Como resultado, en los individuos expuestos a esta adversidad temprana, se incrementa el riesgo de la aparición de defectos en funciones cognitivas y motoras provocando deficiencias en el aprendizaje y la memoria y una reducción de las habilidades sociales. Estas evidencias convergentes sugieren una relación causal entre malnutrición proteica y alteraciones neurofisiológicas y conductuales. Sin embargo, los factores específicos que median estos efectos aún no se conocen.

El proyecto de investigación para esta tesis doctoral contempla los siguientes objetivos:

1. Establecer un modelo de malnutrición proteica perinatal en ratones de ambos sexos que presente consecuencias adversas observables y/o mensurables sobre el desarrollo físico y neurológico.
2. Evaluar el impacto de la malnutrición proteica sobre la plasticidad neuronal y las características conductuales y cognitivas.
3. Determinar las alteraciones en la expresión génica y mecanismos epigenéticos con potencial implicancia en las deficiencias comportamentales y cognitivas.
4. Evaluar la posible transferencia intergeneracional de las deficiencias físicas, neurológicas y conductuales causadas por la malnutrición proteica.

Hipótesis

El desarrollo del individuo y de su sistema nervioso está determinado por su información genética, que es modulada epigenéticamente y es susceptible a la influencia ambiental. Un factor ambiental que influye profundamente sobre el desarrollo de las crías es la alimentación materna. La misma afecta la calidad de los nutrientes que reciben las crías y junto con otros factores como el cuidado materno, pueden influir sobre la expresión de genes clave para los procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo, como la neurogénesis y la sinaptogénesis. Así, la malnutrición proteica, como experiencia temprana adversa, conduce a modificaciones permanentes en la estructura y función del cerebro resultando en alteraciones en la conducta y capacidades cognitivas confiriendo al individuo vulnerabilidad a diversas psicopatologías.

Resultados

1. Establecimiento del modelo de malnutrición proteica: Colonia e hipoproteicidad.

1.1. Utilización de la cepa C57BL/6J.

En la primer parte de la tesis se trabajó en la generación del modelo de malnutrición. Se comenzó probando la cepa C57BL/6J ya que la bibliografía la caracteriza como una cepa adecuada para realizar estudios comportamentales (173,174), uno de los puntos centrales para el desarrollo de esta tesis. Se utilizaron ratones de esta cepa de dos orígenes. En primer lugar se evaluaron los procedentes del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Se realizaron dos tandas de apareos con ratones alimentados con la comida control (grupo **CP**, 20% caseína) o hipoproteica (grupo **HP**, 6% de caseína en los primeros ensayos), producidas ambas en el laboratorio a partir de sus componentes básicos, también denominadas dietas purificadas. La caseína es la fuente de proteínas de la dieta y su porcentaje es el estipulado para roedores de laboratorio, de acuerdo al reporte del año 1993 del “American Institute of Nutrition”. (175). La proporción de caseína para la dieta hipoproteica, fue elegida en base a trabajos de diversos grupos que utilizaban una reducción de proteínas a menos de un tercio con respecto al control, como modelo de manutrición (69) (176). Ambas dietas fueron suplementadas con cisteína, en forma de L-cistina, debido a que la caseína posee una baja proporción de este aminoácido (132). La cisteína y la metionina constituyen además una importante fuente de azufre de la dieta, y su falta aumenta el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (177). Por este motivo es muy común que diversos modelos de malnutrición utilicen el suplemento de cisteína aún en la dieta hipoproteica (132).

En el primer experimento el porcentaje de preñez fue bajo (0% para el grupo CP y 40% para el HP) y las crías nacidas no sobrevivieron más allá de P2. En la segunda tanda, realizada con ratones del mismo origen, se incluyó un grupo alimentado con dieta estándar de bioterio (grupo **DB**). En este caso los porcentajes de preñez fueron del 75% para el grupo CP, 67% para el HP y 50% para las madres alimentadas con dieta DB, pero solo en el último caso las crías sobrevivieron luego de P2, sugiriendo que esta cepa posee una sensibilidad especial al alimento preparado en el laboratorio.

En segundo lugar se utilizaron ratones C57BL/6J del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata. Nuevamente se incluyeron los tres grupos y se obtuvieron los siguientes porcentajes de preñez: 100% CP, 83% HP, 100% DB. De las cuales un 50% para el grupo control, un 60% para el grupo hipoproteico y un 100% para el

grupo bioterio tuvieron crías que sobrevivieron hasta el momento del destete, y a las cuales se les realizó el test de enderezamiento en la superficie durante la lactancia. Se ha reportado que este reflejo se encuentra alterado en desórdenes que afectan el desarrollo, como la desnutrición (178). Como se puede observar en la Figura 1, los ratones hijos de madres alimentadas con dieta purificada, sea control o hipoproteica, mostraron un retraso en la maduración para la ejecución de este reflejo, con respecto a aquellos cuyas madres recibieron alimento de bioterio.

En base a estos resultados y junto con la baja eficiencia de obtención de crías, decidimos descartar el uso de esta cepa para nuestro modelo de estudio.

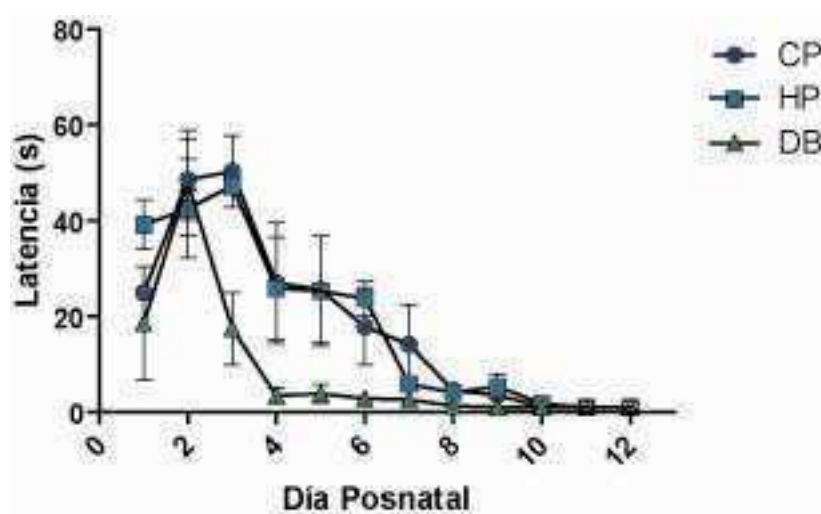


Figura 1: Latencia para ejecutar el enderezamiento en la superficie. Cada punto corresponde a un día posnatal diferente. Promedio \pm EE de diferentes camadas del mismo tratamiento. Para obtener el valor de cada camada se realizó un promedio de la latencia para todos los individuos de la misma camada.

1.2. Utilización de la colonia CF-1 y elección del porcentaje de proteínas de la dieta.

Debido a los inconvenientes presentados en la utilización de la cepa C57BL/6J, se decidió comenzar a trabajar con ratones de la colonia CF-1 producida en el Bioterio Central de la FCEyN-UBA. Se incluyeron los tres grupos ya mencionados, control, hipoproteico y bioterio.

En este caso el porcentaje de preñez fue del 100% para el grupo control, 83% para el grupo hipoproteico y 100% para el grupo con alimento de bioterio. De estas, el 100% de las madres control y un 50% de las alimentadas con dieta de bioterio tuvieron crías que sobrevivieron hasta la edad de destete. En el caso de aquellas que recibieron el alimento hipoproteico, solo el 20% de las que quedaron preñadas tuvieron crías que sobrevivieron hasta la edad de destete. A diferencia de lo ocurrido con la cepa C57BL/6J, las crías

provenientes de madres que recibieron la dieta control producida en el laboratorio presentaron un desarrollo similar al de las del grupo bioterio. Esto no fue así para las crías del grupo hipoproteico, que mostraron un claro retraso con respecto a los otros dos grupos.

Esto nos indicó que la colonia CF-1 era apropiada para nuestro modelo, debido a que las crías control no diferían apreciablemente de las del grupo bioterio, mientras que las del grupo hipoproteico presentaban un retraso en el desarrollo. Sin embargo, persistía el inconveniente del bajo número de crías de este último grupo. Es por este motivo que decidimos aumentar el contenido de proteínas de la dieta de un 6% a un 8% o a un 9% de caseína. La utilización de una dieta con 8% de caseína produjo un aumento en el tamaño de la camada, pero estuvo asociada a un alto nivel de mortandad durante la lactancia y a un incremento en el nivel de canibalismo por parte de las madres, por lo que finalmente adoptamos un nivel de caseína del 9%. Los resultados que se presentan a partir de este punto corresponden a experimentos realizados con ratones de la colonia CF-1 alimentados con dieta control (**CP**, 20% de caseína) o hipoproteica (**HP**, 9% de caseína) durante el apareamiento, preñez y lactancia, y de sus respectivas crías. Este porcentaje, además de poseer las ventajas experimentales mencionadas, se asemeja más a la reducción en el contenido de proteínas observada en casos de malnutrición en seres humanos (179,180).

2. Caracterización de la F0. Cambios físicos. Fecundidad y comportamiento materno.

2.1. Variación en el peso corporal de las madres durante la preñez y la lactancia.

Con el objeto de determinar el impacto de la dieta HP, el peso de las madres fue registrado diariamente durante la preñez y la lactancia. Se determinó el cambio en el aumento de peso para cada grupo durante la preñez realizando un ANOVA de dos factores con medidas repetidas. La interacción entre los factores dieta y el día ($F_{20,420}=8,48$, $p<0,0001$) fue significativa, entonces se realizó el análisis *a posteriori* de Tukey con el objeto de comparar ambos grupos en diferentes días. El peso de las madres HP fue menor que el de las CP para E17, E18, E19 y E20 ($p<0,05$) (Figura 2A). El efecto del tiempo se vio reflejado en diferencias significativas entre varios pares de días, pero como no es el objeto de estudio y para simplificar los gráficos, no se incluyen las significancias.

Respecto a la variación de peso de las madres durante la lactancia (con respecto a P0), la interacción entre la dieta y el día fue significativa ($F_{21,441}=1,789$, $p=0,0176$), y la

prueba de Tukey no arrojó diferencias entre ambos grupos para ninguno de los días estudiados (Figura 2B).

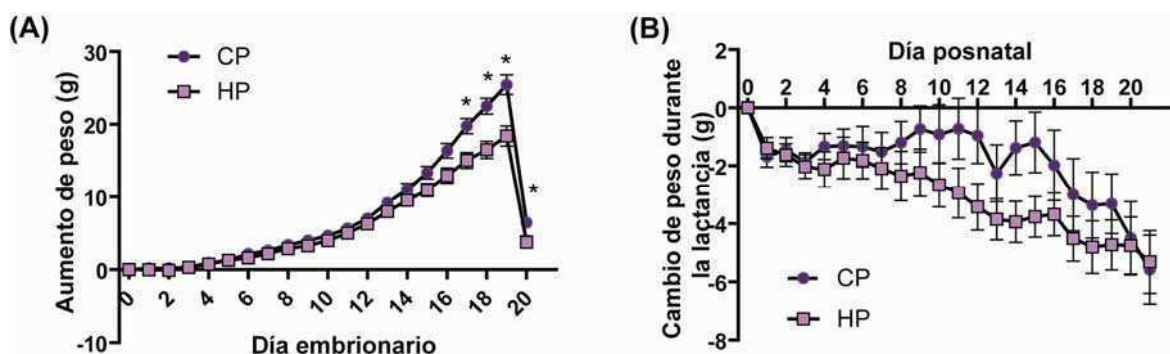


Figura 2: Cambio de peso en la F0. (A) Cambio de peso durante la preñez. Para cada tiempo (X) el cambio de peso fue calculado como el peso al EX - peso a E0. Media±EE. Anova de dos factores con medidas repetidas, test *a posteriori* de Tukey. n=10-13 para cada tratamiento. * $p < 0,05$. (B) Cambio de peso durante la lactancia. Para cada punto (X), el cambio en el peso fue calculado como el peso a PX - peso a P0. Media±EE. Anova de dos factores con medidas repetidas, test *a posteriori* de Tukey. n=10-13 para cada tratamiento.

2.2. Fecundidad de la F0.

El porcentaje de hembras de cada tratamiento que resultaron preñadas se calculó para cada experimento y se promedió luego entre diversos experimentos realizados en esta tesis. Se observó una disminución en el número de hembras del grupo HP que resultaron preñadas en relación con las hembras del grupo CP (Figura 3A). Así mismo, la alimentación de las madres con dieta hipoproteica resultó en una reducción significativa del número de crías en la camada comparado con hembras alimentadas con dieta control ($t_{23}=3,270$, $p=0,034$), con un rango de 4 a 13 y 6 a 16, respectivamente (Figura 3B).

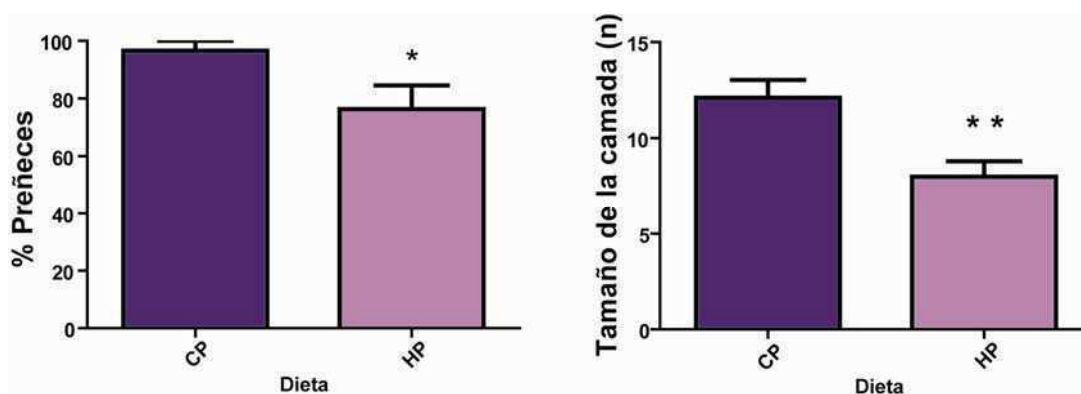


Figura 3: (A) Porcentaje de hembras preñadas para cada tratamiento. Cada valor corresponde al porcentaje de preñez en un ensayo. Media+EE Mann-Whitney n=6 ensayos * $p < 0,05$. (B) Tamaño de la camada para cada hembra a P0. Media+EE test *t*-Student n=10-15 para cada tratamiento ** $p < 0,01$.

2.3. Comportamiento materno.

2.3.1. Cuidado de las crías.

El cuidado que reciben las crías por parte de la madre durante la lactancia es un factor determinante en su desarrollo con efectos que perduran en la adultez y pueden ser transmitidos a generaciones posteriores (181). Por lo tanto, decidimos evaluar si el tipo de alimentación que recibía cada uno de los grupos de madres tenía algún efecto sobre el cuidado que proporcionaban a sus crías. Para ello realizamos observaciones de este comportamiento registrando la actividad de las madres. El comportamiento materno en el cuidado de las crías se relaciona en forma directa con el tiempo que se encuentran las madres en posición de amamantamiento, y el que le dedican a realizar tareas de acicalamiento (LG por *licking and grooming* en inglés) de las crías. Se encontraron diferencias significativas en el tiempo que las madres de ambos grupos dedicaban al acicalado de las crías ($t_{21}=2,816$, $p=0,0103$) (Figura 4A). Por el contrario, no se encontraron diferencias en el tiempo que las madres se encontraban en una posición de amamantamiento (Figura 4B), ni en el tiempo total que pasaban en el nido.

Llamativamente, se observó un alto grado de canibalismo en el grupo de madres HP llegando, en algunos casos, al 30% de la camada. Dado que este comportamiento no se observó en las madres de grupo de control y, teniendo en cuenta que el mismo no ha sido reportado como característico de la colonia CF1, el mismo puede atribuirse a la dieta hipoproteica.

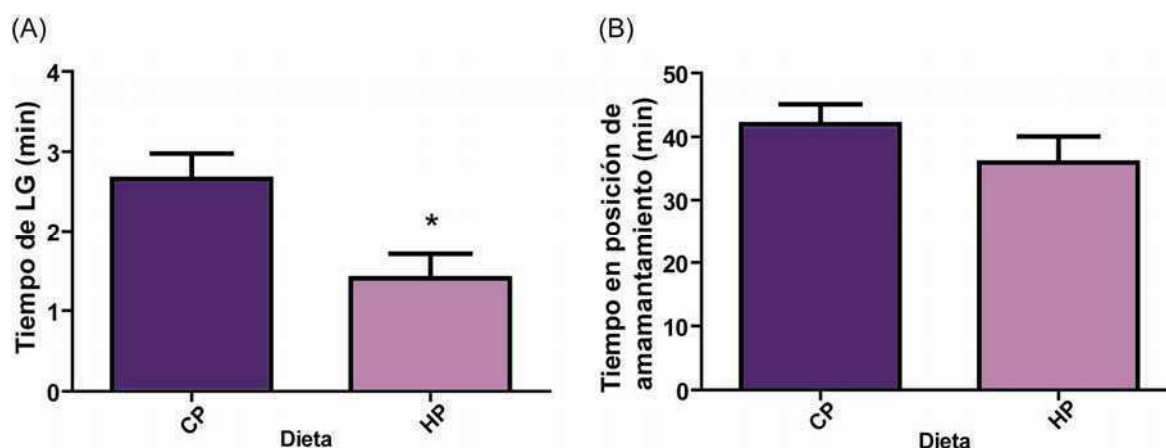


Figura 4: Cuidado materno medido como el tiempo que la madre dedica a realizar actividades de acicalamiento (LG) de las crías (A), y en una posición de amamantamiento (B). Media+EE test *t*-Student $n=10-13$ camadas analizadas para cada tratamiento * $p<0,05$.

Esta disminución en el tiempo dedicado al cuidado de las crías indica que la dieta afecta el comportamiento de la madre y debe ser tomada en cuenta al interpretar los

resultados que se presentan más adelante, debido a que la disminución del cuidado materno es un factor de estrés temprano para las crías.

2.3.2. Madres HP presentan un comportamiento de tipo ansioso.

El cambio en el cuidado de las madres hacia las crías sugiere que la dieta baja en proteínas podría ser un factor de estrés para las madres que alteraría su comportamiento. Este factor de estrés podría desencadenar en las madres la aparición de un comportamiento de tipo ansioso. Por este motivo, se decidió estudiar si las madres HP presentaban este tipo de comportamiento dos semanas luego del destete, utilizando para ello, los test de campo abierto y laberinto elevado en cruz.

Ambos son, para los ratones, test de conflicto entre dos comportamientos, la voluntad de exploración de nuevos espacios y la aversión generada por los ambientes expuestos. El laberinto en cruz cuenta con dos brazos con paredes elevadas, más protegidos y dos brazos sin paredes, más expuestos, dispuestos de forma perpendicular (ver Figura 5 Materiales y Métodos) y elevados del suelo. En la zona que se cruzan los brazos se delimita virtualmente además un espacio, el centro, en el que se realiza la transición entre los diferentes brazos. Se considera que aquellos ratones que exploran en menor medida los brazos abiertos, poseen un comportamiento con mayores rasgos de tipo ansioso (182).

El campo abierto se puede dividir virtualmente en dos zonas, una zona periférica adyacente a las paredes elevadas y una central, más expuesta. De forma análoga al laberinto elevado en cruz, se considera que aquellos ratones que exploran en menor medida el centro, poseen un comportamiento de tipo ansioso. No existe en el campo abierto una zona equivalente al “centro” del laberinto elevado en cruz.

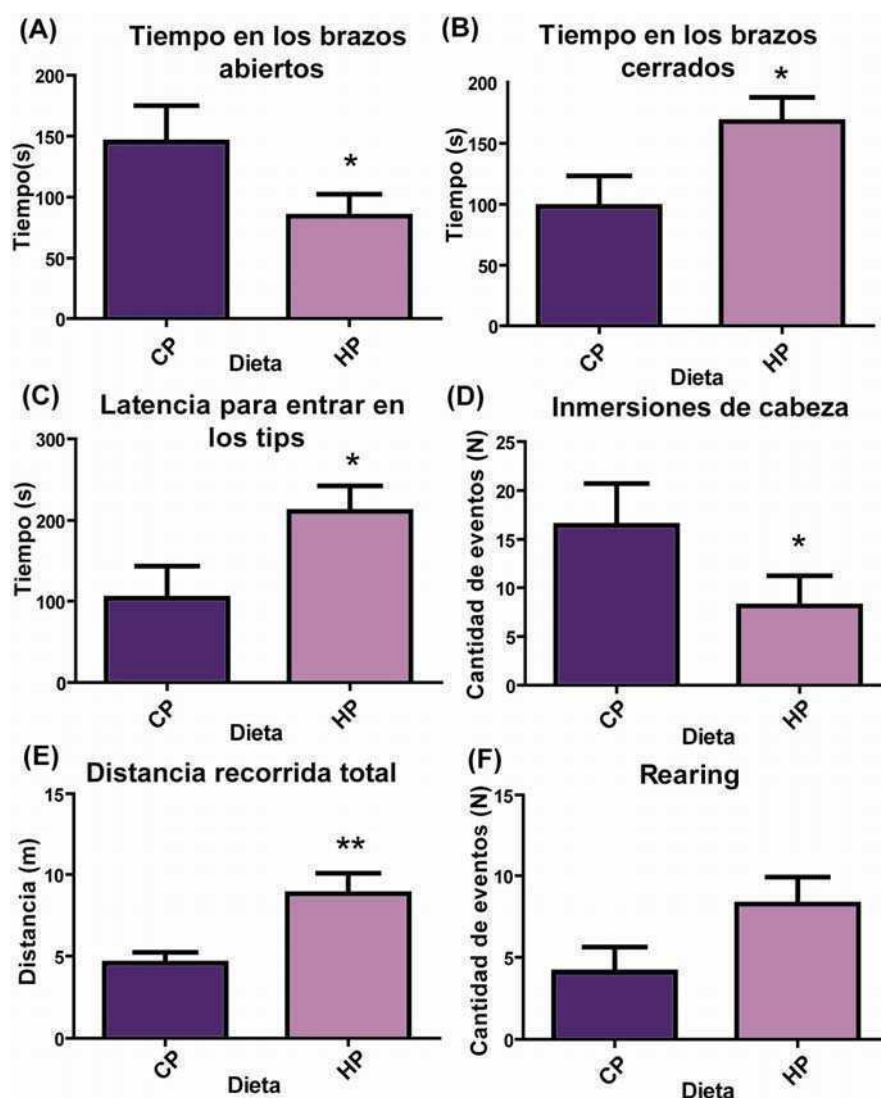


Figura 5: Laberinto elevado en cruz en la F0. La distancia recorrida total (m) (A), el tiempo en los brazos abiertos (s) (B), el tiempo en los brazos cerrados (s) (C), la latencia para ir a los tips (s) (D), el número de inmersiones de cabezas realizadas (E) y el número de rearings (F), fueron medidos utilizando el software ANY-Maze. Media+EE Mann-Whitney o test *t*-Student $n=8-14$ hembras para cada tratamiento * $p<0,05$ y ** $p<0,01$.

La administración de ansiolíticos incrementa en roedores la exploración de los brazos abiertos del laberinto en cruz y disminuye la inhibición sobre la exploración en el campo abierto (183).

La actividad en el laberinto, resumida en la Figura 5, reveló que las hembras alimentadas con la dieta hipoproteica pasaron menos tiempo en los brazos abiertos ($t_{22}=1,856$, $p=0,0384$) y más en los brazos cerrados ($t_{22}=2,164$, $p=0,0208$), resultados que estarían indicando la presencia de un comportamiento de tipo ansioso en las madres HP. La zona de las puntas de los brazos abiertos (*tips*) es la zona más alejada en su regreso al centro. De forma concordante con los resultados anteriores, las hembras HP tuvieron una mayor latencia para realizar la primera visita a esta zona ($U_{22}=40,00$, $p=0,0474$). El

número de inmersiones de cabeza, exploraciones asomando la cabeza de los brazos abiertos, fue menor en madres del grupo HP ($U_{22}=38,00$, $p=0,0399$), indicio también de una menor exploración de espacios expuestos. La distancia total recorrida por las madres HP ($t_{22}=2.901$, $p=0.0088$) fue mayor que la recorrida por las madres del grupo CP, indicando una hiperactividad locomotriz en las madres HP. El número de exploraciones en dos patas (*rearings*) ($t_{22}=1,695$, $p=0,1042$) y el tiempo de acicalamiento ($U_{22}=64,00$, $p=0,8554$) no fue diferente entre ambos grupos.

El test del campo abierto no arrojó diferencias significativas entre ambos grupos.

Estos resultados sugieren que las hembras alimentadas con la dieta hipoproteica presentan rasgos característicos de comportamiento de tipo ansioso, el cual podría estar influyendo en su interacción con las crías.

3. Crías de madres hipoproteicas presentan un retraso en el desarrollo físico y neurológico.

3.1. Evaluación del desarrollo físico.

Como ya mencionamos, el desarrollo de las crías está fuertemente influenciado por el medio ambiente. Por lo tanto, se estudió el efecto de la dieta materna hipoproteica durante la preñez y la lactancia sobre el desarrollo físico de las crías, evaluando diversos rasgos que se utilizan como marcadores del mismo.

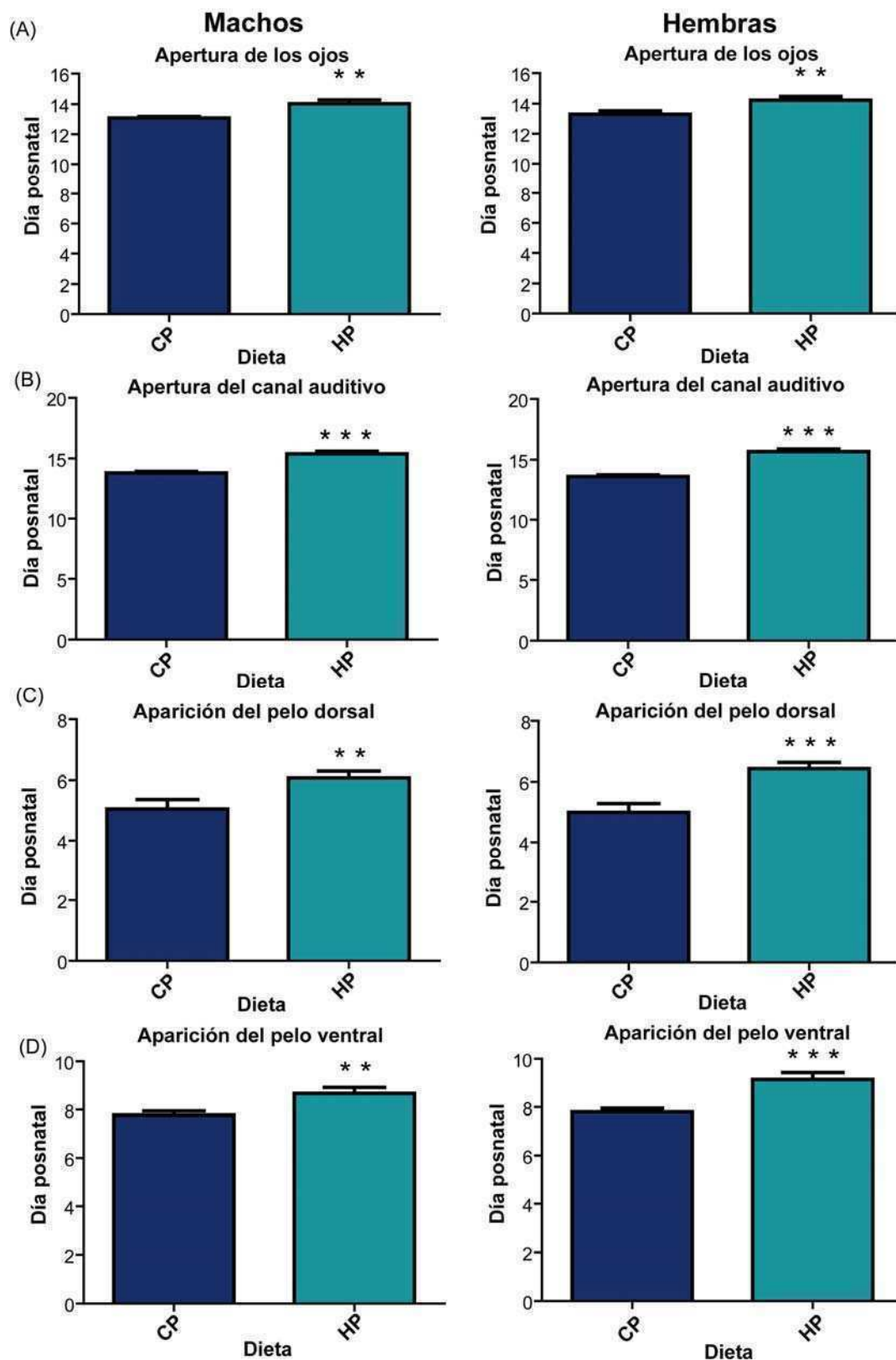


Figura 6: Desarrollo físico de las crías. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. Edad (días posnatal) de apertura de los ojos (A), de las orejas (B), de aparición del pelo dorsal (C) y ventral (D) fue registrado para cada individuo y promediado por camada. Media+EE Mann-Whitney o test *t*-Student $n=10-12$ para cada tratamiento y sexo, excepto para (B) donde $n=22-32$ ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$.

La dieta HP produjo un retraso significativo en la edad de apertura de los ojos (machos: $U_{19}=14,50$, $p=0,0025$; hembras: $U_{17}=14,500$, $p=0,0040$), del canal auditivo (machos $U_{51}=85,50$, $p<0,0001$; hembras y en la edad de aparición del pelo dorsal (machos: $t_{19}=2,833$, $p=0,0053$; hembras: $t_{17}=4,130$, $p=0,0004$) y ventral (machos: $U_{19}=19,00$, $p=0,0066$; hembras: $t_{17}=4,017$, $p=0,0004$) (Figura 6), no se encontraron diferencias en la edad de despegado del pabellón auditivo entre tratamientos (machos: $U_{19}=43,50$, $p=0,1658$; hembras: $U_{17}=33,00$, $p=0,1094$).

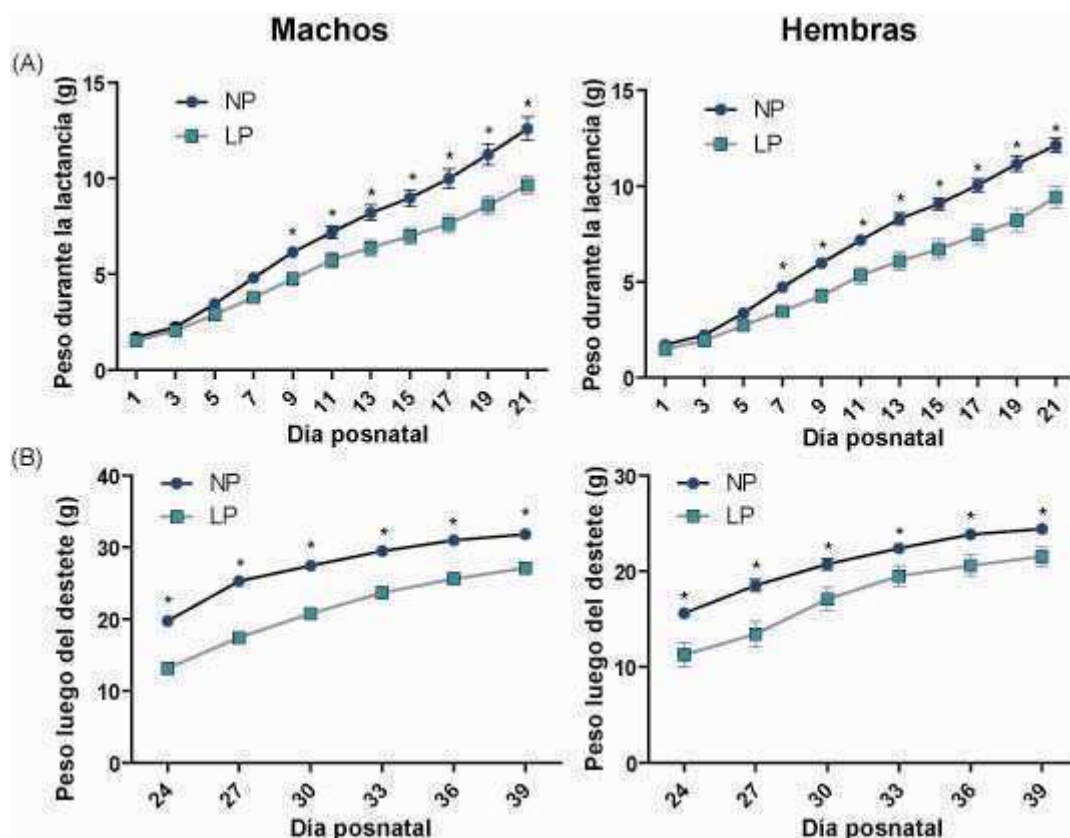


Figura 7: Aumento de peso de las crías. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. Para (A) se registró el peso de cada cría y se calculó un promedio para cada camada en los días posnatales indicados en el eje de las abscisas, $n=10-12$ camadas para cada tratamiento. Para (B) se eligieron unos pocos individuos de cada camada y su peso se midió en los días posnatales indicados en los ejes de las abscisas, $n=12-14$ individuos de cada sexo por tratamiento. Media \pm EE. ANOVA de dos factores medidas repetidas, test de Tukey *a posteriori* $*p<0,05$.

El peso de las crías de ambos sexos fue medido regularmente durante la lactancia y analizado por medio de un ANOVA de dos factores con medidas repetidas. El mismo reveló una interacción significativa entre la dieta y la edad (machos: $F_{10,200}=9,563$, $p<0,0001$; hembras: $F_{10,180}=10,10$, $p<0,0001$). El análisis *a posteriori* de Tukey indicó que

los pesos de las crías alimentadas con una dieta hipoproteica, de P9 a P21 para machos y de P7 a P21 para hembras, fue significativamente menor que el de sus respectivos controles (Figura 7A).

El peso de las crías machos y hembras se continuó registrando desde el destete, momento en que todas las crías comienzan a ser alimentadas con dieta estándar de bioterio, hasta las 6 semanas de vida. El ANOVA de dos factores con medidas repetidas reveló una interacción significativa entre los factores dieta y edad (machos: $F_{5,120}=9,298$, $p<0,0001$; hembras: $F_{5,115}=5,787$, $p<0,0001$). El análisis a *posteriori* de Tukey indicó que, tanto el peso de los machos como de las hembras del grupo HP, continuó siendo menor que el de los del grupo CP durante este período (Figura 7B).

Nuevamente no se incluyen las comparaciones entre días dentro de la dieta, para simplificar los gráficos.

En resumen, los resultados obtenidos hasta aquí nos indican que el contenido de proteínas de la dieta materna influye sobre el desarrollo de las crías. Las crías de ambos sexos del grupo HP mostraron un retraso para todos los parámetros físicos analizados.

3.2. Desarrollo neurológico.

En forma paralela se evaluó el impacto de una dieta materna baja en proteínas sobre el desarrollo de los reflejos neurológicos de las crías de ambos sexos. En primer lugar se determinó, entre los días P2 y P10, el reflejo de enderezamiento, un test que evalúa el desarrollo de la integración sensorial y motora de los ratones, a través de la medición del tiempo que tardan en enderezarse luego de ser colocados en una posición decúbito supino. Las crías, tanto machos como hembras, provenientes de madres del grupo HP presentaron un aumento significativo en el tiempo que demoraron en ejecutar el reflejo (Figura 8A). Un ANOVA de dos factores con medidas repetidas a lo largo de este período reveló una interacción no significativa entre la dieta y la edad para machos ($F_{8,136}=1,46$, $p<0,1774$). El efecto de la dieta fue significativo al comparar entre tratamientos ($F_{1,17}=13,14$, $p=0,0021$), siendo la latencia de los machos HP mayor a lo largo del período analizado. En hembras, la interacción entre los factores fue significativa ($F_{8,136}=2,197$, $p=0,0313$). El test a *posteriori* de Tukey indicó que la latencia para ejecutar la respuesta de los individuos HP fue mayor que la de los CP en los días P4 y P6, tanto para machos como para hembras. Estas diferencias desaparecieron, en ambos sexos, luego de P7.

La integración sensorial y motora fue evaluada, además, por el test de geotaxis negativa. En este test, se determina el reflejo que poseen los ratones mediante el cual,

luego de ser ubicados con la cabeza apuntando hacia abajo, cambian de posición para orientarse en dirección opuesta. El mismo fue medido entre P5 y P13 tanto en machos como en hembras (Figura 8B). El ANOVA de dos factores con medidas repetidas mostró un efecto significativo de la dieta (machos: $F_{1,16}=8,697$, $p=0,0094$; hembras: $F_{1,14}=14,39$, $p=0,0020$) y de la edad (machos: $F_{4,64}=5,369$, $p=0,0009$; hembras: $F_{4,56}=3,132$, $p=0,0215$) pero no en su interacción (machos: $F_{4,64}=1,238$, $p=0,3037$; hembras: $F_{4,56}=1,054$, $p=0,3879$). El análisis *a posteriori* indicó que las diferencias entre ambos tratamientos, tanto para machos como para hembras, eran significativas solo a P7, siendo la latencia mayor en las crías del grupo HP. Estos resultados indican que la alimentación de las madres afecta la ejecución de este reflejo por parte de las crías, definida como la latencia para girar 90° de la posición original en la que son colocados.

A continuación realizamos el test de fuerza de agarre para evaluar la fuerza y coordinación neuromuscular en machos y hembras de ambos grupos. La interacción entre la dieta y la edad no fue significativamente diferente entre ambos grupos, por lo que se prosiguió con el análisis de los efectos principales (machos: $F_{4,72}=0,6367$, $p=0,6385$; hembras: $F_{1,64}=1,142$, $p=0,3451$). Se encontró una diferencia significativa en el efecto principal de la edad (machos: $F_{4,72}=50,92$, $p<0,0001$; hembras: $F_{4,64}=48,55$, $p<0,0001$), pero no se encontraron diferencias entre dietas, indicando que esta característica del desarrollo no se encuentra afectada, en las condiciones estudiadas, por la menor cantidad de proteínas en la dieta materna, (machos: $F_{1,18}=0,3329$, $p=0,5711$; hembras: $F_{1,16}=1,410$, $p=0,2524$) (Figura 8C)

Como se mostró en la sección anterior, al analizar el desarrollo físico de los ratones, encontramos un retraso en la edad de apertura del canal auditivo en el grupo proveniente de madres HP tanto para machos como para hembras. Por este motivo decidimos estudiar el desarrollo auditivo de las crías de ambos grupos realizando un test de sobresalto frente a la presentación de un sonido, a diferentes días posnatales. Los ratones de ambos sexos provenientes de madres HP mostraron una respuesta significativamente atenuada en P15 (test exacto de Fisher, machos $p=0,0218$; hembras $p=0,0218$) y en P16 (test exacto de Fisher, machos $p=0,0146$; hembras $p=0,0059$) comparada con la respuesta de los ratones provenientes de madres CP. Estas diferencias desaparecieron en P17 (test exacto de Fisher, machos $p=0,0626$; hembras $p=0,0626$) (Figura 8D).

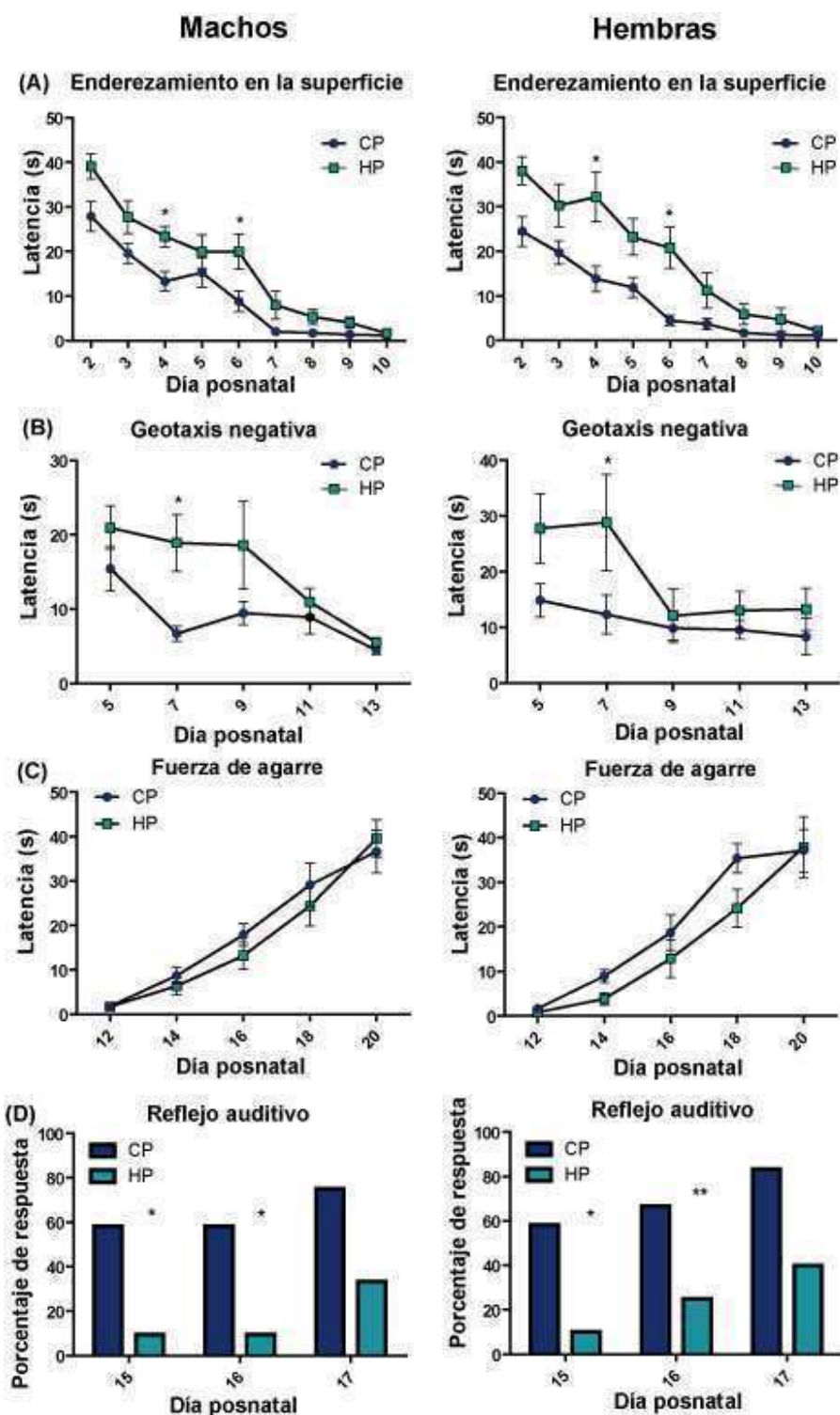


Figura 8: Reflejos neurológicos. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. La latencia para ejecutar el reflejo de enderezamiento de la superficie (A), la geotaxis negativa (B) y la latencia para caerse en el test de fuerza de agarre (C); fueron medidos a diferentes días posnatales, como se indica en el eje de las abscisas. Los valores de tiempo para cada camada (n) se obtuvieron como el promedio de todos los individuos del mismo sexo de la camada en el P indicado. Media \pm EE. ANOVA de dos factores con medidas repetidas, Test de Tukey a posteriori. n=7-12 para cada tratamiento *p<0.05. (D) reflejo auditivo. Porcentaje de individuos de cada tratamiento que mostraron un reflejo de sobresalto frente a la presentación de un sonido. Test exacto de Fisher n=10-21 para cada tratamiento y sexo. *p<0.05.

En conjunto estos resultados indican que una alimentación deficiente en proteínas durante la etapa perinatal afecta profundamente el desarrollo físico y neurológico de los ratones independientemente del sexo.

4. Evaluación de distintos aspectos comportamentales de la F1.

Como se ha mencionado en secciones anteriores de la tesis, la presencia de un factor de estrés durante el desarrollo afecta profundamente el comportamiento de las crías, aún después de la desaparición del mismo.

Nuestro objetivo es estudiar la malnutrición proteica restringida a una etapa perinatal. Por este motivo, luego del destete las crías son alimentadas con dieta estándar de bioterio. Todas las mediciones realizadas en ratones de más de tres semanas incluyen diferentes períodos de rehabilitación alimenticia, de acuerdo a la edad en que fue realizada la observación.

En la Figura 9 se esquematiza la secuencia de test comportamentales (sección 4) y cognitivos (sección 5) que se han utilizado para evaluar estas características en la F1.

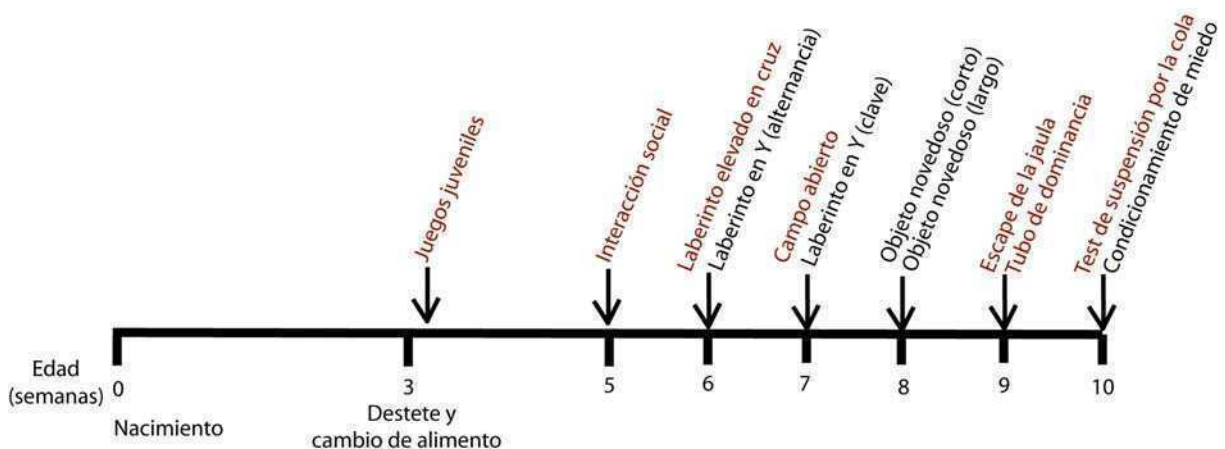


Figura 9: Línea temporal de realización de los test en relación a las semanas luego del nacimiento de la F1. En rojo test orientados a evaluar características comportamentales de la F1, en negro aquellos orientados a las características cognitivas. Aquellos que fueron realizados en la misma semana corresponden a tandas experimentales diferentes.

4.1. Características sociales de la F1.

4.1.1. Juegos juveniles.

Los comportamientos sociales de juego pueden dar lugar a estrategias útiles en la vida adulta y preparar al individuo para futuras contingencias ambientales. Dado que distintas situaciones de estrés alteran la disposición de los roedores para actividades

sociales, nos preguntamos si el comportamiento de juego juvenil podría verse afectado por la malnutrición proteica materna. Para analizar esta característica se armaron parejas formadas por un individuo de cada uno de los grupos, de la misma edad y género y pesos lo más similares posibles. Ambos ratones fueron colocados en un área novedosa y se los filmó durante 30 minutos. Sobre el video se registró el número de veces que cada individuo de la pareja realizó actividades orientadas a iniciar el juego (arrastrarse por encima o por debajo del compañero, empujar y acercarse por la cabeza) y a la investigación del compañero (olfateo anogenital, de la nariz, cuerpo y seguimiento por la caja).

En lo que respecta a la frecuencia de actividades relacionadas con la solicitud de juego (Figura 10), el número de veces que el ratón HP de la pareja se acercó a la cabeza de su compañero fue menor que la de los respectivos controles, tanto para machos como para hembras (machos: $t_{10}=3,889$, $p=0,0015$; hembras: $t_6=3,313$, $p=0,0081$). La frecuencia con la que el miembro control de la pareja, macho o hembra, realizó las actividades investigativas de olfateo anogenital (machos: $t_{10}=1,900$, $p=0,0433$; hembras: $t_6=2,105$, $p=0,0399$) y de nariz fue mayor que la de los miembros HP (machos: $t_{10}=2,319$, $p=0,0214$; hembras: $t_6=5,359$, $p=0,0009$), mientras que el olfateo en otros sectores del cuerpo fue similar entre ambos miembros de la pareja (machos: $t_{10}=0,2040$, $p=0,4212$; hembras: $t_6=0,1307$, $p=0,4501$) (Figura 11).

No se encontraron diferencias entre grupos para el tiempo que dedicaban a otras actividades de interacción social (contacto pasivo y *grooming* social).

Estos resultados indicarían que las actividades investigativas y de solicitud de juego se ven disminuidas en individuos que sufrieron de malnutrición proteica durante la etapa perinatal.

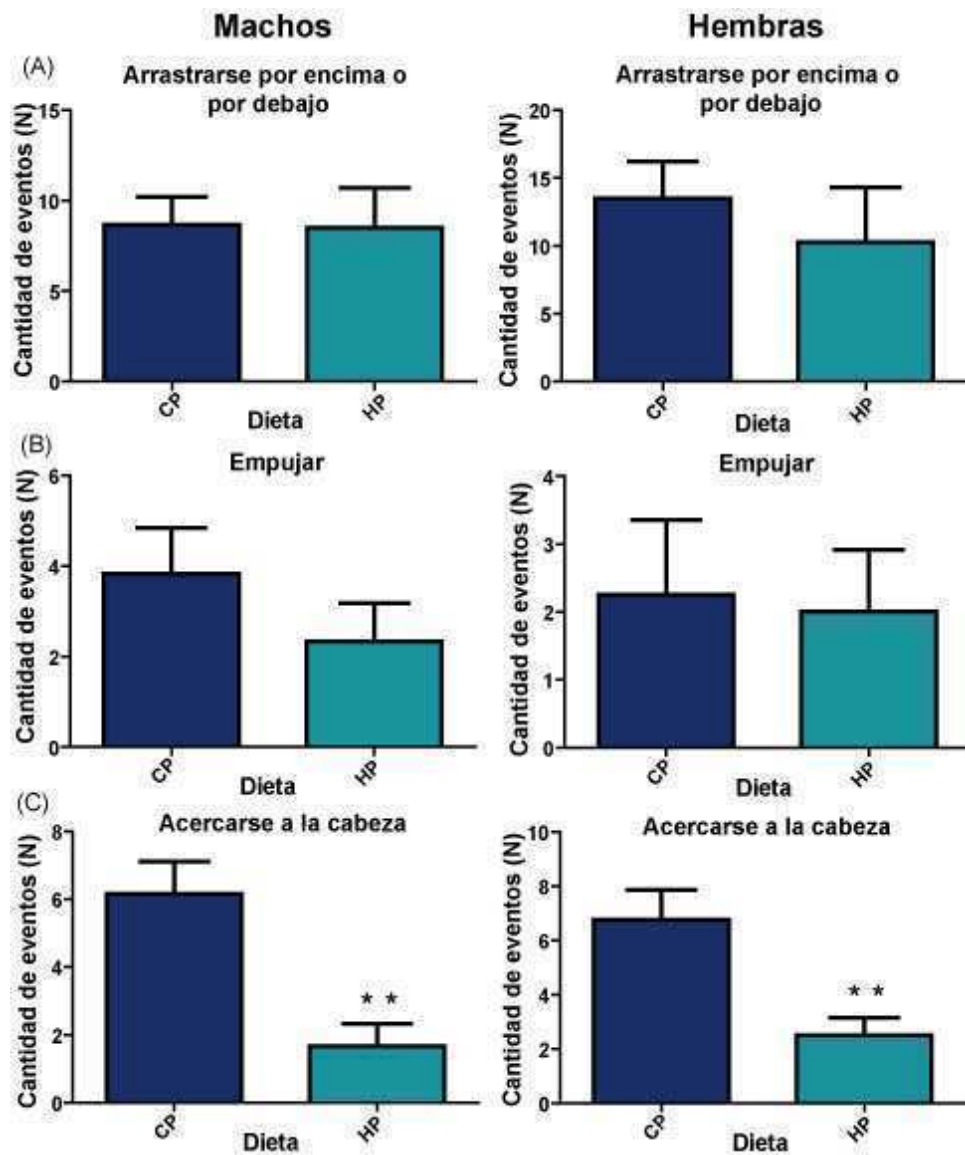


Figura 10: Juegos juveniles. Actividades de solicitud de juego. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. Número de veces que un ratón del tratamiento indicado en el eje de las abscisas se arrastró por encima o debajo de su compañero (A), o lo empujó (B), o se acercó por la cabeza al mismo (C). Media+EE Mann-Whitney o test *t*-Student, para cada tratamiento n=4 hembras o n=6 machos ** $p < 0,01$.

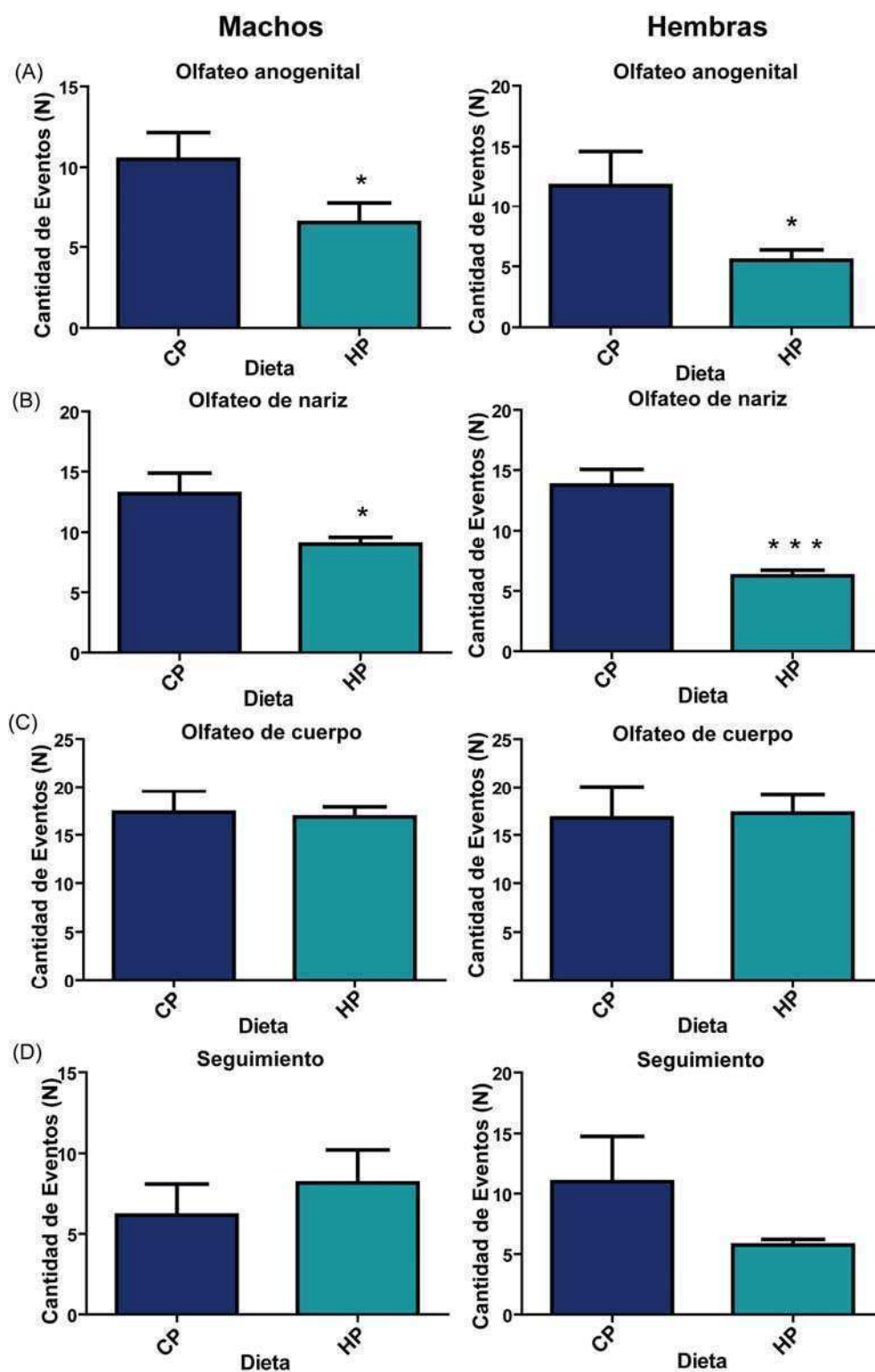


Figura 11: Juegos juveniles. Actividades de investigación del compañero. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. Número de veces que un ratón del tratamiento indicado en el eje de las abscisas olfateó la región anogenital (A), nariz (B), el cuerpo (C) o siguió a su compañero del otro tratamiento. Media+EE Mann-Whitney o test *t*-Student, para cada tratamiento $n=4$ hembras o $n=6$ machos * $p<0,05$ y *** $p<0,001$.

4.1.2. Interacción social.

Con el fin de continuar estudiando los comportamientos sociales en nuestro modelo realizamos el test de interacción social dos semanas después del estudio de los juegos juveniles. Los ratones de ambos grupos dedicaron el mismo tiempo a explorar ambos cilindros (machos: $t_{15}=0,7980$, $p=0,2187$; hembras: $t_9=0,4932$, $p=0,3169$) y mostraron el mismo nivel de preferencia por el cilindro conteniendo al ratón estímulo (machos: $t_{15}=0,7992$, $p=0,2183$; hembras: $t_9=0,0268$, $p=0,4896$) (Figura 12).

Esto nos indicaría que en una situación de escaso contacto con ratones estímulo más pequeños, lo cual genera una disminución en el componente de estrés de la novedad social, los individuos del grupo HP no mostraron diferencias en el interés por el nuevo individuo con respecto a los controles.

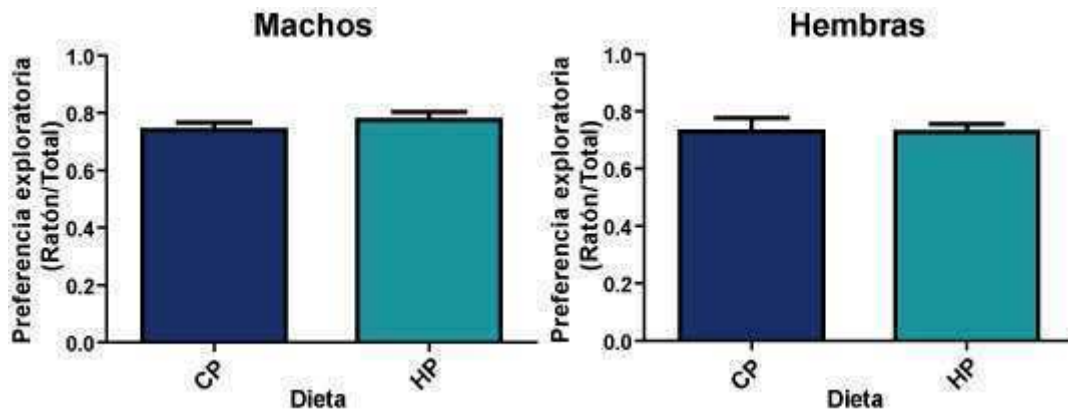


Figura 12: Interacción social. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. La preferencia social se expresó como el tiempo que el ratón testeado dedicó a investigar el cilindro con el ratón novedoso sobre el tiempo que se dedicó a explorar ambos cilindros. Media+EE test *t*-Student *t*-test $n=6-12$ machos o $n=5-7$ hembras de cada tratamiento.

4.1.3. Dominancia social.

En base a los resultados anteriores, decidimos investigar si los ratones del grupo HP presentaban un mayor nivel de sumisión social de adultos al ser confrontados con individuos novedosos de la misma edad. Para esto se utilizó el test del tubo de dominancia en el cual se coloca un ratón de cada tratamiento del mismo sexo, edad y de pesos similares, en extremos opuestos de un tubo transparente. Los mismos interactúan en el medio del aparato considerándose dominante a aquel que logra expulsar al otro del tubo. Este test ha sido utilizado por otro grupo tanto en machos como hembras, por lo que es útil para estudiar la sumisión social en ambos sexos (184).

No se encontraron diferencias en el número de victorias (eventos de dominancia) entre ambos tratamientos, para ambos sexos (test exacto de Fisher con respecto al azar, machos $p=1$; hembras $p=1$).

Las respuestas sociales de los individuos HP resultaron ser complejas. No se encontró una diferencia en el interés por la novedad social medida por el test de interacción, ni en el nivel de sumisión frente a un ratón novedoso de la misma edad. De acuerdo a nuestros resultados, la alteración en el comportamiento social se restringe a la etapa juvenil, en ratones del grupo HP.

4.2. Estudio del nivel de motivación exploratoria de la F1.

Realizamos el test de escape de la jaula con el fin de evaluar el efecto de la malnutrición proteica sobre la motivación y coordinación neuromuscular de las crías.

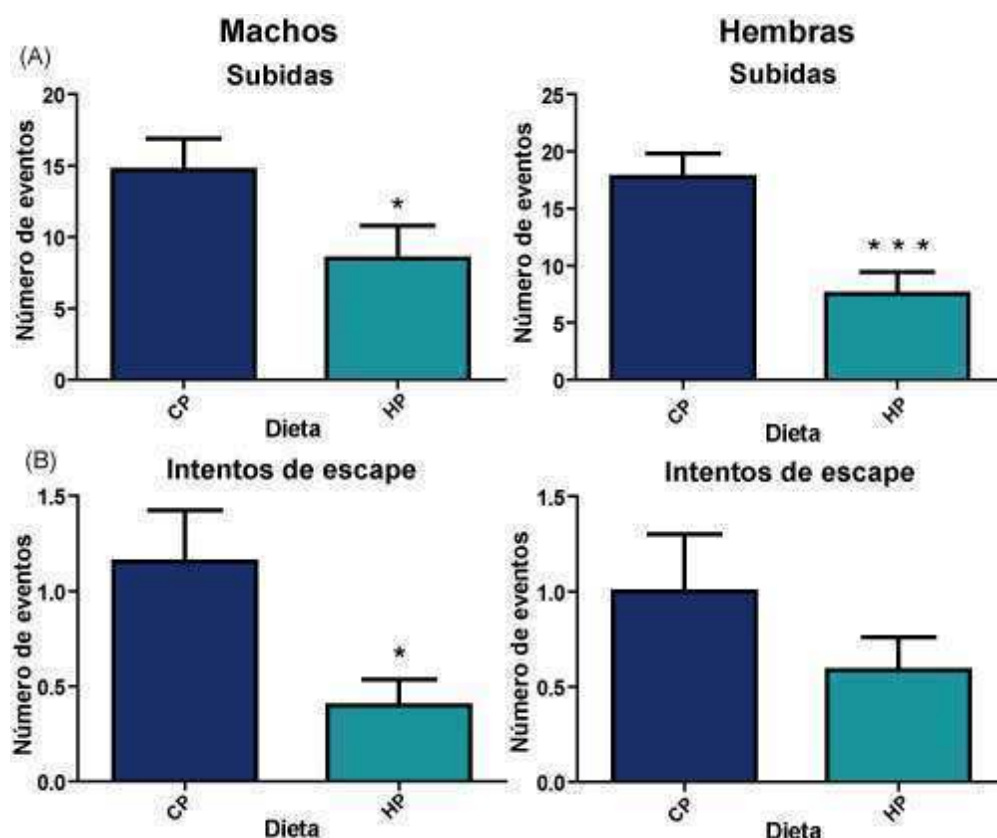


Figura 13: Escape de la jaula. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. (A) Número de subidas a la pared (número de veces que las patas traseras del animal abandonaron la base de la jaula). (B) Número de escapes (número de veces que el cuerpo entero del animal abandonó la base de la jaula). Media+EE Mann-Whitney $n=26-20$ machos o $n=19-21$ hembras para cada tratamiento. * $p<0.05$ y *** $p<0.001$.

Tanto los machos ($U_{44}=169,0$, $p<0,0219$) como las hembras ($U_{38}=76,00$, $p<0,0004$) del grupo HP realizaron un número significativamente menor de subidas a la pared de la

jaula (Figura 13A). De forma similar un número menor de intentos de escape fueron observados en machos ($U_{44}=190,0$ $p<0,0435$), pero no en hembras ($U_{36}=158,0$, $p<0,2611$) del grupo HP con respecto al CP (Figura 13B). Estos resultados nos estarían indicando que la coordinación neuromuscular y la motivación de exploración se encuentran disminuidas en miembros del grupo HP.

4.3. Crías malnutridas perinatalmente poseen un comportamiento de tipo ansioso.

El estrés perinatal, tal como se mencionó en la introducción, puede inducir trastornos relacionados con la ansiedad en las crías. Por este motivo, decidimos explorar si la malnutrición durante el desarrollo puede inducir la aparición de este tipo de comportamientos, ya observados en las madres HP.

4.3.1. Test de campo abierto.

Se midió la actividad de los ratones en relación a las dos zonas virtuales del campo abierto, una periférica y una central. Como se mencionó anteriormente, la última es una zona de mayor exposición y es menos visitada por ratones que presentan un mayor componente tipo ansioso en su comportamiento.

La latencia para entrar en la zona central fue significativamente mayor, para ambos sexos, en ratones del grupo HP (machos: $U_{44}=113,0$, $p=0,0006$; hembras: $U_{36}=87,00$, $p=0,0038$), resultado que es consistente con un mayor componente ansioso en el comportamiento (Figura 14A). De forma congruente, los ratones que sufrieron de una malnutrición proteica durante el desarrollo dedicaron un tiempo menor a la exploración de la zona central (machos: $U_{44}=128,0$, $p=0,0036$; hembras: $U_{36}=86,50$, $p=0,0072$) (Figura 14B) y recorrieron una menor distancia en la misma (machos: $U_{44}=125,0$, $p=0,0014$; hembras: $t_{36}=90,0$, $p=0,0049$) (Figura 14C). Además, los ratones de ambos sexos del grupo HP realizaron un menor número de exploraciones verticales (*rearings*) (machos: $U_{44}=115,5$, $p=0,0007$; hembras: $U_{36}=89,0$, $p=0,0045$) que sus respectivos controles (Figura 4D). Esta disminución en el número de *rearings* es también indicio de una menor motivación exploratoria y de una mayor ansiedad.

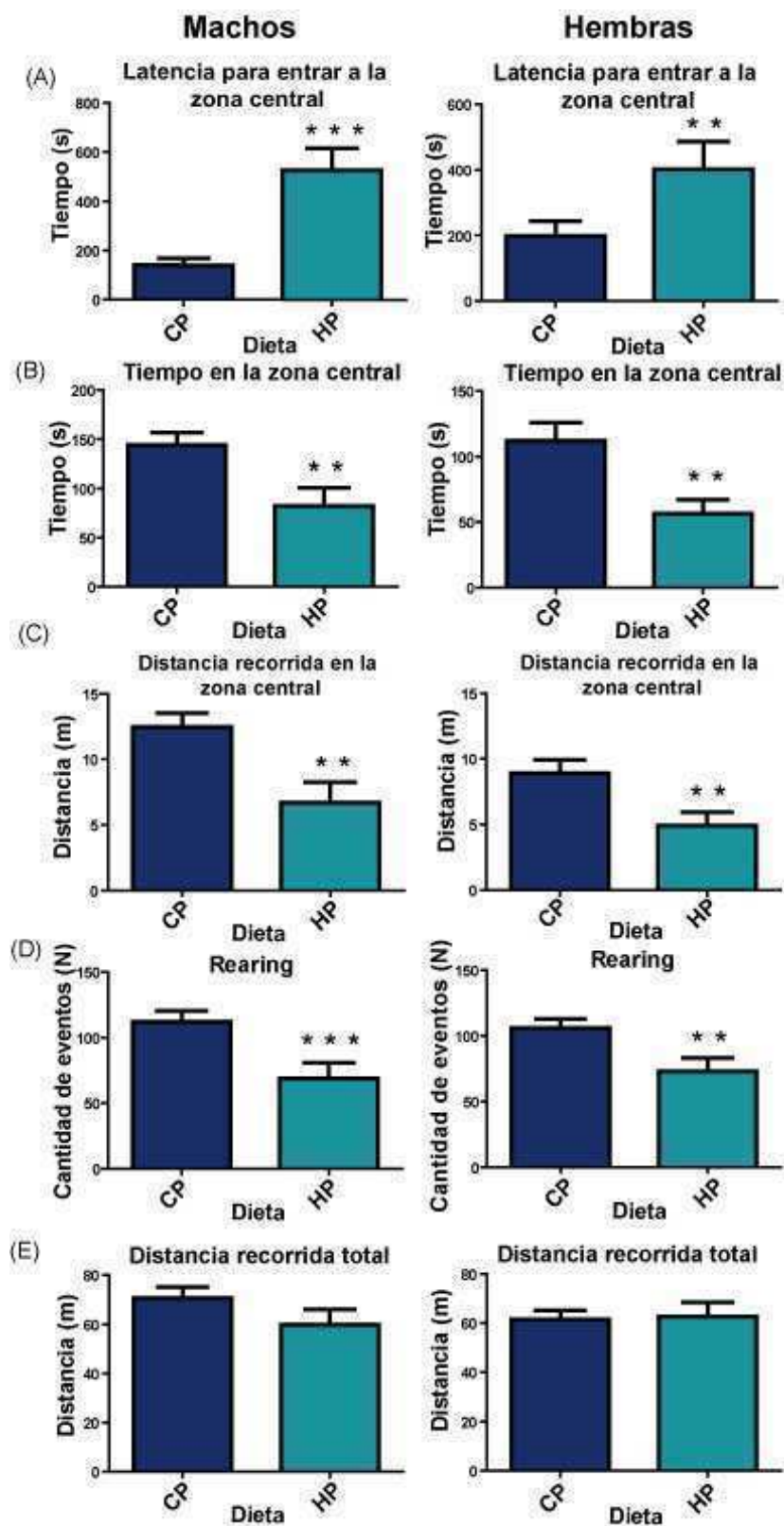


Figura 14: Campo Abierto. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. Latencia para entrar a la zona central (s) (A), Distancia recorrida en la zona central (m) (B), Tiempo en la zona central (s) (C), Cantidad de *rearings* en ambas zonas (D), Distancia recorrida total (E) Media+EE Mann-Whitney o test *t*-Student. n=26-20 machos o n=19-21 hembras para cada tratamiento. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Sin embargo, los ratones de ambos grupos recorrieron una distancia total similar, lo que indicaría que no difirieron significativamente en su actividad locomotriz (machos: $t_{44}=1,463$, $p=0,0753$; hembras: $U_{36}=174,0$, $p=0,4533$) (Figura 14E).

4.3.2 Laberinto elevado en cruz

A continuación se evaluó el desempeño de los ratones en el laberinto elevado en cruz de la misma forma que fue utilizado para la F0.

La distancia recorrida en los brazos abiertos fue significativamente menor en ratones HP comparados con el grupo CP (machos: $U_{26}=55,00$, $p=0,0424$; hembras: $t_{16}=2,626$, $p=0,0092$) (Figura 15A), pero de la misma manera fue menor la distancia total recorrida durante los 5 minutos del test (machos: $t_{25}=4,054$, $p=0,0002$; hembras: $U_{24}=37,00$, $p=0,0084$) (Figura 15B) sugiriendo, en este caso, una disminución de la actividad exploratoria general más que una preferencia por los brazos cerrados. Confirmando esto, el cociente entre la distancia recorrida en los brazos abiertos y la total, no arrojó diferencias entre grupos (machos: $U_{26}=78,00$, $p=0,37$; hembras: $U_{24}=61,00$, $p=0,2472$).

El número de inmersiones de cabeza en los brazos abiertos no mostró diferencias significativas entre ambos grupos, pero tanto machos como hembras HP realizaron un menor número de inmersiones de cabeza con el cuerpo en la zona protegida (machos: $t_{26}=2,551$, $p=0,0085$; hembras: $t_{24}=3,789$, $p=0,0004$) (Figura 15C). Notoriamente, solo los machos del grupo hipoproteico pasaron menos tiempo en los *tips* de los brazos abiertos ($U_{26}=60,00$, $p=0,0177$) (Figura 15E) y realizaron un menor número de *rearings* ($U_{26}=35,00$, $p=0,0020$) que sus respectivos controles (Figura 15D).

Los resultados obtenidos en el test de campo abierto indican que la administración de una dieta hipoproteica a las madres, provoca en las crías la aparición de un comportamiento de tipo-ansioso. En el laberinto elevado en cruz, se encontró que las crías HP exploraban el ambiente en menor medida, resultado consistente con el obtenido para el test de escape de la jaula. Dos características del laberinto elevado, el número de exploraciones verticales y el tiempo en los *tips* de los brazos abiertos, fueron significativamente menores solo en machos del grupo HP. Estos resultados sugerirían que para las características medidas, los machos poseerían una sensibilidad incrementada a la dieta con un menor contenido de proteínas.

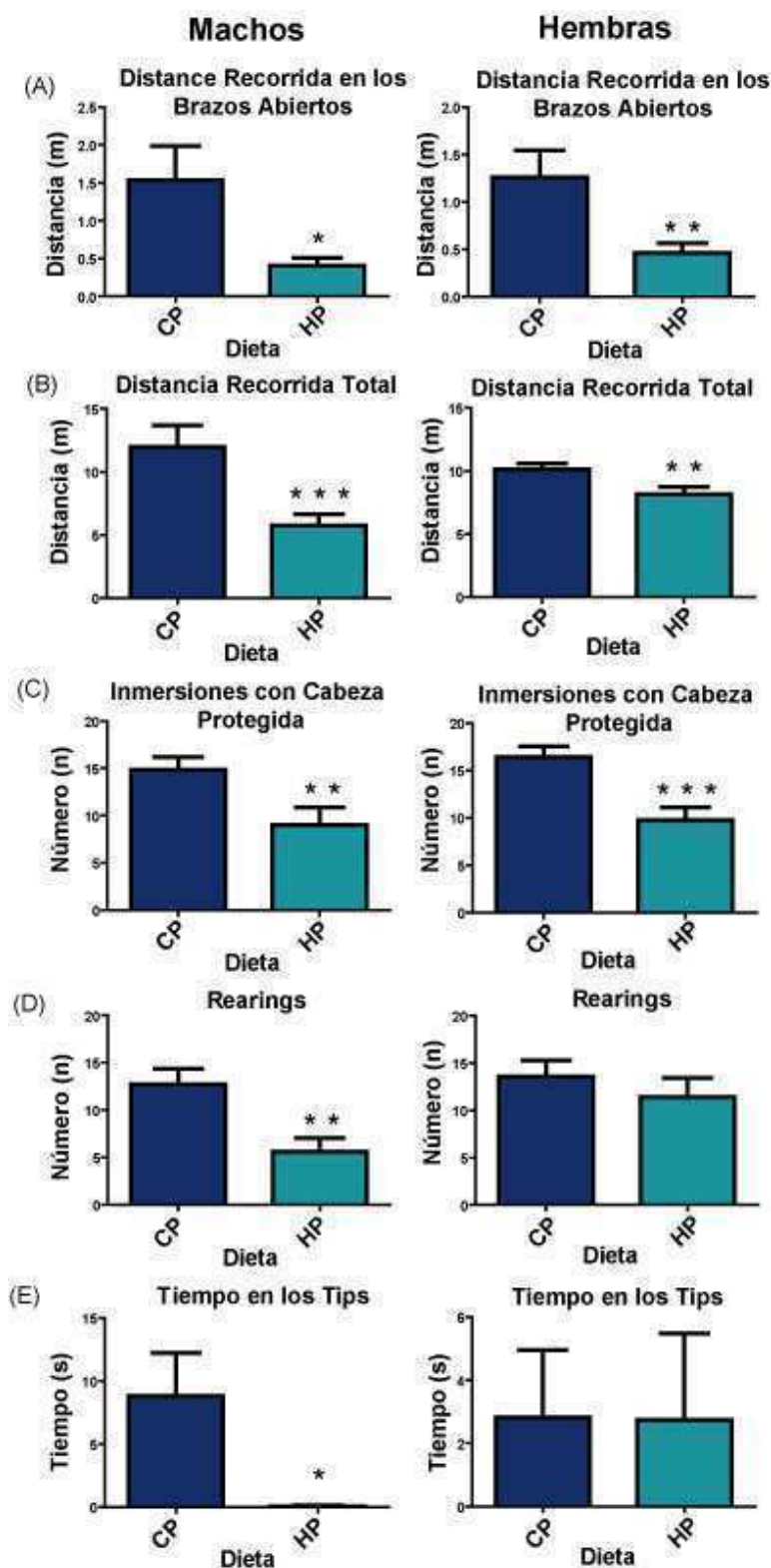


Figura 15: Laberinto elevado en cruz-Brazos Abiertos. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. La distancia recorrida en los brazos abiertos (m) (A), la distancia recorrida total (m) (B), el número de inmersiones de cabeza con el cuerpo ubicado en la plataforma central (C), el número de exploraciones verticales (*rearings*) (D) y el tiempo en las puntas (*tips*) de los brazos abiertos, fueron medidos con el programa ANY-Maze. Media+EE Mann-Whitney o test *t*-Student $n=14$ machos y $n=12-14$ hembras para cada tratamiento * $p<0,05$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$.

4.4. Hembras malnutridas perinatalmente presentaron un comportamiento de tipo depresivo medido por el test de suspensión por la cola.

La desesperanza, un comportamiento relacionado con la depresión, fue evaluada mediante el ensayo de suspensión por la cola, utilizando el tiempo de inmovilidad en el mismo. Este test ha sido ampliamente empleado en modelos de depresión debido a que la administración de depresivos disminuye el tiempo de inmovilidad en ratones.

Encontramos un efecto significativo de la malnutrición proteica durante el desarrollo en ratones hembras del grupo hipoproteico cuando se las comparó con sus respectivos controles ($U_8=2,000$, $p=0,0159$) (Figura 16).

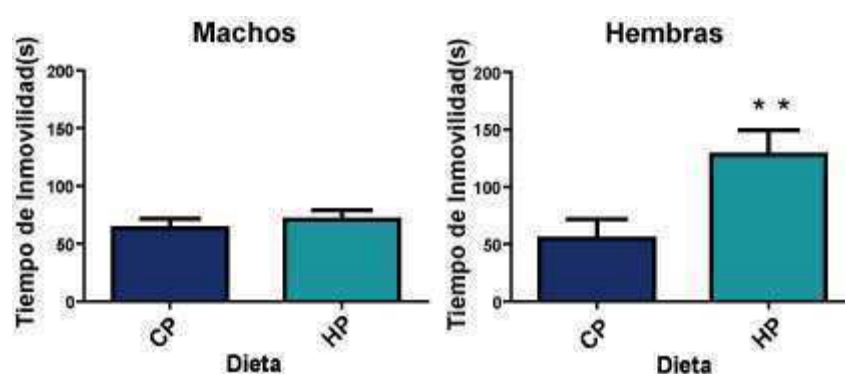


Figura 16: Test de suspensión por la cola. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. Tiempo total de inmovilidad (s) para una sesión de 6 minutos. Media+EE Mann-Whitney $n=12-6$ machos y $n=6-5$ hembras para cada tratamiento ** $p<0,01$

Este resultado diferencial entre sexos concuerda con lo observado en humanos, donde las mujeres tienen un 70% más de probabilidad de sufrir de trastornos de ánimo depresivo (185).

5. Evaluación de diversas características cognitivas en la F1.

Numerosos estudios epidemiológicos en humanos han ligado a la malnutrición con deficiencias cognitivas en niños de edad escolar. Sin embargo, hay escasa bibliografía acerca de los efectos cognitivos a largo plazo en humanos en caso de restringirse la malnutrición a una etapa temprana de la vida. Trabajos realizados en roedores han arrojado resultados contradictorios acerca del efecto de la malnutrición luego de un período de recuperación alimenticia (186). Por otro lado, el potencial efecto diferencial de la malnutrición entre los sexos ha sido largamente ignorado. En consecuencia decidimos evaluar las capacidades cognitivas en ratones adultos (sexualmente maduros) de ambos

sexos luego de varias semanas de recuperación alimenticia, utilizando una serie de test que cubren diferentes aspectos de la memoria.

5.1. Aprendizaje espacial.

5.1.2. Alternancia espontánea en el laberinto en Y.

Este test está diseñado para estudiar la memoria de trabajo relacionada con el aprendizaje espacial de los roedores haciendo uso de la motivación que poseen los mismos por explorar nuevos ambientes. En este test se deja explorar a los roedores libremente un laberinto en Y, y se toma la proporción de alternancias correctas (3 visitas consecutivas a 3 brazos diferentes), como medida de memoria de trabajo. Este tipo de memoria es la que mantiene una representación de la información por un período corto de tiempo, que luego está disponible para un uso posterior (187).

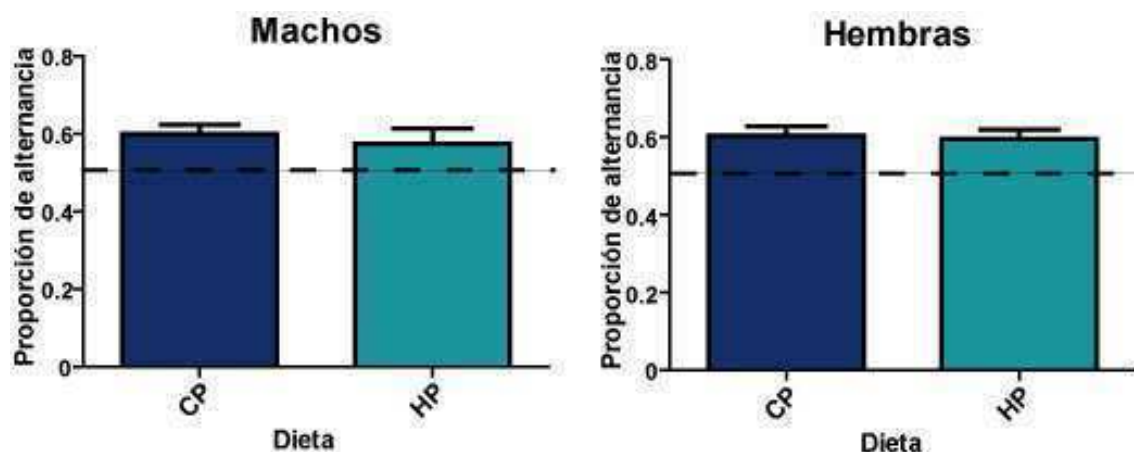


Figura 17: Laberinto en Y, alternancia espontánea. Machos (izquierda) y hembras (derecha) fueron analizados por separado. Proporción de alternancia medida como la relación entre el número de entradas consecutivas en cada uno de los brazos y el número de entradas totales menos dos. La línea punteada indica la probabilidad esperada por el azar (0,5). Media+EE test *t*-Student $n=12$ machos y $n=12$ hembras para cada tratamiento.

El número de alternancias correctas fue mayor a la esperada por el azar en todos los casos (Figura 17), pero no se encontraron diferencias entre ratones del grupo CP y el grupo HP, tanto para machos como para hembras (machos: $t_{22}=0,5608$, $p=0,2903$; hembras: $t_{22}=0,2211$, $p=0,4135$). Esto nos indicaría que la memoria de trabajo relacionada con el aprendizaje espacial no se encuentra afectada por la malnutrición durante el desarrollo.

5.1.2. Aprendizaje espacial. Memoria de corto término.

Se utilizó el laberinto en Y en un test de memoria de reconocimiento en dos sesiones, cuyo desempeño no depende del aprendizaje de una regla por parte del individuo,

ya que utiliza la tendencia innata que poseen los ratones por explorar ambientes nuevos (188). El test se realizó en las mismas condiciones de luz que el laberinto en Y de alternancia espontánea, donde no se observó un efecto de aversión por el espacio nuevo. En la primera sesión se colocó a los individuos en la base del brazo de salida y se le permitió explorar el laberinto con un brazo cerrado (brazo objetivo), durante 8 minutos. Luego de 20 minutos en una jaula similar a la de alojamiento, se lo colocó nuevamente en el brazo de salida, ahora con el brazo disponible abierto. Un tiempo de retención de 20 minutos nos permitió evaluar la memoria de corto término, es decir la capacidad de guardar pequeñas cantidades de información durante un período acotado.

El test se realizó con claves espaciales exteriores al laberinto, ubicadas al final de cada brazo. Se evaluaron los siguientes parámetros: primer brazo al que ingresan luego de abandonar el brazo de salida, el tiempo que pasaron en el brazo objetivo y el número de entradas realizadas al mismo. La primera elección refleja el porcentaje de individuos que reconocieron el brazo novedoso (memoria de discriminación), el segundo parámetro refleja el comportamiento inspectivo (comportamiento exploratorio) y el número de entradas el comportamiento inquisitivo (respuesta a la novedad) (188).

No se encontraron diferencias en la elección de la primera entrada para ambos sexos con el test exacto de Fisher (machos: $p=0,2950$, $n=12$ para cada tratamiento; hembras: $p=0,6111$, $n=11-12$ para cada tratamiento) (Figura 18A). Al estudiar el tiempo que permanecieron en el brazo objetivo encontramos que el mismo fue significativamente mayor en machos del tratamiento CP, cuando se lo comparó con los HP (machos: $t_{20}=1,919$, $p=0,0347$; hembras: $t_{16}=0,7331$, $p=0,2370$) (Figura 18B). Es decir que, aunque el reconocimiento del brazo en relación a la primera entrada fue igual en ambos casos, lo cual indica que los ratones de ambos grupos pudieron aprender de igual forma, el comportamiento exploratorio de los individuos HP se encuentra afectado. No se encontraron diferencias entre grupos en cuanto a la respuesta a la novedad, medida como el número de entradas al brazo novedoso (machos: $t_{22}=0,9112$, $p=0,1860$; hembras: $t_{21}=0,1102$, $p=0,4566$) (Figura 18C).

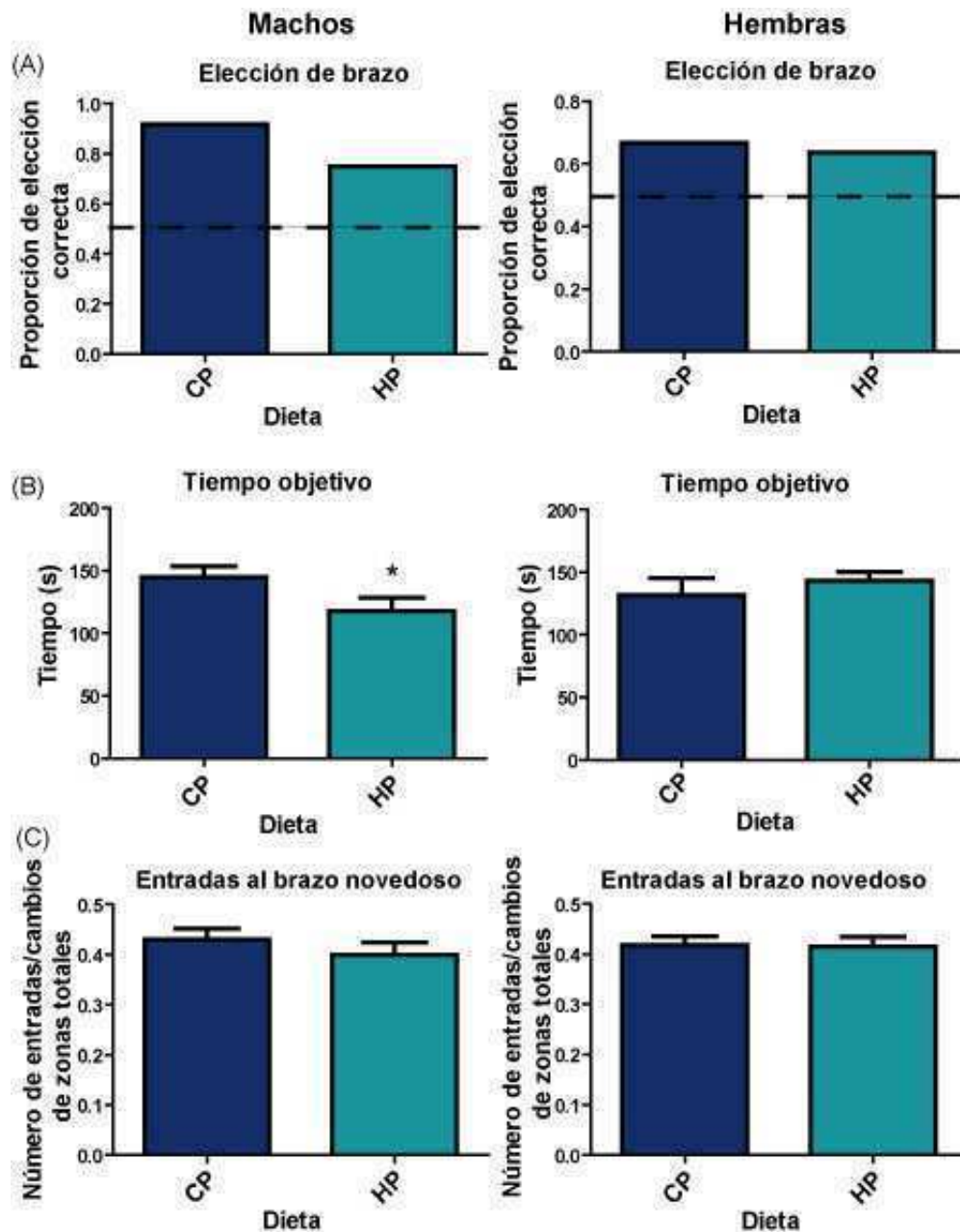


Figura 18: Laberinto en Y, entrenamiento con claves. Machos (izquierda) y hembras (derecha) fueron analizados por separado. Proporción de individuos que se dirigieron primero al brazo objetivo. La línea punteada indica la probabilidad esperada por el azar (0,5). Test Exacto de Fisher $n=12$ machos y $n=11-12$ hembras para cada tratamiento (A). Tiempo de permanencia en el brazo objetivo. Media+EE test t -Student $n=12$ machos y $n=11-12$ hembras para cada tratamiento (B) Número de entradas al brazo novedoso en relación al total de cambio de zonas Media+EE test t -Student $n=12$ machos y $n=11-12$ hembras para cada tratamiento. * $p<0,05$

5.2. Memoria declarativa. Reconocimiento de un objeto novedoso.

Las memorias caracterizadas por una evocación consciente se denominan memorias declarativas, mientras que aquellas que son evocadas de forma inconsciente, se consideran memorias implícitas o asociativas. El test de reconocimiento de objeto novedoso está

diseñado (secciones 5.2.1. y 5.2.2.) para testear el primer tipo de memoria, mientras que el condicionamiento de miedo (sección 5.3.), el segundo.

5.2.1. Memoria de largo término.

Los roedores son capaces de distinguir entre objetos y reconocer un objeto que ya les fue presentado anteriormente (objeto familiar). El test de reconocimiento novedoso utiliza esta capacidad de los roedores, junto con la tendencia natural de los animales de explorar de forma preferencial objetos que no les fueron presentados anteriormente (objeto novedoso). Se realizó el test de objeto novedoso con un intervalo de 24 horas entre el entrenamiento y el testeo de los ratones con el fin de estudiar la memoria de largo término (almacenamiento y evocación de memoria por largos períodos de tiempo) en nuestro modelo. Los ratones machos que sufrieron una malnutrición proteica durante el desarrollo presentaron una menor preferencia por la exploración del objeto novedoso en relación a sus respectivos controles ($t_{21}=2,489$, $p=0,0106$) (Figura 19A). En el caso de las hembras se observó la misma tendencia, aunque las diferencias no fueron significativas ($t_{15}=1,740$, $p=0,0511$). Se analizó también el tiempo total de interacción con los objetos familiares durante las tres sesiones de entrenamiento mediante un ANOVA de dos factores con medidas repetidas (Figura 19B). No se encontró un efecto de la interacción entre ambos factores, día de entrenamiento y dieta materna (machos: $F_{2,42}=0,0927$, $p=0,9117$; hembras: $F_{2,44}=1,426$, $p=0,2511$) por lo que se continuó con el análisis de los efectos principales. No se encontró un efecto de la dieta para ambos sexos (machos: $F_{1,42}=1,190$, $p=0,2878$; hembras: $F_{1,44}=1,878$, $p=0,1843$), lo cual indicaría que las diferencias observadas no se deberían a una menor interacción de los ratones del grupo hipoproteico con los objetos durante la etapa de aprendizaje. Sí se observó un efecto del número de sesión para ambos grupos, indicando una menor exploración de los objetos familiares luego de la primera sesión (machos: $F_{2,42}=11,79$, $p<0.0001$; hembras: $F_{2,44}=42,01$, $p<0.0001$).

Estos resultados indican que la malnutrición proteica afecta la memoria de largo término en ratones machos malnutridos perinatalmente. En hembras se observó la misma tendencia, aunque no significativa.

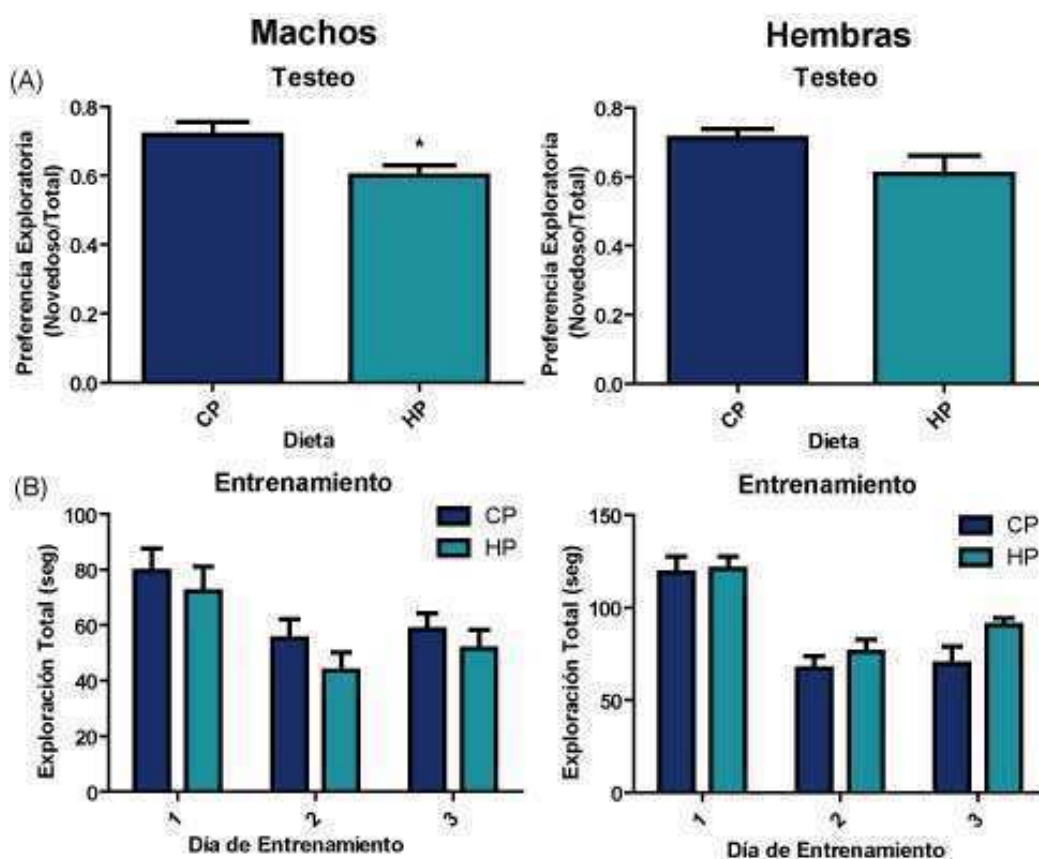


Figura 19: Reconocimiento del objeto novedoso, memoria de largo término. Machos (izquierda) y hembras (derecha) fueron analizados por separado. (A) Preferencia exploratoria del objeto novedoso medida como proporción del tiempo que está en contacto con el mismo en relación al tiempo de exploración de ambos objetos. Media+EE test *t*-Student $n=11-12$ machos y $n=12$ hembras para cada tratamiento * $p<0.05$. (B) Tiempo total de exploración de ambos objetos durante los tres días de entrenamiento. ANOVA de dos factores con medidas repetidas.

5.2.2. Memoria de trabajo y preferencia exploratoria.

Las diferencias observadas anteriormente podrían deberse no a un defecto en la memoria, sino a una mayor expresión de un comportamiento de tipo ansioso frente a un objeto desconocido que contrarrestaría la preferencia por la novedad. Para evaluar una posible respuesta del tipo ansioso frente a un objeto nuevo realizamos el test del objeto novedoso pero presentando el mismo 5 minutos después del ensayo de entrenamiento (protocolo de tiempo corto). Como se puede observar en la figura se obtuvo el mismo nivel de preferencia exploratoria entre individuos de ambos tratamientos, tanto para machos como para hembras, (machos: $t_{16}=0,0080$, $p=0,4969$; hembras: $t_{10}=1,556$, $p=0,0754$) (Figura 20A). Por el contrario, sí se observó una menor interacción de los individuos machos del grupo hipoproteico con ambos objetos durante la fase de entrenamiento, con respecto a los controles ($U_{16}:16,00$, $p=0,0338$) (Figura 20B).

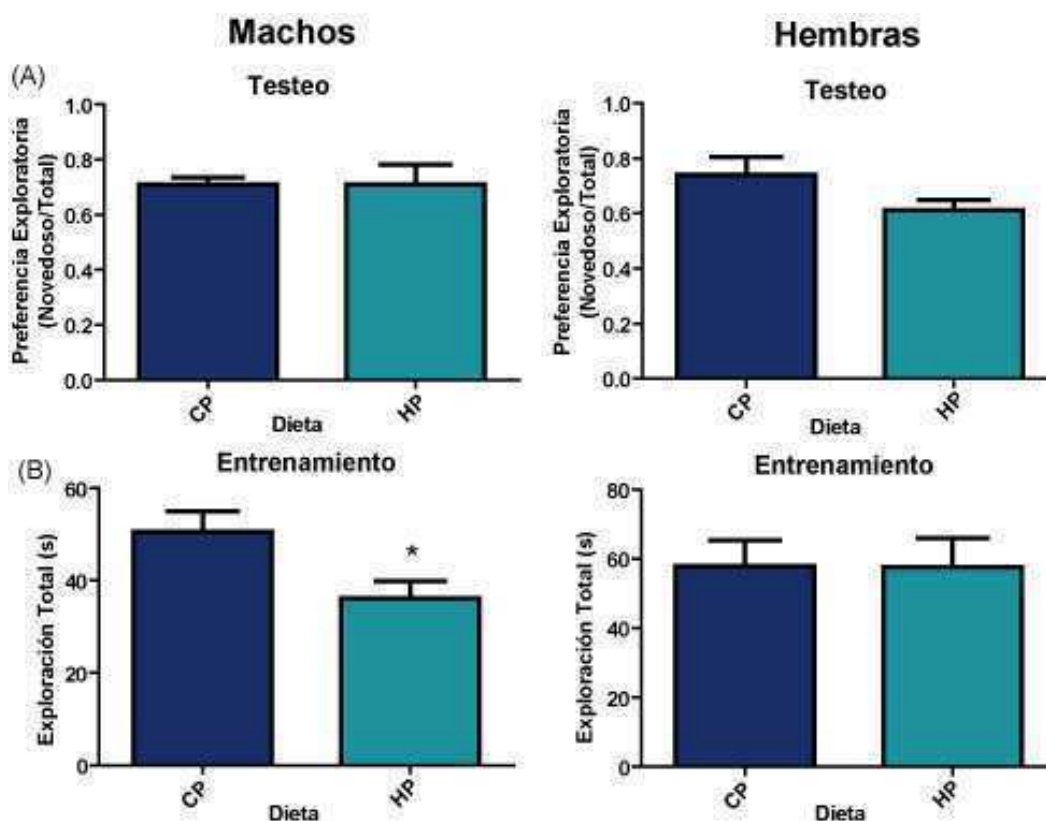


Figura 20: Reconocimiento del objeto novedoso, memoria de corto término. Machos (izquierda) y hembras (derecha) fueron analizados por separado. (A) Preferencia Exploratoria del objeto novedoso medida como proporción del tiempo que está en contacto con el mismo en relación al tiempo de exploración de ambos objetos. Media+EE *t*-test $n=6-12$ machos y $n=5-7$ hembras para cada tratamiento. (B) Tiempo total de exploración de ambos objetos durante el entrenamiento. Media+EE test Mann-Whitney o test *t*-Student $n=6-12$ machos y $n=5-7$ hembras para cada tratamiento. * $p<0.05$.

Esta diferencia no se encontró en el entrenamiento del protocolo de reconocimiento de objeto novedoso de largo término debido, probablemente, a que en este test se realizó una mayor habituación a la arena de testeo y sesiones de entrenamiento más prolongadas. Estas condiciones podrían disminuir la diferencia entre tratamientos en el tiempo de exploración de los objetos durante el entrenamiento.

Los resultados obtenidos en este test indicarían que la memoria de corto término no estaría afectada por la malnutrición proteica y que, la diferencia observada en el punto anterior, se debería a un defecto en la memoria declarativa de largo término en los ratones machos HP y no a una respuesta de tipo ansioso frente a un objeto desconocido.

5.3. Condicionamiento de miedo.

En un paradigma de condicionamiento clásico se aparea (asocia) un estímulo que hasta el momento era neutro (estímulo condicionado), con un estímulo (incondicionado) que evoca una respuesta reflejo. Diversas estructuras cerebrales como la corteza prefrontal

ventromedial, el hipocampo y la amígdala, están involucradas en el condicionamiento de miedo y en la extinción del mismo (189).

Con el fin de completar el estudio del efecto de la malnutrición proteica perinatal sobre las capacidades cognitivas, decidimos evaluar la memoria de condicionamiento de miedo en nuestro modelo. Durante la fase de entrenamiento se asocia el shock eléctrico (estímulo incondicionado) a un sonido (clave, estímulo condicionado). Además el ratón asocia el contexto de entrenamiento (estímulo condicionado 2) al shock. Al ser colocados en el mismo ambiente (testeo de contexto), un ratón que asoció correctamente el contexto al shock, presenta una respuesta de miedo, medida como tiempo de *freezing* (ningún movimiento excepto la respiración). En el testeo de clave se presenta el tono en un contexto cambiado, midiendo así la asociación entre la clave y la respuesta de *freezing*. En la asociación entre la clave y el shock, está involucrada la amígdala, mientras que en el condicionamiento de contexto, también está involucrado el hipocampo.

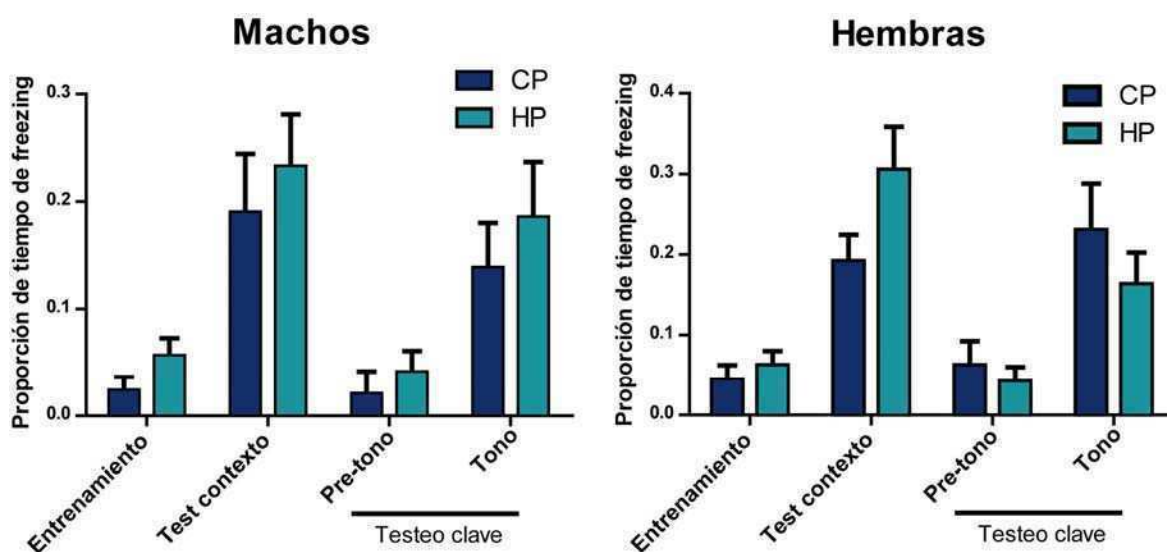


Figura 21: Condicionamiento de miedo. Machos (izquierda) y hembras (derecha) fueron analizados por separado. Proporción de *freezing* durante las sesiones de entrenamiento, testeo en el mismo contexto y durante la sesión de testeo de clave. En la última se separan los porcentajes de *freezing* antes y después de la presentación del tono. Media \pm EE. ANOVA de dos factores medidas repetidas, test de Tukey *a posteriori*.

Para ambos sexos, los contrastes de Tukey *a posteriori* no mostraron diferencias entre tratamientos para ninguna de las sesiones del condicionamiento de miedo analizadas (Figura 21). Sí arrojaron diferencias entre la proporción de *freezing* durante el entrenamiento, con respecto al testeo con clave y al testeo en el mismo contexto, dentro de cada tratamiento. Esto indica que tanto los individuos machos como hembras de los dos grupos de dieta, fueron capaces de asociar el shock con la clave y el contexto. El nivel de

freezing durante el testeo con clave, previo a la presentación del tono, no fue significativamente diferente al del entrenamiento, indicando que en ningún caso se asoció al ambiente alterado del testeo con clave, con el shock.

Estos resultados nos estarían indicando que la respuesta al condicionamiento de miedo no se encontraría afectada en individuos con malnutrición proteica perinatal.

6. Estudios de los efectos de la malnutrición proteica sobre el número de neuronas hipocampales y sus sinapsis.

Los resultados obtenidos hasta ahora indicaron que individuos HP presentaron un retraso general en el desarrollo físico y morfológico, y diversas alteraciones cognitivas y comportamentales. En la siguiente parte de esta tesis nos hemos dedicado a estudiar si existen deficiencias a nivel estructural y molecular, con el objeto de comprender mejor a futuro cual es su relación con las alteraciones observadas.

6.1. Crías hipoproteicas poseen una menor densidad de neuronas diferenciadas en distintas zonas del hipocampo.

En primera instancia realizamos una tinción de Nissl en cortes espaciados que abarcan todo el hipocampo, y medimos en los mismos el área total de esta estructura y de las zonas CA1, CA2, CA3 y giro dentado (GD). Nos concentramos en esta estructura debido a que ha sido ampliamente reportada su importancia tanto para procesos de memoria, como para el manejo de situaciones de estrés (190).

Al no encontrar diferencias anatómicas evidentes, decidimos continuar evaluando si la malnutrición perinatal tenía un efecto sobre el número de neuronas que conformaban esta estructura. Para esto se analizó, mediante microscopía confocal, el número de células positivas para NeuN (antígeno nuclear de neuronas) por mm^2 de las zonas del hipocampo mencionadas, en crías recién destetadas (Figura 22). El número de neuronas positivas para NeuN (NeuN+) fue significativamente menor para las crías HP en las zonas CA1, CA3 y GD (CA1: $t_4=2,400$, $p=0,0372$; CA3: $t_4=2,476$, $p=0,0343$; GD: $t_4=5,112$, $p=0,0035$). No se encontraron diferencias significativas entre grupos para el CA2 ($t_4=1,267$, $p=0,1369$).

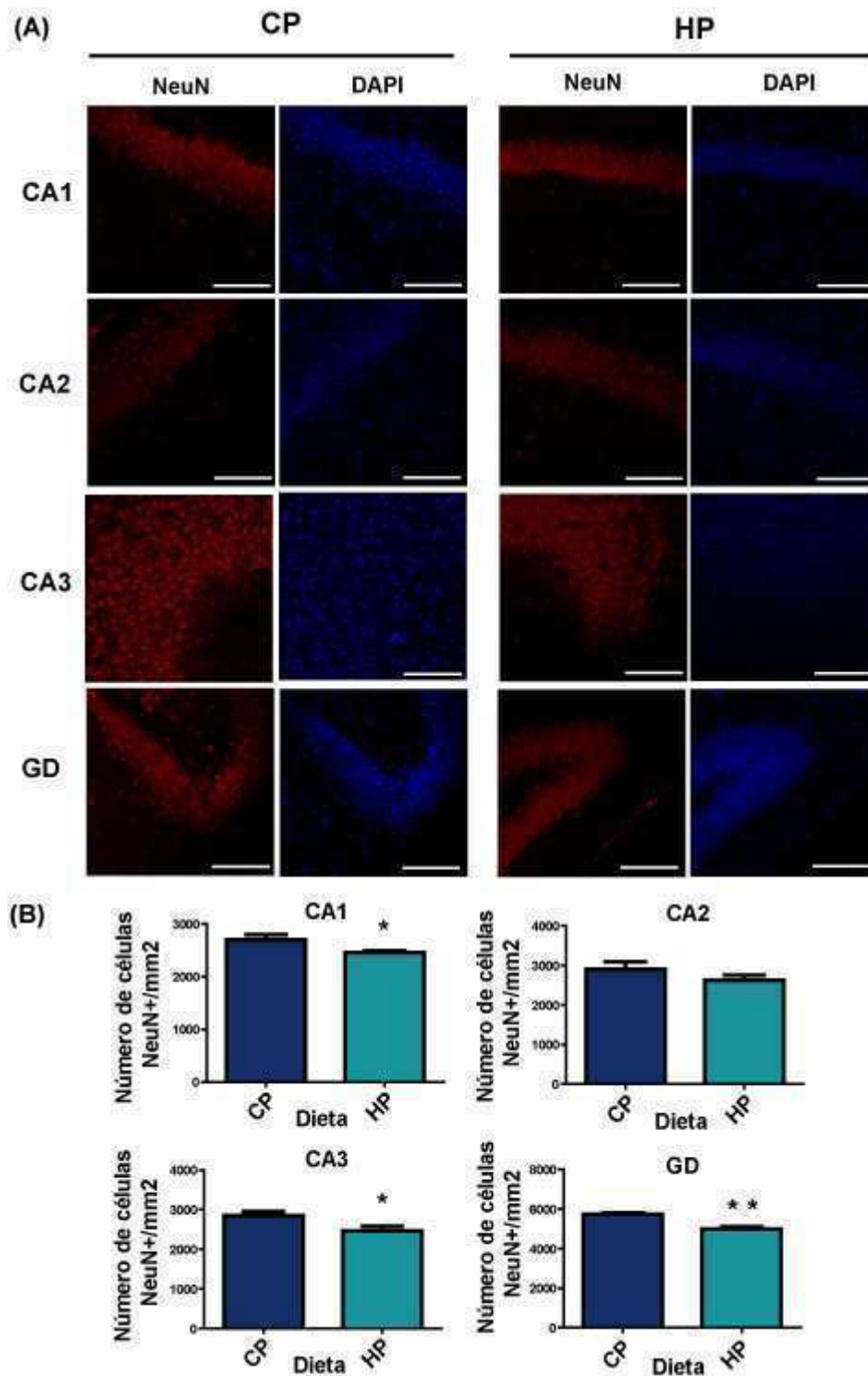


Figura 22: Densidad de células inmunopositivas para NeuN en las zonas CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo. (A) Inmunofluorescencias para NeuN. Imágenes representativas tomadas con un aumento de 400X y un zoom digital de 1,8X. La barra blanca corresponde a una longitud de 100 μm (B) Número de células NeuN+/mm². Test *t*-Student, $n=3$ para cada tratamiento. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Estos resultados indican que la malnutrición durante el desarrollo altera la maduración del hipocampo, tal vez a través de un aumento en la apoptosis, una disminución en la neurogénesis o ambas. Con el objeto de evaluar si existía un aumento en

la apoptosis, se estudiaron los niveles de la proteína Bax, un promotor de la misma, en hipocampos de crías de tres semanas. No se encontraron diferencias en los niveles de esta proteína, analizados mediante western blot.

6.2. Determinación de la densidad de espinas dendríticas.

Las espinas dendríticas son protuberancias neuronales que contienen organelas, receptores de neurotransmisores, y son esenciales para la función y plasticidad sináptica. Su formación, maduración y mantenimiento dependen de la actividad sináptica y pueden ser modulados por la experiencia. Alteraciones en el número y estado de maduración de las espinas han sido asociadas con diversos desórdenes cognitivos y psiquiátricos (191).

El modelado de espinas dendríticas forma parte además de los mecanismos de plasticidad sináptica del cerebro, motivo por el cual decidimos estudiar si su número se encontraba alterado en ratones malnutridos perinatalmente. Para esto utilizamos la técnica de Golgi-Cox, que nos permitió teñir neuronas de la zona de la corteza. Como las espinas están en constante remodelación, decidimos evaluar su densidad en ratones de tres diferentes edades: 3 semanas, 6 semanas y 12 semanas de vida. El primer grupo corresponde a individuos recién destetados, es decir que no recibieron alimento de bioterio, mientras que el segundo y tercer grupo, tuvieron 3 y 9 semanas de rehabilitación alimenticia, respectivamente. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la Figura 23.

En hembras no se encontraron diferencias a las 3 semanas de edad, pero las de la dieta HP presentaron una mayor densidad de espinas dendríticas a las 6 semanas ($U_{20}=20,00$, $p= 0,0056$). Esta diferencia no fue observada a las 12 semanas de edad. En machos no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las edades analizadas.

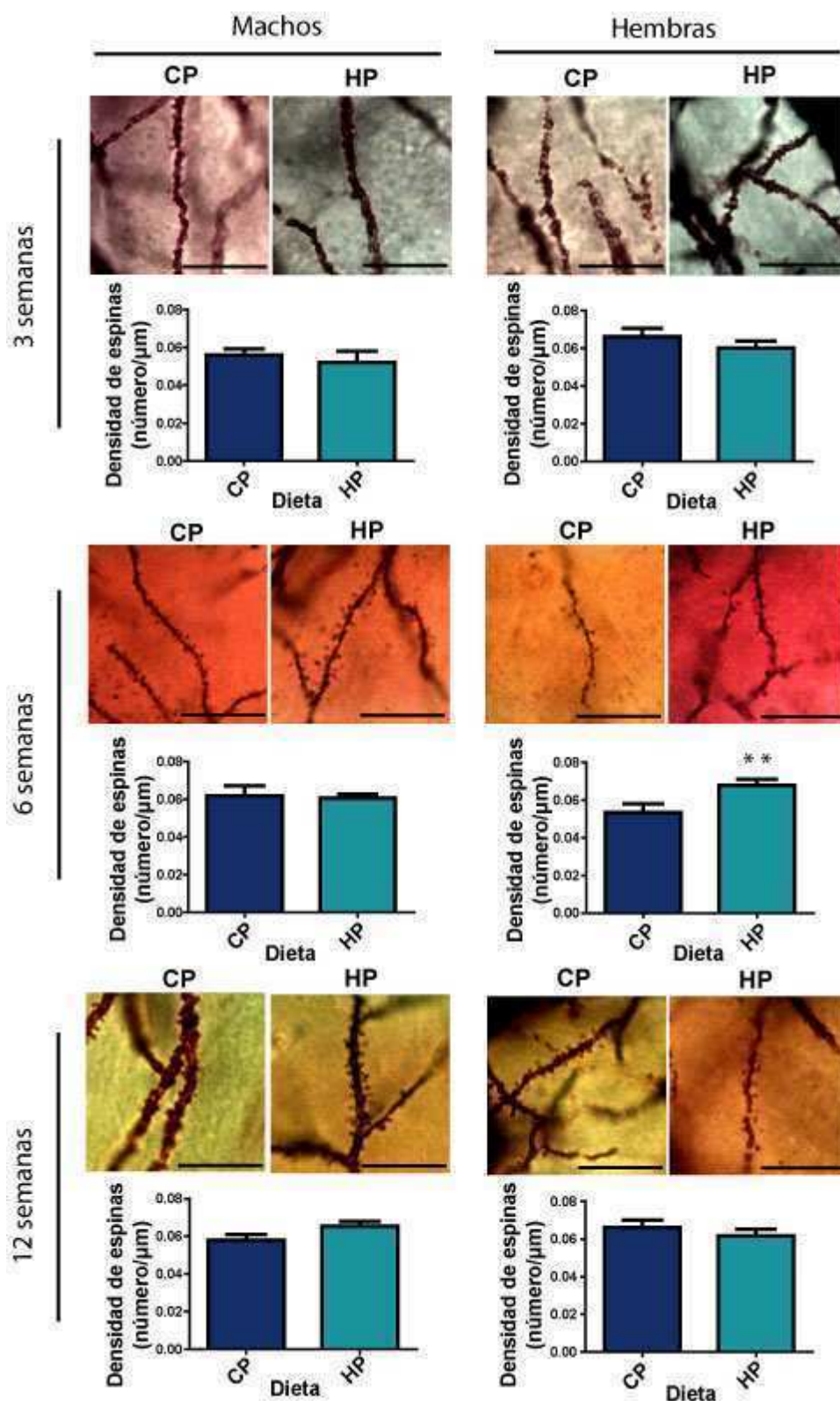


Figura 23: Densidad de espinas dendríticas en neuronas de corteza. Tinción de Golgi-Cox. Imágenes representativas tomadas con un aumento de 1000X. Y sus respectivas cuantificaciones expresadas como número de espinas contadas/longitud de la dendrita contada. La barra negra corresponde a un tamaño de 200 μm. Test *t*-Student o Mann-Whitney, para cada tratamiento n=7-21 hembras o n=11-47 machos. **p*<0,05.

Estos resultados indican que el efecto de la malnutrición sobre el número de espinas dendríticas, podría ser potencialmente revertido luego de un período de alimentación adecuada. Igualmente, nos queda la pregunta para un futuro de si luego del mismo período de alimentación completa el potencial sinaptogénico (capacidad de generar espinas y su maduración) de los individuos HP es el mismo que el de los CP, cuando se los somete a una situación de aprendizaje que se sabe estimula la sinaptogénesis.

7. Estudio de la expresión génica en el modelo de malnutrición perinatal.

A continuación decidimos dedicarnos al estudio de las posibles bases moleculares de las alteraciones en el desarrollo, la cognición y el comportamiento, concentrándonos en genes relevantes para los procesos mencionados y en el estado epigenético general de la cromatina. Estos serán analizados en dos estructuras cerebrales, el hipocampo, cuyo rol en comportamiento y cognición ya ha sido discutido, y la corteza, involucrada también en diferentes procesos de memoria (192).

7.1. Neurotrofinas y sus receptores.

La neurotrofina BDNF, como se ha mencionado en la introducción, posee un rol en procesos de aprendizaje y memoria, y su expresión alterada ha sido asociada a numerosos desórdenes psiquiátricos. Como las crías HP presentaron un comportamiento alterado (resultados del laberinto elevado en cruz, campo abierto y test de suspensión por la cola), y ciertas deficiencias cognitivas (reconocimiento del objeto novedoso), decidimos estudiar la expresión del ARNm de esta proteína en extractos de corteza e hipocampo en ratones recién destetados (3 semanas), juveniles (6 semanas) y adultos (12 semanas).

Machos y hembras del grupo HP presentaron una menor expresión del ARNm de BDNF en corteza a las 3 semanas de edad, al ser comparados con sus respectivos controles (machos $t_4=2,434$, $p<0,0358$; hembras $t_{14}= 1,905$, $p<0,0388$) (Figura 24A). Esta diferencia desapareció en los machos a partir de las 6 semanas. En cambio, en hembras, hubo una reversión significativa de esta tendencia a las 6 semanas ($t_4=3,656$, $p<0,0108$). Esta diferencia desapareció a las 12 semanas de edad. No se encontraron variaciones en los niveles de este mRNA en extracto de hipocampo de los mismos animales (Figura 24B).

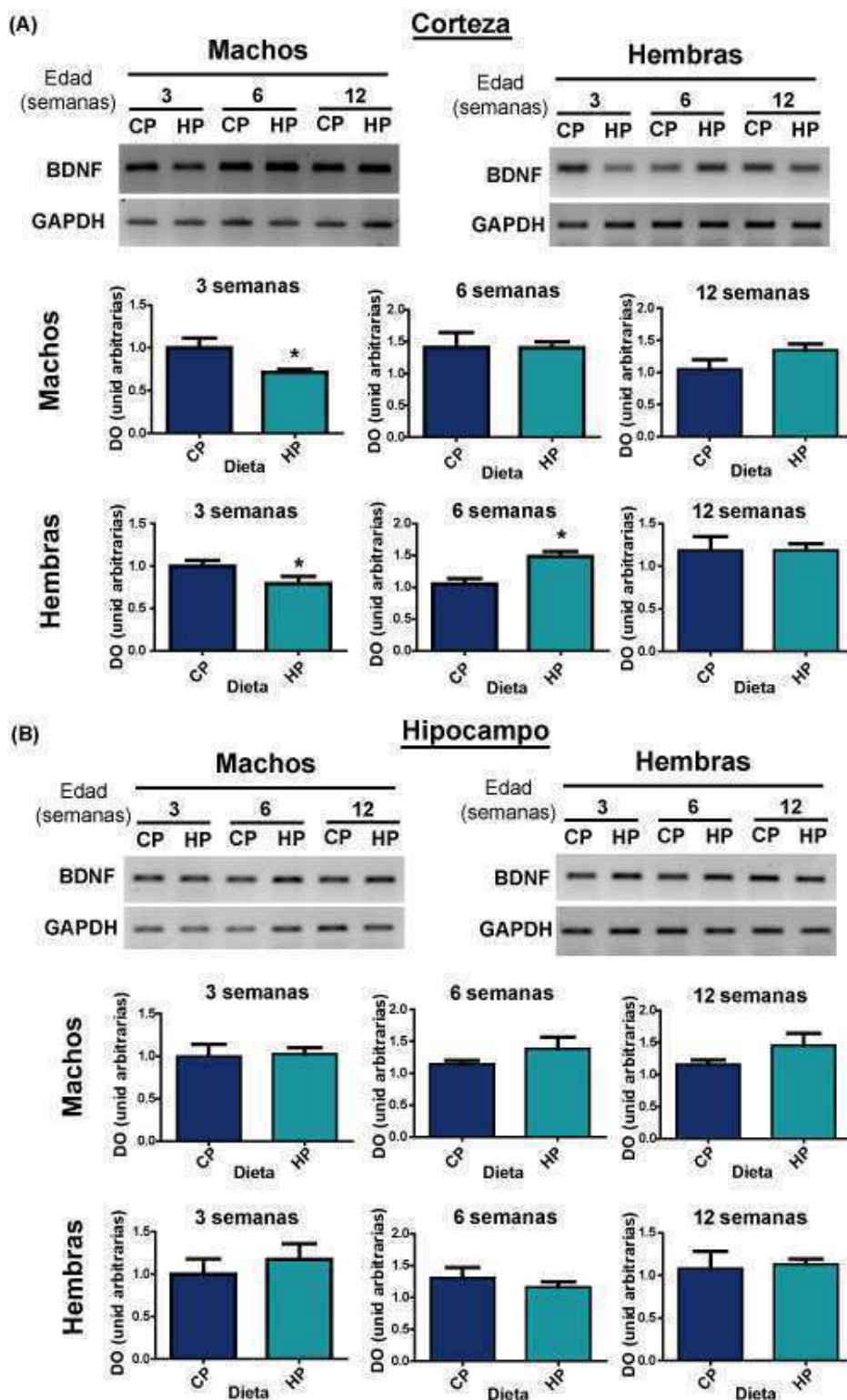


Figura 24: Expresión del ARNm de BDNF analizada por RT-PCR semicuantitativa. Geles con imágenes representativas de las RT-PCR y sus respectivas cuantificaciones, relativizadas al individuo control de 3 semanas, del mismo sexo y estructura cerebral. Resultados obtenidos para la corteza (A) e hipocampo (B). Test *t*-Student, machos $n=3$ y hembras $n=3-8$ para cada combinación de edad, dieta, estructura cerebral y sexo. * $p<0,05$.

También analizamos la expresión de la neurotrofina NGF (involucrada en diferenciación y crecimiento neuronal), el receptor de BDNF, TrkB, y TrkC, receptor con

alta afinidad por la neurotrofina NT-3. No se encontraron diferencias en la expresión de estos genes entre ratones CP y HP.

Estos resultados indicarían que la expresión de BDNF se encuentra disminuida en ratones HP de ambos sexos a las 3 semanas. Esta diferencia se pierde o incluso revierte, luego de tres semanas de rehabilitación alimenticia.

7.2. Genes inmediatos tempranos.

Los genes inmediatos tempranos son un grupo de genes cuya expresión se activa de forma rápida en respuesta a un estímulo externo antes de la síntesis de otras proteínas. Los genes inmediatos tempranos c-fos, Arc y Egr1 cumplen un rol fundamental en eventos de aprendizaje y memoria.

Al analizar la expresión del ARNm de Egr1, no encontramos diferencias entre ratones CP y HP del mismo sexo y edad, tanto para corteza como para hipocampo. Sin embargo, al evaluar la expresión de la proteína, encontramos que los ratones machos HP presentaron una tendencia hacia un aumento en la expresión de la misma en hipocampos a partir de las 6 semanas de edad, que se hizo significativa a las 12 semanas ($t_4=5,747$, $p=0,0023$) (Figura 25B). Las hembras, por el contrario, presentaron una tendencia hacia la disminución de la expresión de Egr1 en hipocampo, que fue significativa a las 12 semanas de edad ($t_4=2,902$, $p=0,0220$). No se encontraron diferencias en la expresión de la proteína Egr1 en corteza (Figura 25A).

Al evaluar la expresión de Arc mediante RT-PCR, encontramos una tendencia hacia una mayor expresión de su ARNm en corteza hembras HP, que fue significativa a las 12 semanas ($t_4=2,300$, $p=0,0415$) (Figura 26A). La expresión de la proteína en corteza, en cambio, fue significativamente menor en hembras HP de 3 y 6 semanas (3 semanas: $t_4=2,771$, $p=0,0251$; 6 semanas: $t_4=2,190$, $p=0,0468$). Sin embargo, esta diferencia desapareció, y hasta tendió hacia la reversión, en hembras de 12 semanas (Figura 27A). No se encontraron diferencias en la expresión del mensajero (Figura 26B), ni en la expresión de la proteínas (Figura 27B), en hipocampos de hembras de cualquiera de las tres edades.

Estos resultados indican que, a excepción de la proteína Egr1 en hipocampo, la expresión de estos dos genes tiende a aumentar o revertir su disminución a partir de las 6 o 12 semanas en animales HP, luego de un período de alimentación completa.

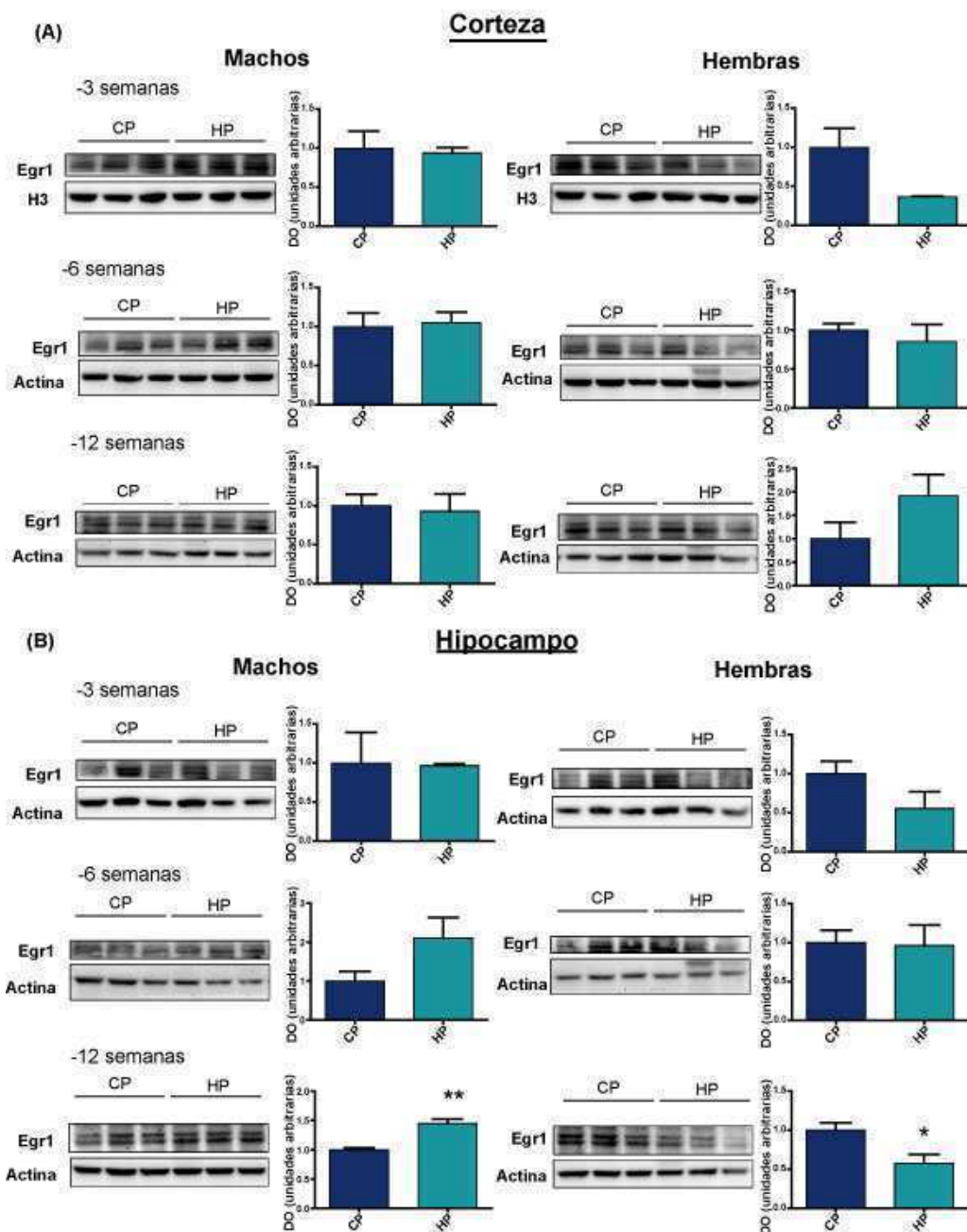


Figura 25: Expresión de Egr1 analizada por western blot. Western blots y sus respectivas cuantificaciones, relativizadas al individuo control, del mismo sexo y edad. Resultados obtenidos para la corteza (A) e hipocampo (B). Test *t*-Student, machos y hembras $n=3$ para cada combinación de edad, dieta, estructura cerebral y sexo. $*p<0,05$.

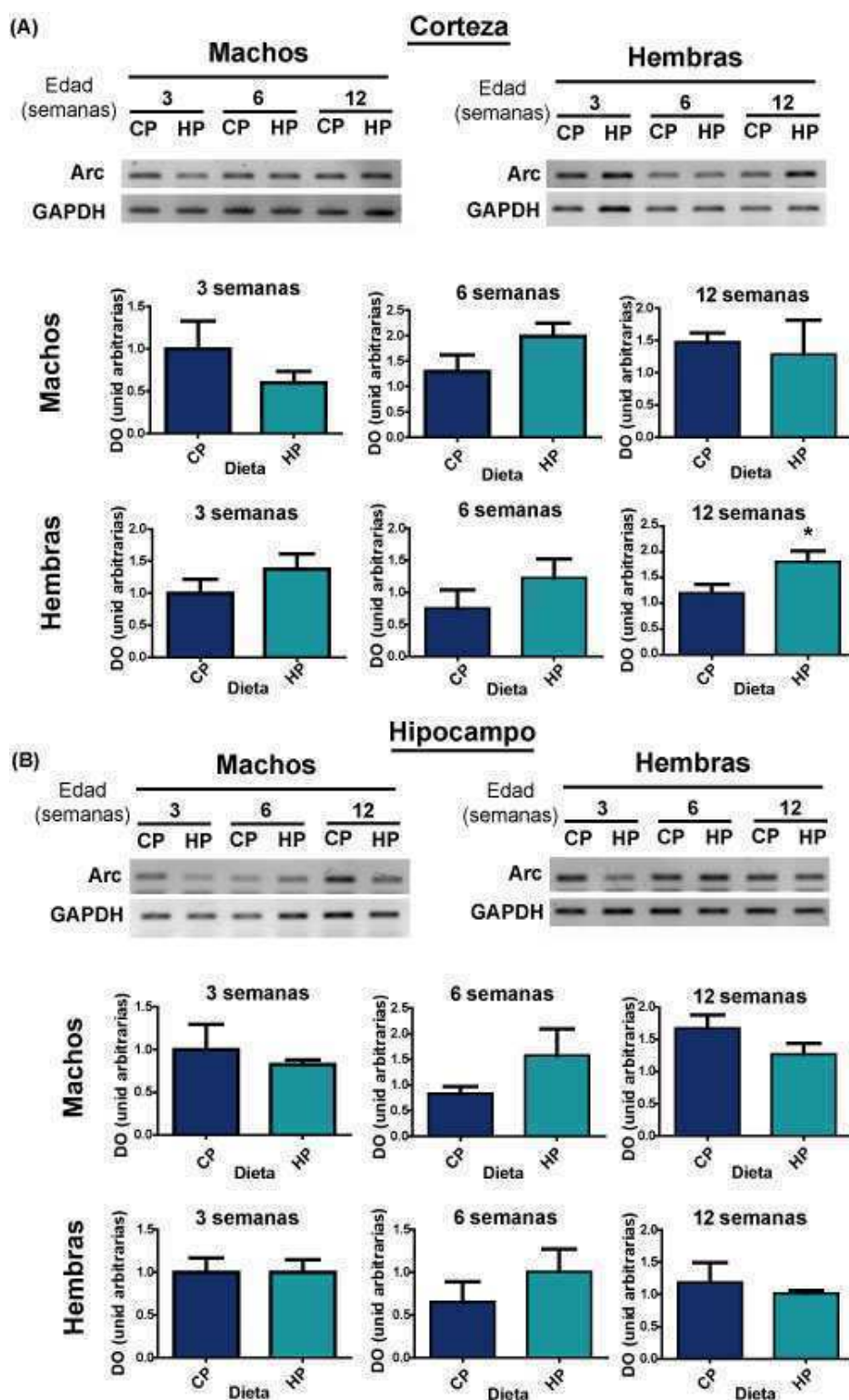


Figura 26: Expresión del ARNm de Arc analizada por RT-PCR semicuantitativa. Geles con imágenes representativas de las RT-PCR y sus respectivas cuantificaciones, relativizadas al individuo control de 3 semanas, del mismo sexo y estructura cerebral. Resultados obtenidos para la corteza (A) e hipocampo (B). Test *t*-Student, machos n=3 y hembras n=3-8 para cada combinación de edad, dieta, estructura cerebral y sexo. **p*<0,05.

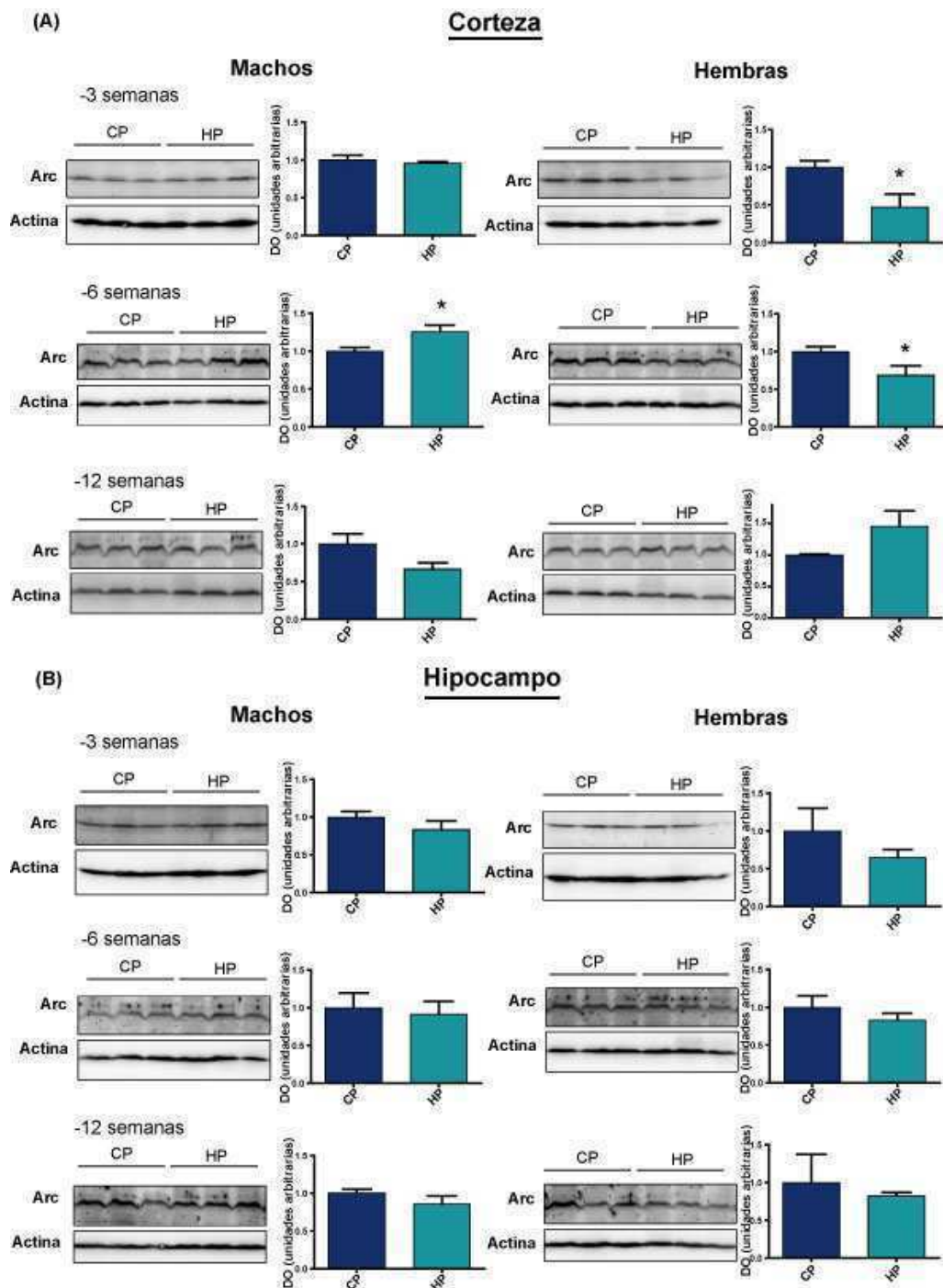


Figura 27: Expresión de Arc analizada por western blot. Western blots y sus respectivas cuantificaciones, relativizadas al individuo control, del mismo sexo y edad. Resultados obtenidos para la corteza (A) e hipocampo (B). Test *t*-Student, machos y hembras $n=3$ para cada combinación de edad, dieta, estructura cerebral y sexo. $*p<0,05$.

7.3. Otros genes relacionados con cognición.

Decidimos evaluar otros genes involucrados en cognición, además de los inmediatos tempranos y BDNF. Comenzamos estudiando expresión de los mensajeros de

calcineurina α (CalN α) y calcineurina γ (CalN γ), dos isoformas de la subunidad catalítica de la fosfatasa calcineurina, involucrada en diversos mecanismos de la memoria, como la memoria de trabajo, la memoria de largo término y en la consolidación de la extinción de la memoria de miedo. No encontramos diferencias significativas entre dietas para ambos genes en ninguna de las condiciones analizadas.

No se encontraron diferencias tampoco en la expresión de reelin, involucrada en el desarrollo del sistema nervioso y en la maduración y generación de espinas dendríticas.

La quinasa dependiente de ciclinas CDK5 es fundamental también para el desarrollo del sistema nervioso y es un adaptador de la vía de señalización de reelin(193). Regula funciones vitales para la memoria y la plasticidad sináptica, como el reciclado de vesículas sinápticas, la formación de espinas dendríticas, la densidad de receptores de neurotransmisores y la excitabilidad neuronal. Su actividad normal depende de su unión a la proteína p35, mientras que la interacción con la forma clivada de p35 -p25- provoca una actividad aberrante de la quinasa que puede llevar a la neurodegeneración (194).

Al estudiar la expresión de esta proteína en corteza encontramos una disminución de la misma en machos HP recién destetados ($t_4=4,697$, $p=0,0047$). Esta disminución se revirtió en machos de 6 semanas de edad ($t_4=2,159$, $p=0,0485$). En hembras HP la expresión de la proteína fue significativamente menor a las 6 semanas ($t_4=4,131$, $p=0,0072$) (Figura 28A).

No se encontraron diferencias para la expresión de la proteína en hipocampos de hembras, pero sí una tendencia hacia un aumento de la misma en machos HP con respecto a sus controles, que resultó significativa a las 12 semanas de edad ($t_4=4,801$, $p=0,0204$) (Figura 28B).

Estos resultados indican que CDK5 se encuentra regulada diferencialmente en ratones HP, indicando un aumento en sus niveles en machos HP a edades más avanzadas.

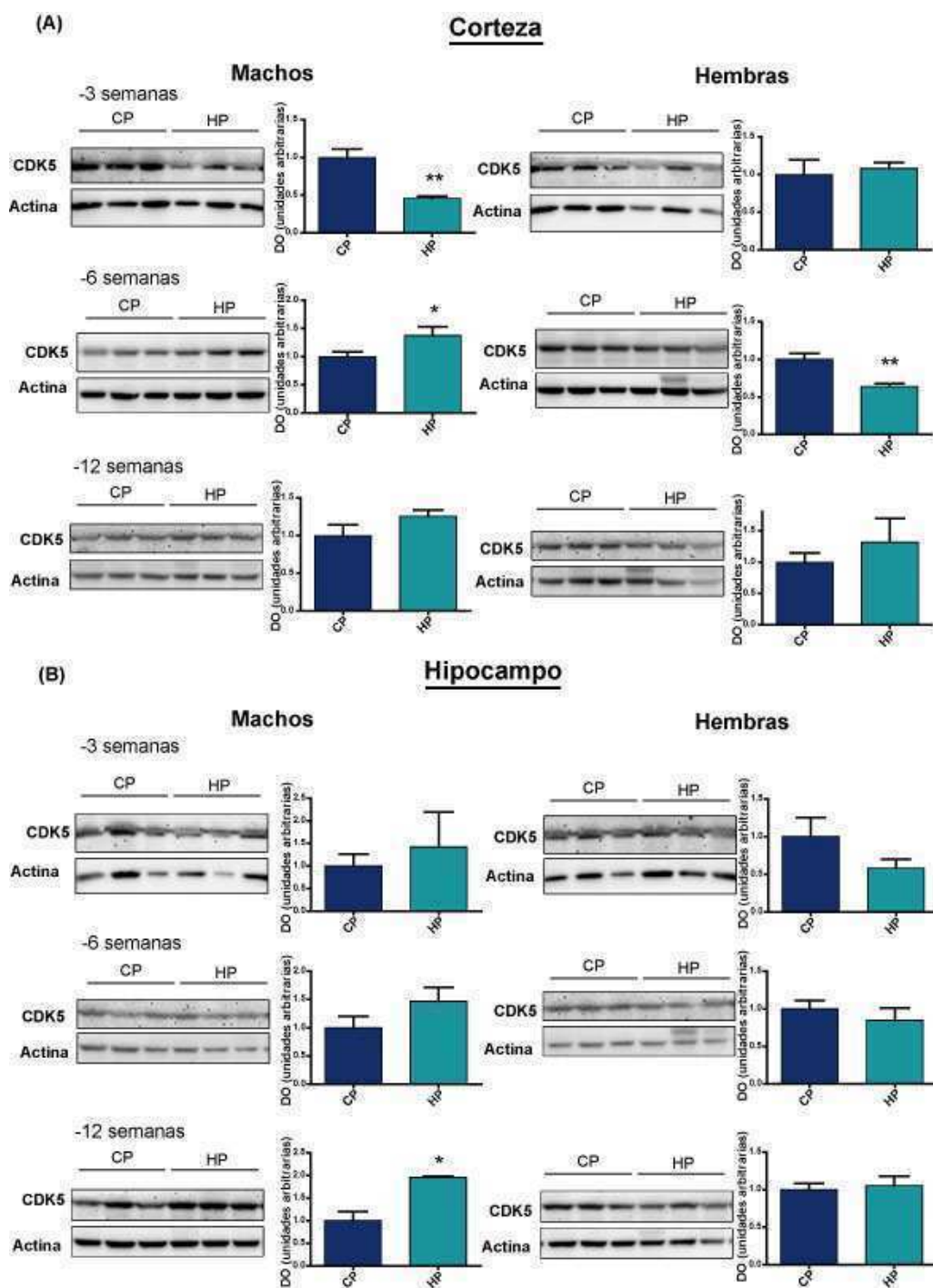


Figura 28: Expresión de CDK5 analizada por western blot. Western blots y sus respectivas cuantificaciones, relativizadas al individuo control, del mismo sexo y edad. Resultados obtenidos para la corteza (A) e hipocampo (B). Test *t*-Student, machos y hembras $n=3$ para cada combinación de edad, dieta, estructura cerebral y sexo. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

7.4. Influencia de la dieta materna durante el desarrollo sobre el estado epigenético de la cromatina.

El nivel de compactación de la cromatina y la presencia de diversas modificaciones epigenéticas regulan fuertemente la expresión de diversos genes, y pueden sufrir cambios a lo largo de la vida de un individuo en base a la experiencia y la influencia del ambiente.

En primer lugar analizamos el nivel de acetilación de histona 4 (H4) e histona 3 (H3), con anticuerpos que permiten la detección de histonas acetiladas en diversos aminoácidos. Las hembras de 3 semanas del grupo HP presentaron un mayor nivel de acetilación global de la H4 en corteza ($t_4=6,719$, $p= 0,0013$) (Figura 29A). Esta diferencia no fue significativa a las 6 semanas y se perdió a las 12. No se encontraron diferencias en hipocampos de hembras (Figura 29B) de las diferentes edades, ni en ambas estructuras en machos (Figuras 29 A y B).

De igual forma que para la acetilación de histona H4, la acetilación global de H3 fue mayor en corteza de hembras HP recién destetadas ($t_4=3,377$, $p= 0,0139$), sin embargo esta diferencia no fue encontrada a edades más avanzadas. No se encontraron diferencias en los niveles de acetilación de H3 en corteza de machos en ninguna de las edades analizadas (Figura 30A). En cambio, los machos HP presentaron mayores niveles de H3 acetilada en hipocampos a las 6 ($t_4=3,934$, $p= 0,0295$) y 12 ($t_4=3,723$, $p= 0,0102$) semanas. No se encontraron diferencias para la acetilación de H3 en hipocampos de hembras (Figura 30B).

Estos resultados indican que la malnutrición perinatal tiene un efecto sobre el estado global de acetilación de las histonas 3 y 4, sugiriendo una potencial modificación de la expresión de diversos genes. Estas diferencias cambian además con la edad, tal vez por el crecimiento o la rehabilitación alimenticia, de los ratones. Estudios a futuro podrían arrojar resultados interesantes acerca de que genes se encuentran afectados diferencialmente y qué sucede con su expresión.

También se estudiaron los niveles de las siguiente modificaciones de histonas: H3 trimetilada en lisina 9, altamente correlacionada con heterocromatina constitutiva (zonas de cromatina altamente condensadas y consecuente baja expresión génica), H3 dimetilada en lisina 4 (marcador de transcripción activa) y H4 acetilada en lisina 12 (enriquecida en los sitios de iniciación de la transcripción) sin que se hayan encontrado diferencias en los niveles globales entre los grupos analizados. De cualquier forma no descartamos que puedan existir diferencias en la presencia de estas modificaciones de histonas en genes específicos.

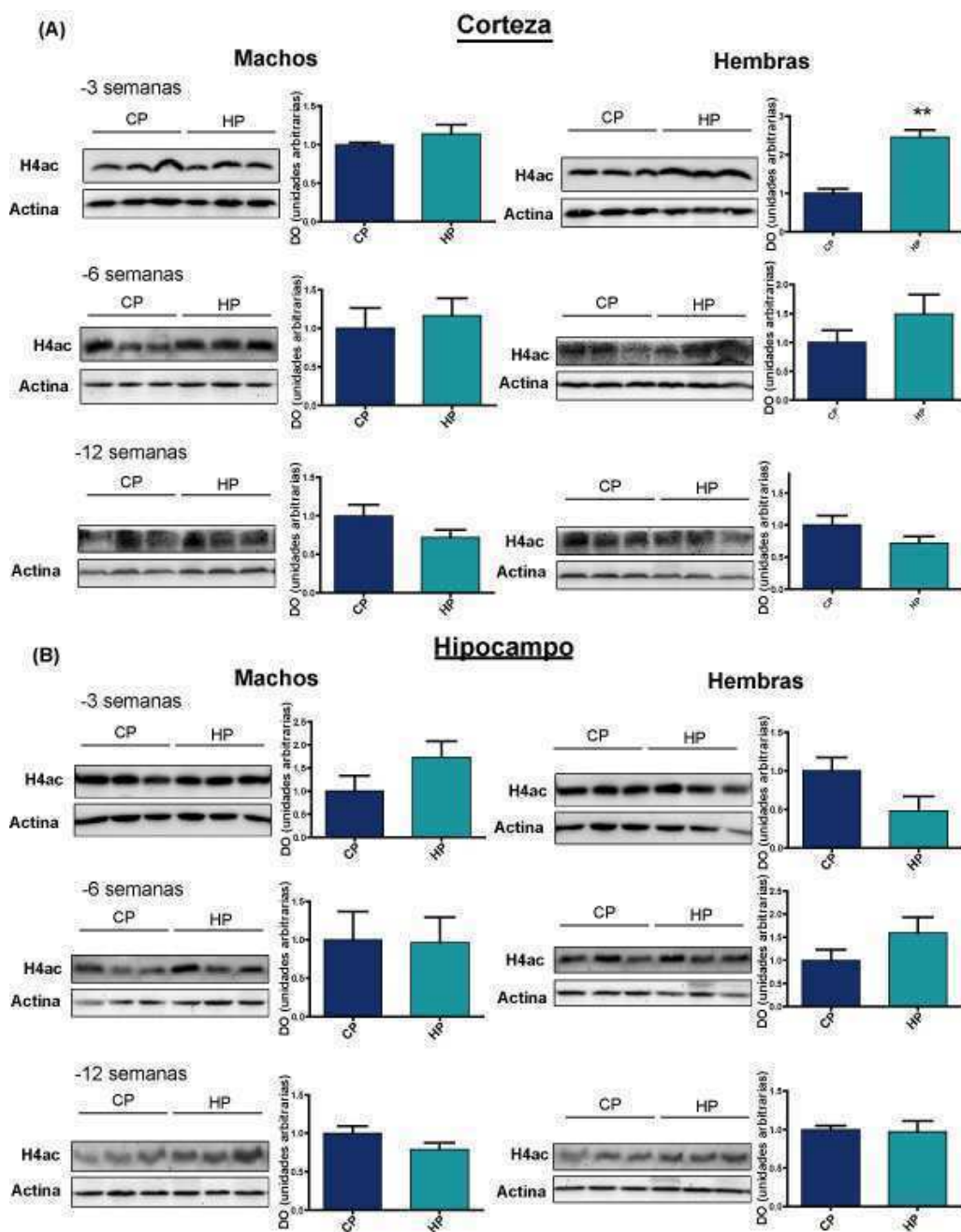


Figura 29: Niveles de H4 acetilada (H4ac) analizados por western blot. Western blots y sus respectivas cuantificaciones, relativizadas al individuo control, del mismo sexo y edad. Resultados obtenidos para la corteza (A) e hipocampo (B). Test *t*-Student, machos y hembras $n=3$ para cada combinación de edad, dieta, estructura cerebral y sexo. ** $p<0,01$.

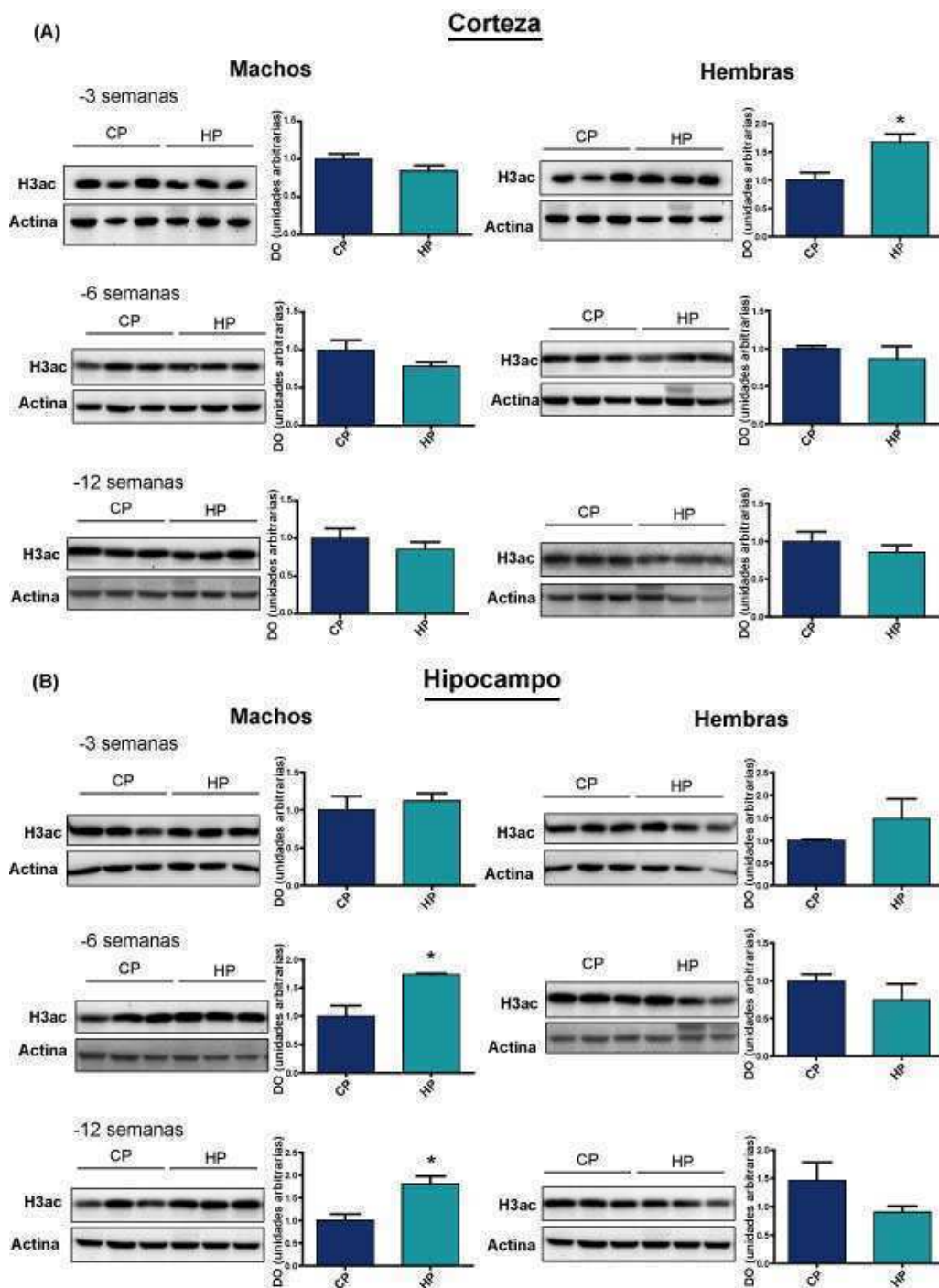


Figura 30: Niveles de H3 acetilada (H3ac) analizados por western blot. Western blots y sus respectivas cuantificaciones, relativizadas al individuo control, del mismo sexo y edad. Resultados obtenidos para la corteza (A) e hipocampo (B). Test *t*-Student, machos y hembras $n=3$ para cada combinación de edad, dieta, estructura cerebral y sexo. * $p<0,05$.

Finalmente también evaluamos los niveles de HP1 α y HP1 γ , proteínas relacionadas con la heterocromatina, en los mismos grupos experimentales sin encontrar diferencias significativas entre ellos.

8. Efectos transgeneracionales de la malnutrición proteica.

Como ya se ha mencionado en la introducción, el ambiente puede ejercer su influencia sobre el fenotipo de los individuos, alterando el estado epigenético de diversos genes y, en consecuencia, su expresión. Si estos cambios se ven reproducidos en las gametas, pueden ser transmitidos a la descendencia. En nuestro modelo encontramos una alteración transitoria en los niveles globales de acetilación de histona 3 y 4. Esto nos sugiere que existiría un efecto del ambiente (malnutrición en combinación con un menor cuidado materno) sobre el estado epigenético de la cromatina. Si este efecto existiera también en las gametas, podría ser potencialmente heredado a una segunda generación.

Con el objetivo de estudiar si las alteraciones observadas en la F1 son transmitidas a una segunda generación, realizamos cruza entre machos y hembras de diferentes camadas pero del mismo grupo experimental, alimentados con dieta de bioterio a partir del destete, y repetimos en su descendencia algunos de los análisis presentados anteriormente. A continuación se presentan los resultados de estas evaluaciones para la F2, en donde CP y HP se refiere al tratamiento recibido por la F1 durante la preñez y la lactancia. Es importante tener en cuenta que la F2 siempre fue alimentada con dieta estándar de bioterio.

Un análisis preliminar del comportamiento materno de la F1 no arrojó diferencias apreciables entre grupos. De cualquier forma, los resultados de comportamiento de la F0 involucraron el uso de datos provenientes de varias tandas experimentales. Los datos presentados a continuación corresponden a una única tanda experimental.

8.1. Desarrollo físico y neurológico.

Al igual que para la F1, se registró la aparición de ciertos pilares del desarrollo físico. En un primer análisis no encontramos diferencias al comparar ratones CP y HP del mismo sexo. Como no se encontraron diferencias entre machos y hembras del mismo tratamiento en la aparición de estas características en la F1, y como en la F2 no hubo tampoco diferencias significativas entre sexos del mismo grupo para ninguna de las características estudiadas [apertura de los ojos (control: $U_8=11,00$, $p=0,8783$; hipoproteico: $U_{12}=30,50$, $p=0,9121$), apertura del canal auditivo (control: $U_8=10,00$, $p=0,7077$; hipoproteico: $U_{12}=31,00$, $p=0,9570$), aparición del pelo dorsal (control: $U_8=12,00$, $p=0,9095$; hipoproteico: $U_{12}=29,00$, $p=0,7469$), aparición del pelo ventral (control: $U_8=6,50$, $p=0,2538$; hipoproteico: $U_{12}=32,00$, $p=0,9443$)]; se decidió combinar los datos de ambos sexos para cada tratamiento. Llamativamente, se observó una edad más temprana

de aparición del pelo dorsal (Figura 31C) y ventral (Figura 31D) en individuos del grupo HP (pelo dorsal: $U_{24}=46,00$, $p=0,0455$; pelo ventral: $U_{24}=22,00$, $p=0,0008$).

No se encontraron diferencias en la edad de apertura de los ojos ($U_{24}=76,00$, $p=0,6705$) (Figura 31A), ni en la edad de apertura del canal auditivo ($U_{24}=53,00$, $p=0,1544$) (Figura 31B).

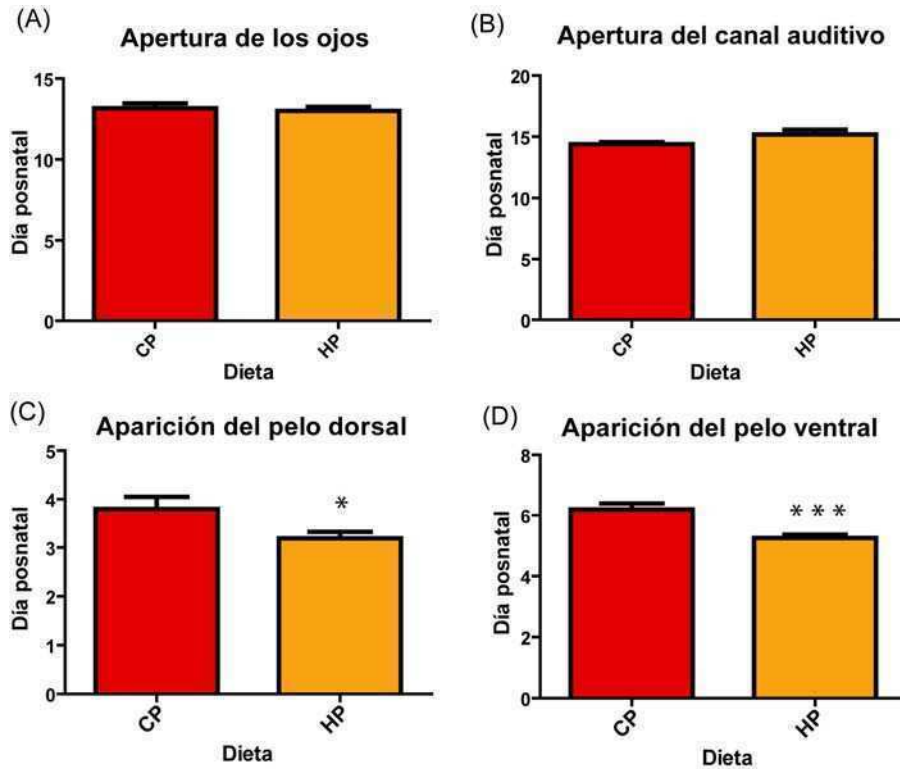


Figura 31: Desarrollo físico de las crías. Datos de machos y hembras combinados. Edad (días posnatales) de apertura de los ojos (A), de las orejas (B), de aparición del pelo dorsal (C) y ventral (D) fue registrado para cada individuo, con un máximo de 3 individuos del mismo sexo por camada. Media+EE Mann-Whitney $n=10-16$ para cada tratamiento * $p<0,05$ y *** $p<0,001$

Con el fin de profundizar en la asociación entre las edades de aparición de cada característica física y el grupo experimental, realizamos un análisis de correspondencias con las variables dependientes (edad de aparición del pelo dorsal, pelo ventral, apertura de los ojos y del canal auditivo) y la variable independiente (dieta). Para esto, primero convertimos a las cuatro variables dependientes en categóricas, calculando la moda de cada una y asignándole el valor “Normal”, mientras que edades anteriores y posteriores a la moda fueron definidas como “Temprano” y “Tardío”, respectivamente. En la Figura 32 se encuentran resumidos los resultados del análisis en un *biplot* donde los Ejes 1 y 2 corresponden, cada uno de ellos, a una nueva variable generada a partir de las estudiadas. Estas, son aquellas que resumen la mayor parte de la información original, siendo la del Eje 1 aquella que más variabilidad incluye. Como se puede observar en el gráfico, la dieta

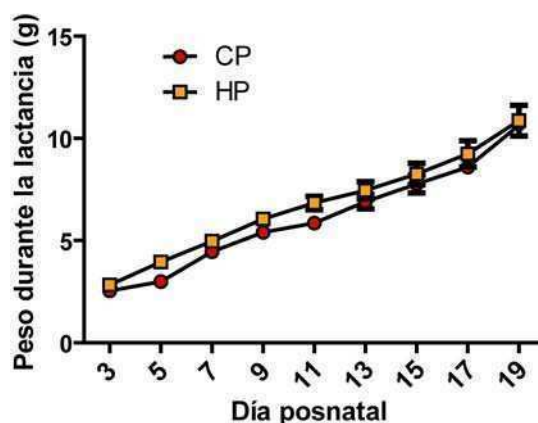


Figura 33: Peso de las crías durante la lactancia. Datos de machos y hembras combinados. El mismo fue registrado para cada individuo, con un máximo de 3 individuos del mismo sexo por camada. Media+EE. ANOVA de dos factores medidas repetidas, test de Tukey *a posteriori*.

En relación con el análisis del desarrollo neurológico en la F2, se evaluaron los reflejos de enderezamiento y geotaxis negativa. Ninguno de ellos arrojó diferencias entre tratamientos en individuos del mismo sexo. Nuevamente, al no encontrar diferencias entre sexos de la misma dieta en la F1, y como las diferencias entre sexos no fue significativa para la F2 [reflejo de enderezamiento control (Interacción Sexo*Edad: $F_{12,84}=1,41$, $p=0,1764$, Sexo: $F_{1,12}=0,07$, $p=0,7990$); reflejo de enderezamiento hipoproteico (Interacción Sexo*Edad: $F_{12,156}=0,50$, $p=0,9134$, Sexo: $F_{1,12}=0,0021$, $p=0,9645$); geotaxis negativa control (Interacción Sexo*Edad: $F_{3,18}=0,85$, $p=0,4827$, Sexo: $F_{1,3}=0,98$, $p=0,3600$); geotaxis negativa control (Interacción Sexo*Edad: $F_{3,39}=0,28$, $p=0,8394$, Sexo: $F_{1,3}=0,95$, $p=0,3481$)]; se unieron los resultados de ambos sexos y se realizó una comparación entre tratamientos.

El análisis del reflejo de enderezamiento arrojó una diferencia significativa para la interacción dieta y edad posnatal ($F_{12,264}=1,85$, $p=0,0407$) por lo que no se continuó con el análisis de los efectos principales. Los contrastes *a posteriori* entre tratamientos para cada día, indicaron una mayor latencia para la ejecución de este reflejo en individuos HP a P3 ($p<0,05$) (Figura 34A).

En cuanto al desarrollo de la geotaxis negativa no se encontró un efecto significativo en la interacción entre la dieta y la edad ($F_{3,63}=0,61$, $p=0,6094$), pero sí un efecto principal de la dieta ($F_{1,3}=7,37$, $p=0,0130$). Los contrastes *a posteriori* de Tukey no arrojaron diferencias entre tratamientos para ninguno de los días estudiados (Figura 34B). Esto indica que los individuos HP poseen un retraso general en la latencia para ejecutar

este reflejo (efecto principal dieta), sin ser significativamente diferentes en ningún día al analizarlos por separado.

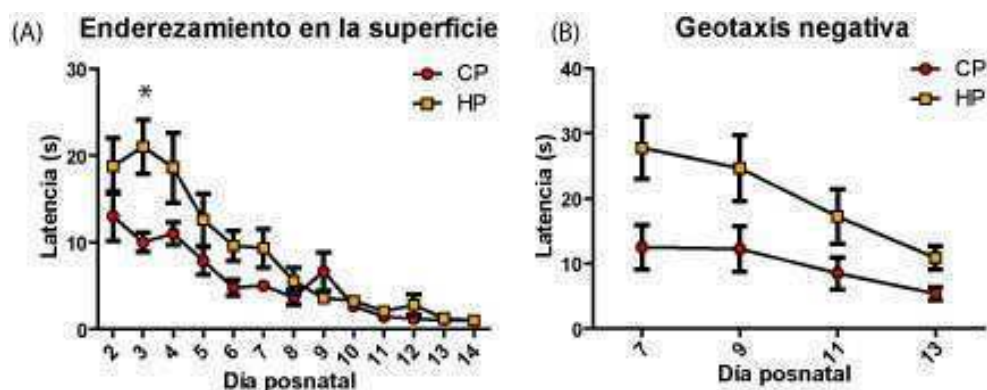


Figura 34: Reflejos Neurológicos. Datos de machos y hembras combinados. La latencia para ejecutar el reflejo de enderezamiento de la superficie (A) y la geotaxis negativa (B) fueron medidos a diferentes días posnatales, como se indica en el eje de las abscisas. Este valor fue registrado para cada individuo, con un máximo de 3 individuos del mismo sexo por camada $Media \pm EE$. ANOVA de dos factores con medidas repetidas, test de Tukey *a posteriori*. $n=7-12$ para cada tratamiento* $p<0.05$.

Estos resultados sugieren que la malnutrición proteica perinatal afectaría no solo a los individuos directamente involucrados, si no también a su descendencia. Esto se vio reflejado en un retraso en el desarrollo neurológico de la F2, y de forma contraria, una aparición temprana de ciertas características físicas. Un adelanto en el desarrollo físico de la F2, sería consistente con una transmisión de información entre generaciones que prepararía a la descendencia para las contingencias ambientales a las que estuvieron sujetos los padres.

8.2. Estudios comportamentales en la F2.

Realizamos tres test comportamentales en la F2 orientados a evaluar la motivación exploratoria, la presencia de comportamientos de tipo ansioso y de tipo depresivo. Los resultados de los mismos han sido analizados de forma separada para machos y hembras debido a que se encontraron diferencias de distinta magnitud entre sexos para los diferentes test para la F1. Es importante destacar que la F2 siempre recibió alimento estándar de bioterio, ya sea durante el desarrollo a través de las madres o luego del destete. Es decir que estos test no conllevan diferentes períodos de rehabilitación alimenticia.

8.2.1. Las crías CP y HP de la F2 no presentan diferencias en el comportamiento de tipo ansioso.

Se repitió el test de campo abierto en las mismas condiciones en las que fue realizado para la F1 y la F0. El análisis univariado no arrojó diferencias entre ambos grupos experimentales, tanto para machos como para hembras, para ninguna de las variables analizadas: distancia recorrida total, distancia recorrida en el centro, distancia recorrida en la periferia, tiempo en el centro, tiempo en la periferia, latencia para ir al centro y número de *rearings*. Se realizó un MANOVA incluyendo las variables analizadas para la F1 y el mismo no arrojó diferencias entre tratamientos (machos: $F_{7,16}=0,62$ $p=0,7326$; hembras: $F_{7,11}=0,28$, $p=0,9504$).

8.2.2. Las hembras HP poseen una menor motivación exploratoria.

El test de escape de la jaula fue utilizado para evaluar motivación exploratoria, al igual que en la F1.

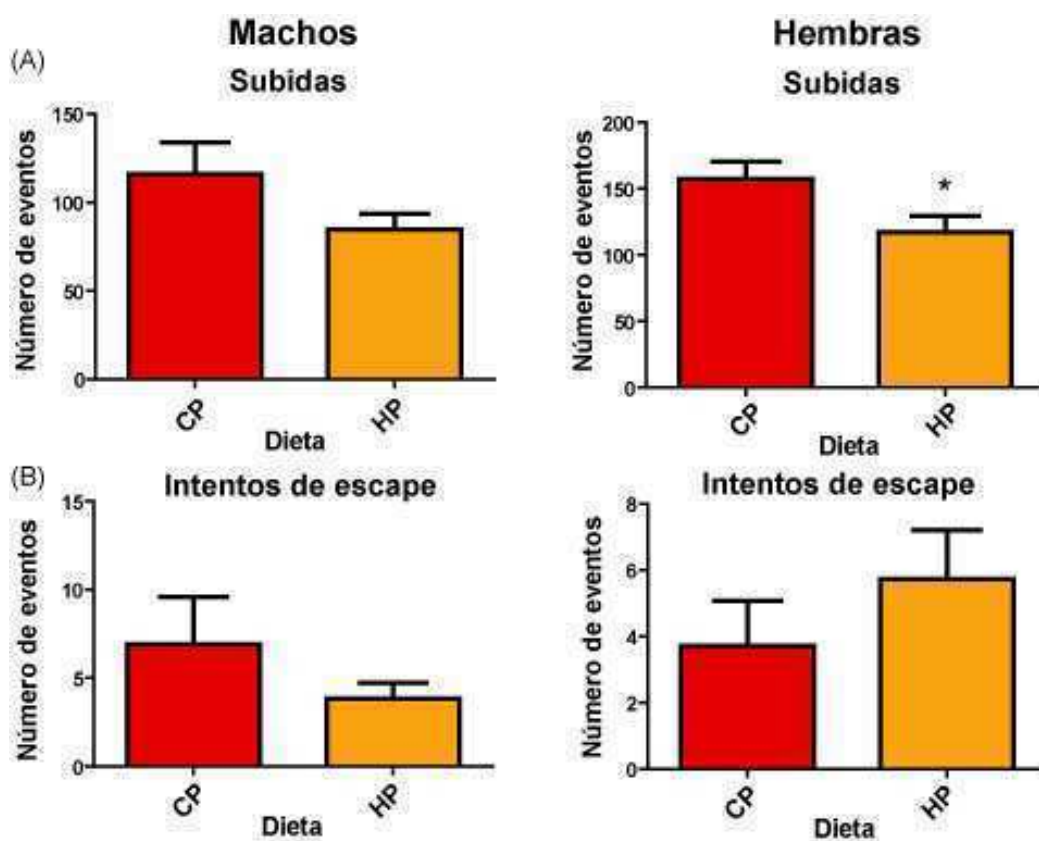


Figura 35: Escape de la jaula. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. (A) Número de subidas a la pared (número de veces que las patas traseras del animal abandonaron la base de la jaula). (B) Número de escapes (número de veces que el cuerpo entero del animal abandonó la base de la jaula). Media+EE Mann-Whitney o test *t*-Student $n=12$ machos o $n=7-12$ hembras para cada tratamiento. * $p<0.05$.

No se encontraron diferencias significativas entre grupos para los machos, excepto una tendencia del grupo HP a realizar un menor número de subidas ($t_{22}=1,545$, $p=0,0683$). En hembras, las del grupo HP realizaron un número significativamente menor de subidas ($t_{17}=2,112$, $p=0,0498$) (Figura 35).

Este resultado es en parte diferente al observado a la F1, en donde los machos HP mostraron un menor nivel de motivación, en ese caso por un menor número de intentos de escape. Pese a que el número de escapes fue similar, el número de subidas a la pared fue, en líneas generales, mayor en la F2 que en la F1 (Figura 13). Esto podría deberse a la utilización de una mayor cantidad de viruta que les facilitaba el acceso al borde de la jaula, cuando realizamos los experimentos de la F2.

8.2.3. Los machos HP presentan un mayor componente de tipo depresivo en su comportamiento.

Se realizó el test de suspensión por la cola para la F2 y, de forma sorprendente, se encontró que los machos del grupo HP tuvieron un mayor tiempo de inmovilidad en el mismo, al ser comparados con sus respectivos controles ($U_{22}=41,00$, $p=0,0391$) (Figura 36).

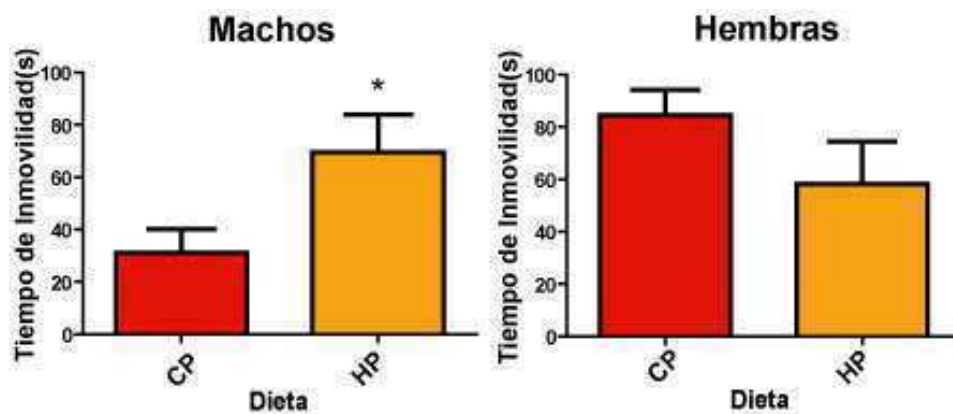


Figura 36: Test de suspensión por la cola. Machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) fueron analizados por separado. Tiempo total de inmovilidad (s) para una sesión de 6 minutos. Media+EE Mann-Whitney o test t -Student $n=12$ machos o $n=7-12$ para cada tratamiento * $p<0,05$.

A diferencia de lo observado para la F1, no se encontraron diferencias en el tiempo de inmovilidad entre hembras de ambos tratamientos.

Los resultados presentados nos indican que la malnutrición perinatal genera cambios en el individuo, que se transmiten a la generación siguiente. Los cambios a nivel

comportamental son dependientes del sexo de la cría, y reproducen algunas de las características observadas en los progenitores. Un análisis más exhaustivo del comportamiento materno de la F1 podría aclarar la contribución del mismo sobre los efectos observados. Además, experimentos a futuro utilizando machos y hembras de diferentes tratamientos como parentales, nos podrán indicar si la herencia de estas características es materna, paterna, o de ambos parentales.

Discusión

La malnutrición materna ha sido asociada a deficiencias comportamentales y neurológicas, tales como trastornos en el desarrollo de las capacidades cognitivas y también ligada a efectos perjudiciales para la salud agudos y de largo plazo. Durante este trabajo de tesis, se determinó el crecimiento físico y el desarrollo neurológico, así como comportamientos sociales, comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión y diversas características cognitivas en ratones machos y hembras sometidos a una malnutrición proteica prenatal y postnatal. Además se realizaron, en distintas etapas de la vida, mediciones de la expresión de genes, presencia de marcas epigenéticas y cambios en el número de células de la estructura hipocampal, así como el número de espinas dendríticas en la corteza cerebral, con el fin de encontrar las bases moleculares y celulares de los comportamientos y deficiencias cognitivas observadas en este modelo.

La malnutrición proteica durante la preñez y la lactancia, altera el comportamiento de las madres y el desarrollo físico y neurológico de las crías.

Nuestro primer objetivo durante el desarrollo de esta tesis fue establecer un modelo de malnutrición proteica en ratones en nuestro laboratorio. Durante esta etapa pudimos observar que la proporción de proteínas de la dieta afectaba profundamente el tamaño de la camada y la superviviencia de la misma.

Con respecto al efecto de la dieta sobre la preñez, las hembras malnutridas presentaron un menor aumento en el peso corporal durante la última etapa de la misma. Trabajos realizados en ratas han reportado no encontrar diferencias en la duración de la preñez, ni en el consumo de alimento por parte de madres alimentadas con dietas purificadas hipoproteicas, como la que usamos en este trabajo (195). Pese al menor aumento de peso de las madres, las crías presentaron un peso similar en el momento del nacimiento. Esto podría deberse al menor número de crías nacidas de madres alimentadas con la dieta hipoproteica, comparadas con las controles. Resultados similares han sido obtenidos en modelos de ratas (196), en donde se ha reportado que las diferencias observadas entre ambos grupos en el número de crías por camada se debían principalmente a una menor ovulación y en menor proporción a una pérdida antes de la implantación.

En cuanto al número de preñeces hemos encontrado que el mismo era menor en hembras del grupo hipoproteico. El mismo podría deberse, al igual que para el tamaño de la camada, a una menor ovulación y a una mayor pérdida en el período

preimplantatorio. Una mayor reabsorción fetal durante la preñez, tal como se ha observado en hembras con el ritmo circadiano alterado (197), también podría ser la causa de la menor fecundidad observada.

En la literatura se pueden encontrar modelos de malnutrición perinatal en roedores que abarcan diferentes etapas de la preñez y la lactancia, con consecuencias diferentes sobre el desarrollo de los individuos. La deficiencia proteica en la madre durante la gestación lleva a un retraso en el crecimiento intrauterino de la descendencia. Sin embargo, cuando esa cría es adoptada por una hembra alimentada con dieta control, muestra una fase de rápido crecimiento durante la lactancia (198). La combinación de un retraso en el crecimiento fetal y un crecimiento posnatal acelerado provoca un aumento en la susceptibilidad a enfermedades metabólicas y reduce la esperanza de vida. En contraste, la restricción nutricional durante la lactancia lleva a un retraso en el crecimiento de las crías, el cual se mantiene durante toda la vida (199,200).

La composición de la leche también podría afectar el desarrollo de las crías. Esta puede ser alterada por la dieta. En roedores se ha demostrado que hembras que son alimentadas con una dieta baja en proteínas, poseen una menor proporción de las mismas en su leche, así como una alta proporción de ácidos grasos (201). La leche, además de ser fuente de nutrientes, transmite a las crías otros componentes como citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas y diversas hormonas (202). La proporción de las mismas depende del estado general de la madre, y se ha visto que la falta del factor de necrosis tumoral α (TNF α) en el linaje hematopoyético de las madres, altera la proporción de diversas quemoquinas en la leche. Además se ha visto que aumenta la neurogénesis hipocampal en las crías, junto con la memoria espacial (203).

Una consecuencia de la malnutrición perinatal para la descendencia de ambos sexos es un menor tamaño corporal sostenido en el tiempo, que se hace evidente a partir de P7 en hembras y de P9 en machos. Esta diferencia de peso fue de un 30% con respecto al peso de los controles al momento del destete, y puede mantenerse aún en etapas posteriores de la vida donde los individuos con carencias nutricionales durante el desarrollo continúan siendo un 18% más livianos que los controles. Las dietas deficientes en proteínas han sido consideradas importantes reguladores de la

programación metabólica con consecuencias posteriores para la salud en roedores y humanos (204,205).

Junto con estas diferencias en el tamaño corporal, tanto los machos como las hembras del grupo hipoproteico presentaron un retraso en el desarrollo de diversos pilares del desarrollo físico tales como la aparición del pelo dorsal y ventral, la apertura del canal auditivo y de los ojos en relación a sus respectivos controles. Estas observaciones sugieren la existencia de un retraso general en el desarrollo epitelial y en la maduración del ojo (206).

Además encontramos un retraso en la maduración auditiva medida por el test de sobresalto frente a un sonido. Un retraso en la aparición de este reflejo podría estar vinculado con un retraso en la maduración del aparato auditivo, lo cual iría de la mano con el retraso observado en la apertura del canal, o con un retraso en el desarrollo cerebelar, como se verá en el párrafo siguiente, ya que las funciones auditivas y la ejecución del reflejo, también dependen del mismo (207).

El desarrollo neurológico también se vio afectado por la malnutrición proteica perinatal. Las crías de las madres que fueron alimentadas con una dieta hipoproteica mostraron un retraso en la ejecución del reflejo de enderezamiento en la superficie y de la geotaxis negativa. Estas funciones sensorimotoras reflejan, al igual que el reflejo auditivo, una maduración de la función cerebelar. El cerebelo es fundamental para el ajuste postural necesario para mantener el balance. A través de los *inputs* de los receptores vestibulares y propioceptores modula los comandos hacia las neuronas motoras compensando los cambios en la posición del cuerpo o de la carga sobre los músculos (208). Las crías de ambos grupos mostraron un desempeño similar en el test de fuerza de agarre, sugiriendo que la dieta deficiente en proteínas no produce un defecto neuromuscular, ni afecta la fuerza muscular (209). Por lo tanto, como los reflejos perinatales pueden ser considerados como un índice de maduración cerebral, los resultados obtenidos sugieren que la exposición perinatal a la malnutrición afecta los mecanismos embrionarios responsables del correcto desarrollo del mismo.

Al analizar estos resultados es importante tener en cuenta que nuestro modelo de malnutrición proteica materna no nos permite separar los efectos de la dieta sobre el desarrollo, de la influencia de los cambios en el comportamiento materno. Es

posible que los defectos observados en las crías HP para el crecimiento y desarrollo durante la lactancia se encuentren influenciados por el comportamiento de las madres (210). De hecho, nuestros resultados muestran que las madres alimentadas con dieta hipoproteica dedicaron menos tiempo a la realización de actividades de acicalamiento (*licking and grooming*) de las crías en el período perinatal. Es sabido que alteraciones en el comportamiento materno están asociadas con el desarrollo de diferencias individuales en las respuestas neurológicas y al estrés en las crías. Al llegar a la adultez, la descendencia de las madres que otorgaron una mayor proporción de cuidado materno mostraron una menor respuesta de miedo y una activación menor del eje HPA frente a un estrés (167) (40). En los animales, el estrés prenatal reduce el cuidado materno y la vinculación con las crías, quienes luego presentan un comportamiento alterado (211) (212). Sin embargo, la relación entre la nutrición materna, el cuidado materno y el riesgo de enfermedad de la descendencia aún debe ser determinada (213).

La importancia del contacto madre-hijo también se ha visto en humanos en infantes nacidos antes de término, en donde un tacto moderado (masajes) mejora el manejo del estrés cuando son adultos (214).

En el caso del comportamiento materno, se ha demostrado que esta característica se transmite a las crías hembras a través de mecanismos epigenéticos (167) (168). En nuestro caso particular, al analizar los efectos transgeneracionales no hemos encontrado, por el momento, diferencias apreciables en el cuidado materno provisto por las hembras de la F1 a sus propias crías. Estos resultados son de cualquier forma preliminares. Deberán incluirse un mayor número de camadas, antes de concluir al respecto.

Además de una menor actividad de acicalado de las crías, hemos encontrado una mayor expresión de un comportamiento de tipo ansioso en las madres. Este estado de mayor ansiedad, provocado probablemente por la dieta hipoproteica, podría contribuir también a las características comportamentales de las crías HP. En humanos, la ansiedad y depresión materna durante la preñez ha sido relacionada con un comportamiento de miedo en infantes de dos meses, una respuesta de llanto a la novedad a los cuatro meses y mayor predominancia del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (215).

La malnutrición proteica perinatal afecta la estructura hipocampal, el comportamiento y las capacidades cognitivas de las crías. Primeros indicios sobre su efecto sobre la plasticidad neuronal.

El juego social es un comportamiento prevalente durante un corto período de tiempo en roedores, que disminuye con el inicio de la maduración sexual, y puede servir para dar a los animales las capacidades básicas y las estrategias esenciales para la ejecución de una variedad de comportamientos que se expresan en el adulto (216). El desarrollo de los comportamientos sociales puede verse afectado por diversas condiciones ambientales. En este trabajo demostramos que la malnutrición proteica temprana produjo cambios en el desarrollo de comportamientos de juego en ratones, específicamente una reducción en actividades investigativas y de solicitud de juego. Una disminución similar fue reportada en ratas malnutridas (216,217). A nuestro entender esta es la primera vez que el comportamiento social juvenil fue descrito en un modelo de malnutrición proteica perinatal en ratones en animales de ambos sexos. Esto sugiere que los cambios en la expresión de juego social en ratones se deban, posiblemente, al retraso en el desarrollo y a los cambios neurológicos producidos por una dieta deficiente en proteínas.

Si el juego y otros comportamientos sociales en etapas tempranas de la vida son cruciales para la expresión de comportamientos en el adulto (218), entonces los ratones que tuvieron una dieta adecuada estarían mejor adaptados para lidiar con los desafíos impuestos por el ambiente en la adultez. Nuestros resultados, en cuanto a los niveles de comportamiento de tipo ansioso y depresivo, son consistentes con esta hipótesis.

En este trabajo encontramos diferencias que indican niveles alterados de ansiedad en ratones malnutridos aun después de un tiempo de recuperación nutricional. Las observaciones comportamentales realizadas en el campo abierto revelaron diferencias en los comportamientos de acercamiento/evitación: crías alimentadas con una dieta baja en proteínas recorrieron una menor distancia y pasaron menos tiempo en la zona central del campo que aquellas cuyas madres recibieron una dieta control. Además mostraron una latencia mayor para abandonar la zona periférica, una respuesta clásica de evitamiento del riesgo asociada con mayores niveles de ansiedad. En el test del laberinto elevado en cruz, se observó una menor

motivación exploratoria general en crías de ambos sexos, y un mayor nivel de comportamiento de tipo ansioso en machos, reflejado en una menor visita a las puntas de los brazos abiertos, la zona más expuesta del laberinto,

Las bases moleculares de esta respuesta quedan por ser estudiadas. Cambios estructurales y neuroquímicos en ciertas zonas del sistema nervioso, como el sistema GABAérgico hipocámpal, provocados por una malnutrición temprana fueron considerados los causantes de los efectos observados sobre los comportamientos de tipo ansioso (219). Recientemente se ha demostrado que la restricción proteica durante la gestación disminuye significativamente la llegada al feto de ácidos grasos esenciales y lípidos fundamentales para el correcto desarrollo del cerebro en ratas (220). Esta deficiencia en el contenido de ácidos grasos podría afectar regiones del cerebro importantes involucradas en el comportamiento de aproximación/evaluación del riesgo en la descendencia. Por otro lado, estudios en animales y humanos han demostrado que la exposición a una malnutrición global durante el período perinatal está frecuentemente asociada con una alteración en el funcionamiento del eje hipotálamo - hipófisis - adrenal (HPA) en períodos posteriores de la vida (221,222). Se ha encontrado también un aumento en los niveles basales de corticosterona en ratas adultas malnutridas pre- y posnatalmente (223). Estos estudios sugieren que la programación durante el desarrollo del eje HPA en ratones malnutridos pre- y posnatalmente puede resultar en un defecto persistente en el *feedback* del eje, que conduce a la expresión de comportamientos anormales.

Los efectos de una malnutrición proteica temprana en las capacidades emotivas están respaldados por diversos estudios. Sin embargo, parece no haber un consenso acerca de la direccionalidad de estos efectos. Mientras algunos autores indican que existe un aumento en la ansiedad en animales que fueron malnutridos tempranamente y luego tuvieron un período de recuperación nutricional, y en aquellos que sufrieron de una malnutrición crónica; otros sugieren que la malnutrición temprana altera los mecanismos de evaluación de riesgos, observándose un efecto ansiolítico por parte de la misma (79,219,223). En este aspecto resulta importante considerar las posibles diferencias entre especies así como las técnicas para inducir la malnutrición temprana (224).

Estos comportamientos complejos requieren no solamente de una coordinación motriz, si no también de una integración sensorial. Una función sensorial normal tiene una importancia crítica en el funcionamiento social y exploratorio. El cambio en el comportamiento exploratorio es particularmente interesante porque la búsqueda de la novedad se piensa que requiere de sistemas cerebrales modulados por dopamina y se encuentra alterado en diversas manifestaciones clínicas. Estudios con niños malnutridos muestran una tendencia similar a las encontradas en el presente estudio: diversas alteraciones comportamentales como apatía, disminución en la actividad y exploración del ambiente (65,66).

Una de las diferencias comportamentales más llamativas fue la presencia de un comportamiento de tipo depresivo en las hembras del grupo HP. A pesar del conocimiento general de que las mujeres son más susceptibles que los hombres de sufrir de un trastorno psiquiátrico relacionado con un mal manejo de estrés, como la depresión, muchos de los trabajos relevantes en este campo han sido conducidos en modelos de roedores utilizando machos, y existe menos información disponible en relación a la respuesta de las hembras a un estrés (225).

En aquellos trabajos en los que se han analizado ambos sexos, se ha reportado en distintos modelos en roedores, que el estrés prenatal ejerce un efecto diferente en machos y hembras. En líneas generales, el estrés prenatal incrementa en forma más pronunciada en hembras la ansiedad, la depresión y la duración de la respuesta al estrés. Los machos, en cambio, son más propensos a sufrir de deficiencias cognitivas (226). Estos resultados concuerdan con lo observado durante esta tesis en el test de suspensión por la cola para hembras, y en los test de laberinto en Y y reconocimiento de objeto novedoso en donde los machos HP tuvieron un peor desempeño que sus respectivos controles. Bajo las mismas condiciones, no encontramos diferencias en la memoria de largo término en hembras, pero sí una clara tendencia que indicaría que las hembras HP podrían sufrir de la misma deficiencia. Además, encontramos un mayor comportamiento de tipo ansioso para ambos sexos en los ratones que sufrieron de malnutrición durante el desarrollo. De cualquier forma, aunque en líneas generales se ha visto que el estrés perinatal altera la respuesta luego de una situación estresante, la forma en que la misma es alterada depende del momento en el cual las madres son

sujetas a un estrés durante la preñez, la naturaleza del mismo, la especie en estudio y la edad de testeo de las crías (226).

En cuanto a los tests utilizados para estudiar las capacidades cognitivas de las crías, el test de alternancia espontánea en el laberinto en Y mide la voluntad de los roedores por explorar ambientes nuevos (el roedor prefiere visitar un brazo nuevo antes de volver a uno ya visitado) y la memoria de trabajo espacial de los mismos. Esta tarea involucra diversas zonas del cerebro como el hipocampo, el septum, el prosencéfalo y la corteza prefrontal (227). Los resultados obtenidos indicarían que, bajo las condiciones estudiadas, los ratones hipoproteicos no presentarían defectos en el aprendizaje espacial.

El laberinto en Y con claves nos permitió estudiar la memoria de corto término en relación al aprendizaje espacial dependiente del hipocampo (228). La misma se encontró intacta en hembras del grupo hipoproteico, que fueron igualmente capaces que sus respectivos controles de identificar el brazo novedoso y mostraron una clara preferencia exploratoria por el mismo. En cambio los machos del grupo hipoproteico, pese a identificar de forma correcta el brazo novedoso (primera elección) no mostraron una preferencia exploratoria por el mismo, medida como tiempo dedicado a su investigación. Esto podría deberse a un estado de ansiedad producido por el nuevo espacio, lo cual en un principio podríamos descartar debido a que la primera elección fue correcta, indicando falta de temor por ingresar en un lugar desconocido. En este punto cabe destacar que las condiciones en las que se realiza este test son de baja luminosidad y el espacio no es expuesto, condiciones que no favorecen la expresión de comportamientos ansiosos. La menor exploración podría deberse a una menor motivación investigativa. Esta hipótesis la podríamos descartar ya que el número de entradas en los diferentes brazos fue similar para ambos grupos, lo cual nos estaría indicando similares niveles de voluntad explorativa. Estos resultados nos sugerirían, finalmente, que existe un defecto suave en la memoria de corto término de machos que sufrieron malnutrición proteica perinatal, que no se ve reflejado en la primera elección del brazo pero sí en la preferencia exploratoria del brazo novedoso. De forma similar, las crías de hembras que proveen bajos niveles de cuidado materno, poseen un menor desempeño en tests de aprendizaje espacial (37).

El test de reconocimiento de un objeto novedoso ha sido ampliamente utilizado para evaluar el estado de la memoria declarativa en roedores, tanto de corto, como de largo término (187). El mismo puede ser configurado además para medir memoria de trabajo, atención y preferencia por la novedad (229,230). Este test resulta particularmente atractivo ya que no requiere de una motivación externa, recompensa o castigo, solo una habituación al ambiente y un entrenamiento previo (230). Como se mencionó anteriormente, cuando los animales son expuestos a un objeto familiar y a uno novedoso, estos pasan más tiempo explorando el novedoso (231). El reconocimiento de la novedad requiere más habilidades cognitivas por parte del animal que las tareas que miden exploración de un ambiente nuevo. En nuestro modelo, al evaluar la memoria de largo término en esta tarea, encontramos una menor interacción de los individuos que sufrieron de una malnutrición perinatal proteica con el objeto novedoso, resultado que nos estaría señalando un defecto en este tipo de memoria. Este defecto fue más evidente que el obtenido para el aprendizaje espacial medido con el laberinto en Y. Esto puede deberse a que, como se mencionó anteriormente, el test del objeto novedoso es más complejo, o a que los defectos sean mayores cuando está involucrada una memoria de largo término. Podemos descartar una falta de preferencia por la novedad o un estado de ansiedad inducido por el objeto nuevo ya que no encontramos diferencias cuando la presentación del objeto nuevo se realizó al poco tiempo del entrenamiento.

El hipocampo es una estructura cerebral que cumple un rol importante en tareas de aprendizaje espacial, en la consolidación de la memoria, en la estabilización de la memoria de corto término en una de largo término, y en el procesamiento de situaciones estresantes (190). En concordancia con esto y con los defectos cognitivos y características comportamentales de los individuos HP, encontramos que la densidad de neuronas maduras en diversas zonas de esta estructura era menor en individuos que habían sufrido de una malnutrición perinatal.

Contrario a lo esperado en un primer momento, no encontramos un indicio de menor plasticidad sináptica, medida como el número de espinas dendríticas, si no por el contrario, un incremento en la mismas en hembras HP luego de tres semanas de rehabilitación alimenticia. Este resultado concuerda en parte, con lo observado para la expresión de ciertos genes, como se discutirá a continuación. Sin embargo son

necesarios estudios, que involucren la evaluación del estado de maduración de las espinas, utilizando además un mayor número de animales.

Alteración de la expresión génica y su posible relación con las características comportamentales y cognitivas de los individuos que fueron sujetos a una malnutrición proteica perinatal.

Los estudios a nivel molecular fueron realizados en hipocampo y corteza cerebral. El primero fue elegido debido a que interviene en el manejo del estrés y en una variedad de funciones de la memoria asociativa, declarativa y de navegación espacial. En cuanto a la corteza, diversas zonas de la misma intervienen en tareas de memoria, la corteza prefrontal en particular, regula la expresión y consolidación de memorias asociativas.

Uno de los genes estudiados, la neurotrofina BDNF, es esencial para la plasticidad sináptica en el adulto y para la formación de diversos tipos de memoria, tanto asociativa como declarativa. La misma se expresa en diversas áreas del cerebro como el hipotálamo, la amígdala, el hipocampo y el neocortex (232). En este trabajo encontramos una menor expresión del mensajero de BDNF en cortezas de machos y hembras de 3 semanas de edad del grupo HP. Esta diferencia no fue encontrada en machos después de 3 semanas de rehabilitación alimenticia y se invirtió en hembras de 6 semanas. Este resultado podría indicar que existe cierta reversión a nivel molecular de la alteración de la expresión génica en ratones de mayor edad, tal vez debido a una recuperación alimenticia. Sin embargo, se encontraron alteraciones comportamentales y cognitivas en ratones HP de 6-10 semanas, indicando que, en caso de estar estas deficiencias ligadas a la expresión de BDNF, su aumento luego del cambio en el alimento no fue suficiente para eliminarlas. De forma análoga a lo observado en este trabajo, una disminución en la expresión de BDNF en corteza ha sido reportada en ratas sujetas a un estrés posnatal por separación materna (233), modelo que, como ya se ha mencionado, está asociado a alteraciones comportamentales y cognitivas similares a las que encontramos.

Los genes inmediatos tempranos Egr1 y Arc han sido asociados a tareas de aprendizaje y memoria debido a que su expresión aumenta rápidamente durante estas tareas, y este aumento es necesario para la realización de las mismas(234) (235). Este incremento en la expresión se ha visto para ambas proteínas tanto en la zona del

hipocampo como de la corteza (236,237). De forma análoga a lo observado para BDNF, encontramos una disminución en ambas proteínas en cortezas de hembras HP de tres semanas, que se mantuvo en el caso de Arc hasta las 6 semanas. Esta diferencia se revirtió para Egr1 a las 12 semanas y para Arc se observó la misma tendencia, aunque no significativa para la proteína, pero sí para su mensajero. La similitud entre la expresión de ambas proteínas concuerda con el rol de Egr1 como factor de transcripción de Arc (238). En corteza de machos HP encontramos un aumento de la proteína Arc en relación a los controles, luego de 3 semanas de alimentación completa.

Al estudiar la expresión de Egr1 en el hipocampo, encontramos diferencias entre grupos a las 12 semanas, siendo esta menor para hembras HP y mayor para los machos, en relación a sus respectivos controles. Estos cambios son posteriores a las edades analizadas para los test comportamentales, motivo por el cual resultaría interesante estudiar más adelante si las diferencias observadas en individuos de 6-10 semanas, se mantiene luego de un mayor tiempo de rehabilitación alimenticia.

Estos primeros análisis indicarían que existiría una alteración de diversos genes en ratones con malnutrición proteica perinatal que es revertida en algunos casos a edades más avanzadas, sea por la maduración natural de ambos animales o por una rehabilitación alimenticia. Otra posibilidad es que no se trate de una reversión, sino que exista un incremento transitorio de la expresión de las proteínas analizadas a una edad determinada, y que este incremento esté retrasado en ratones que sufrieron de una malnutrición perinatal.

Estos resultados preliminares dan lugar a diversas preguntas que sería interesante abordar en estudios posteriores. Primero, si a edades más avanzadas, con un período mayor de alimentación completa, estas deficiencias se siguen manteniendo. Además se ha visto que BDNF se expresa en una variedad de células en el sistema nervioso central, esto es fibroblastos, astrocitos y neuronas de diversos tipos (232), de forma que sería interesante estudiar en que tipos celulares se encuentra alterada la expresión del ARNm. Finalmente, nos queda por saber si el aumento de BDNF, Arc y Egr1, que se ha reportado ocurre en el hipocampo durante la ejecución de tareas que requieren de un aprendizaje espacial, se produce con la misma magnitud en ratones que han sufrido de una malnutrición proteica perinatal (239).

La quinasa Cdk5 es una proteína que se encuentra ampliamente expresada en el sistema nervioso central. A través de sus funciones como reguladora del reciclado de las vesículas sinápticas, la formación de espinas dendríticas y la excitabilidad neuronal, facilita la plasticidad cerebral, el aprendizaje y la memoria (240). De forma opuesta, se ha visto una mejora en tareas de aprendizaje en ratones *knockout* condicionales para este gen. Su actividad exacerbada en neuronas puede llevar además a la neurodegeneración (194). En este trabajo encontramos una disminución en la cantidad de Cdk5 en cortezas de machos HP de tres semanas. Al estudiar machos HP de 6 y 12 semanas encontramos un aumento de la misma en corteza e hipocampo, respectivamente. En hembras HP la expresión de Cdk5 fue significativamente menor en corteza a las 6 semanas. En machos nuevamente los cambios se encontraron asociados a edades mayores luego de una rehabilitación alimenticia. De cualquier forma, debido al rol dual de Cdk5, es difícil interpretar el sentido de estos cambios. Estudiar más adelante el efecto de los inhibidores de Cdk5 y la expresión de sus reguladores p35 y p25 en neuronas funcionales o apoptóticas, puede ser de utilidad para entender mejor qué papel juega Cdk5 en relación con la neurodegeneración o plasticidad, en nuestro modelo de malnutrición.

En cuanto a la presencia de diversas modificaciones epigenéticas, pudimos observar un incremento transitorio en los niveles de H3 e H4 acetilada global corteza de hembras HP, y un incremento hasta por lo menos las 12 semanas de vida en los niveles de H3 acetilada en hipocampo. Esto nos indica que la malnutrición perinatal provoca un cambio general en la transcripción de diversos genes en ratones. Estudios futuros enfocados en los genes que se encuentran diferencialmente regulados, podrán proveer información acerca del sentido de este cambio.

Cabe destacar que el hecho de encontrar una reversión en las diferencias observadas en la expresión de diversos genes y en el aumento de espinas dendríticas a edades más avanzadas, no elimina la posibilidad de que los efectos de la malnutrición sean perdurables en el tiempo, especialmente cuando la misma estuvo presente en etapas claves del desarrollo de los individuos.

Las crías de ratones que sufrieron una malnutrición perinatal muestran cambios en el desarrollo y alteraciones comportamentales sexo dependiente.

Evidencias recientes sugieren que las consecuencias a largo plazo de un ambiente adverso en etapas tempranas del desarrollo, podrían no estar limitadas a la generación expuesta al mismo, sino que podrían transmitirse a las generaciones siguientes que nunca estuvieron en contacto con el mismo (241). En el presente trabajo pudimos observar que las crías de los ratones que sufrieron de una malnutrición proteica perinatal, presentaron también un leve retraso en el desarrollo neurológico medido por el reflejo de enderezamiento en la superficie y el reflejo de geotaxis negativa, reproduciendo parcialmente el defecto observado en la F1, aun cuando esta nueva generación nunca estuvo expuesta a una alimentación deficiente. En este caso el cambio producido por el ambiente tendría el mismo sentido para ambas generaciones, tal como se ha visto para el cuidado materno, el manejo del estrés y la presencia de comportamientos de tipo depresivo en roedores (37) (169) (170). De forma opuesta, ciertos rasgos marcadores del desarrollo físico, como la aparición del pelo dorsal y ventral, fueron observados a edades más tempranas en ratones cuyos padres y madres sufrieron de una malnutrición perinatal. Un efecto similar fue observado en humanos, en donde los nietos de mujeres que estuvieron embarazadas durante la hambruna holandesa presentaron un aumento en la adiposidad neonatal. Además el índice de masa corporal fue mayor en recién nacidos hijos de padres que fueron expuestos a la hambruna *in utero* (241). Este leve adelanto en el desarrollo físico sería consistente con una respuesta compensatoria que prepararía a las generaciones futuras para enfrentar el ambiente adverso con el que estuvieron en contacto los padres (242).

A nivel comportamental las alteraciones observadas en la F2 fueron dependientes del sexo. En hembras se encontraron evidencias de un menor comportamiento exploratorio, mientras que los machos presentaron un mayor comportamiento de tipo depresivo. La herencia de una respuesta al estrés alterada ha sido observada en modelos de estrés posnatal por bajo cuidado materno, y estrés prenatal, por restricción física de la madre, como se ha mencionado ya en la introducción (37) (170). Además una dependencia con el sexo ha sido reportada utilizando un modelo de inestabilidad social generada por una perturbación de la jerarquía social durante la adolescencia (243). En este trabajo se encontró una alteración en los niveles de ansiedad y los comportamientos sociales que fue más marcada en hembras, sin embargo solo por la línea paterna se heredaron la totalidad de estas características.

En líneas generales durante el desarrollo de esta tesis establecimos un modelo de malnutrición proteica perinatal en ratones, en donde encontramos alteraciones comportamentales en las tres generaciones estudiadas, la F0, F1 y F2. Además encontramos defectos cognitivos en la F1 y un desarrollo diferencial en la F1 y F2. Los cambios cognitivos y comportamentales de la F1 estuvieron acompañados por cambios estructurales en el hipocampo y una expresión diferencial de diversos genes dependiente de la edad. El establecimiento del modelo de malnutrición y estos primeros estudios abrieron una nueva línea de investigación que ha dado lugar a diversas nuevas e interesantes preguntas.

Materiales y Métodos

1. Animales y dietas.

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6JFcen (en adelante C57BL/6J) y de la colonia CrlFcen:CF1 (en adelante CF-1) del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, con la excepción de una camada de animales C57BL/6J producida en el bioterio de Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Las dietas utilizadas en esta tesis fueron preparadas de acuerdo al reporte realizado por la AIN-93 (Reeves, Nielsen et al. 1993) y su composición está detallada en la Tabla 1.

Ingredientes	Dieta Control (CP)		Dieta Hipoproteica (HP)	
	Peso (g/kg)	Calorías (kcal/kg)	Peso (g/kg)	Calorías (kcal/kg)
Almidón de maíz dextrinizado	529,50	2.118,00	639,50	2.558,00
Caseína	200,00	800,00	90,00	360,00
Sacarosa	100,00	400,00	100,00	400,00
Alfa Celulosa	50,00	0,00	50,00	0,00
Aceite de soja	70,00	630,00	70,00	630,00
Mezcla de minerales(AIN-93G-MX)	35,00	0,00	35,00	0,00
Mezcla de vitaminas (AIN-93-VX)	10,00	40,00	10,00	40,00
L-Cistina	3,00	12,00	3,00	12,00
Bitartrato de colina	2,50	0,00	2,50	0,00

Tabla1: Composición de las dietas expresado en gramos por kilogramo y valor energético aportado por cada componente expresado en kilocalorías por kilogramo de dieta.

Salvo excepciones indicadas al principio del trabajo de tesis en donde se testearon dietas hipoproteicas con un 6% u 8% de caseína, la dieta hipoproteica utilizada es la que figura en la tabla (9% caseína).

Los ratones parentales (F0) machos y hembras fueron alimentados con dieta control o hipoproteica durante los cinco días previos al apareamiento. El mismo se realizó alojando dos hembras nulíparas por diez días consecutivos luego de los cuales cada hembra fue alojada individualmente. Los parentales fueron alimentados con dieta control o hipoproteica durante el apareamiento, luego del cual las hembras fueron mantenidas con la dieta correspondiente y su peso fue controlado periódicamente. En los primeros días postparto se removieron los individuos excedentes con el fin de balancear el número de crías entre camadas. Las hembras de la F0, que después del destete fueron testeadas en el laberinto elevado en cruz y el campo abierto, fueron mantenidas con la misma dieta hasta la finalización de los test. Las crías (F1) fueron destetadas al día 21 posnatal (P21), momento a partir del cual fueron alimentados con dieta estándar de bioterio.

Para la obtención de una segunda generación (F2), se utilizaron un macho y una hembra de distintas camadas de la F1 (244), pero pertenecientes al mismo tratamiento (control o hipoproteico de acuerdo a la dieta de la F0). Se siguió el mismo protocolo de apareamiento utilizado para la F0, con la excepción de que se mantuvo a los animales con alimento estándar de bioterio en todo momento.

Los animales fueron mantenidos en un ciclo de 12 horas de luz (6:00 a 18:00) y 12 de oscuridad. El agua y la comida fueron suministrados *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados respetando las regulaciones locales y las enunciadas por el National Institute of Health (NIH) en su *Guide of the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH publicación 80-23/96). Los protocolos experimentales fueron previamente aprobados por la Comisión Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Se realizaron los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento animal y el número de individuos utilizados.

2. Evaluación del desarrollo.

2.1. Desarrollo físico.

Las crías fueron pesadas día por medio a partir de P1. Para el estudio del desarrollo físico los siguientes cambios fueron observados y registrados para cada individuo: aparición de pelo dorsal y ventral, despegado del pabellón auditivo, apertura del canal

auditivo y apertura de los ojos. Los parámetros físicos fueron expresados como el día postnatal en el cual se observó la aparición de los mismos.

2.2. Desarrollo neurológico.

El progreso en el desarrollo neurológico fue evaluado durante la lactancia mediante los siguientes test:

Reflejo auditivo: Las crías fueron colocadas sobre una superficie plana. Se utilizó una pieza de cotillón para producir un sonido de 80 dB sobre un background de 74 dB a 15cm del animal, y se registró la ausencia o presencia del reflejo de sobresalto. Este reflejo fue evaluado en las edades impares entre P15 y P21.

Reflejo de enderezamiento en la superficie: Las crías fueron colocadas sobre sus espaldas sobre una superficie plana y se tomó el tiempo que les llevaba volver a una posición ventral, hasta un máximo de 60 segundos. Este reflejo se midió a partir de P2 hasta que fueron capaces de ejecutar el movimiento en no más de un segundo durante dos días consecutivos.

Geotaxis negativa: Los ratones fueron ubicados sobre una grilla metálica con 25° de inclinación, con la cabeza orientada hacia abajo (Figura 1). El desempeño fue medido como el tiempo que les llevó rotar 90°, hasta un máximo de 60 segundos. Las mediciones fueron realizadas en las edades impares entre P 5 a 13.

Fuerza de agarre: La fuerza de agarre se testeó día por medio en crías de entre 12 y 20 días de edad. Las crías fueron colocadas sobre una grilla metálica que fue ligeramente sacudida para que los individuos se aferraran a ella. La grilla fue luego girada 180° en sentido vertical dejando a los ratones colgando 30 cm (Figura 2) por encima de una jaula con lecho limpio. Se registró el tiempo durante el cual permanecieron aferrados a la grilla hasta un máximo de 60 s.



Figura 1: Grilla inclinada para la medición de la geotaxis negativa.



Figura 2: Montaje para la medición de la fuerza de agarre.

3. Observaciones y test comportamentales.

3.1. Comportamiento materno.

El cuidado materno fue evaluado entre los días P1 y P7. Las madres fueron observadas todos los días durante una hora entre las 10:00 y las 12:00. Durante este tiempo se registró, cada minuto, la actividad realizada por las madres. Estas actividades fueron clasificadas en las siguientes categorías: Postura de amamantamiento sobre las crías, acicalamiento de las crías (LG por las siglas de *licking and grooming* en inglés), ubicación en el nido pero sin postura de amamantamiento, olfateo de las crías, olfateo del ambiente en el nido, cavado y construcción del nido, traslado de crías al nido, auto-acicalamiento en el nido, traslado de crías con el hocico, beber, alimentación, pararse en dos patas (*rearing*), trepar, auto-acicalamiento fuera del nido, exploración del ambiente, dormir fuera del nido, roer. Se realizaron 60 observaciones separadas cada un minuto durante una hora y el tiempo dedicado por cada madre a cada una de las actividades, fue calculado asignándole 1 minuto de duración a cada observación de la misma. Luego se realizó un promedio para cada madre de los valores obtenidos durante los siete días.

Los test laberinto elevado en cruz y el campo abierto en la F0 fueron realizados como se describe más adelante para la F1, una semana luego del destete de las crías. Las madres fueron mantenidas con el mismo alimento hasta la conclusión de los mismos.

3.2. Test comportamentales en la F1.

Los ratones no fueron manipulados previamente, salvo para los cambios rutinarios de jaulas, a menos que se especifique lo contrario. Antes de cada test los animales fueron habituados, durante 40-50 min, a la habitación en la que se realiza la prueba, con la

excepción del test de condicionamiento del miedo. Para todos los test se limpiaron los laberintos o arenas utilizados entre animales con etanol 20%. En los test que involucraban varias sesiones, una a continuación de la otra, para el mismo animal (reconocimiento de objeto, interacción social) las arenas no fueron limpiadas entre sesiones. El test de juego juvenil fue realizado en individuos de entre 22-26 días de edad. El resto de las pruebas fue realizado en individuos de 6 a 11 semanas de edad. Para cada test se trabajó en el mismo día con ratones de ambos tratamientos nacidos con no más de tres días de diferencia. En caso de realizar una serie de testeos en tándem, los mismos se efectuaron dejando un lapso de por lo menos cuatro días entre cada test. En caso de realizar más de un mismo test en la misma cohorte, se respetó el siguiente orden: interacción social, laberinto elevado en cruz, campo abierto, escape de la jaula, laberinto en Y alternancia espontánea, laberinto en Y con claves, reconocimiento de objeto novedoso, dominancia social, condicionamiento del miedo o test de suspensión de la cola.

3.2.1. Juego juvenil.

Las actividades de juego juvenil fueron analizadas en parejas de ratones del mismo sexo, edad y peso lo más cercano posible. Las mismas fueron integradas por un ratón del tratamiento control y uno del hipoproteico que nunca habían entrado en contacto. Los test comenzaron a las 17:00 con las luces dispuestas a 10 lux. Los sujetos fueron habituados a la habitación de testeo de forma individual en una jaula estándar sin agua ni comida. A continuación, cada individuo fue colocado por 10 minutos en la arena experimental (21x30x23 cm) con paredes negras y cubierta por una fina capa de aserrín. Una marca negra fue pintada en la cola de uno de ellos con el fin de identificarlo. Luego, ambos ratones fueron colocados en la arena y fueron dejados para interactuar libremente por 30 minutos (245). La sesión fue grabada y analizada de forma independiente. Los parámetros de comportamientos sociales de ratones juveniles fueron los reportados por Cox y Rissmana (245), con leves modificaciones (Tabla 2).

Interacciones sociales	Contacto pasivo: Sentarse en estrecho contacto con el compañero (duración).
	<i>Grooming</i> social: Acicalado del compañero (duración).
	Auto- <i>grooming</i> social: Auto-acicalado en estrecho contacto con el compañero (duración).

Comportamientos no sociales	Exploración de la arena de testeo (duración).
	Auto <i>grooming</i> no social: Auto-acicalado sentado solo (duración).
	Sentarse: Sentarse lejos del compañero (duración).
	Pararse en dos patas (<i>rearing</i>) apoyado contra la pared (frecuencia).
	Pararse en dos patas (<i>rearing</i>) apoyado contra la pared (frecuencia).
	Saltar contra las paredes (frecuencia).
Investigación del compañero.	Olfateo Anogenital: Olfateo de la región anogenital del compañero (frecuencia).
	Olfateo de Nariz: Olfateo de la nariz del compañero (frecuencia).
	Olfateo de Cuerpo: Olfateo del compañero en el cuerpo exceptuando la nariz y la zona anogenital (frecuencia).
	Seguimiento: Seguir al compañero por la arena de testeo (frecuencia).
Solicitud de Juego.	Arrastrarse por encima o por debajo del compañero (frecuencia).
	Empujar (frecuencia).
	Acercarse a la cabeza (frecuencia).

Tabla 2: Comportamientos medidos en el test de Juego Juvenil.

3.2.2. Interacción social.

El dispositivo consiste en una caja rectangular de poliestireno negro (15x41x25 cm) conteniendo dos cilindros de acrílico transparente (d:7 cm h:15 cm) ubicados en puntas opuestas sobre el lado más largo. El ratón fue colocado en la caja permitiendo la exploración de la arena y los cilindros durante 5 min. Los cilindros poseen agujeros de 1 cm de diámetro distribuidos de forma homogénea en toda su superficie mediante los que se permite la exploración olfativa de lo que se encuentra en su interior (Figura 3). Luego de la sesión de habituación, en uno de los cilindros se coloca un ratón de 3 semanas desconocido para el ratón testado (ratón estímulo), y un tubo de rollo de fotos en el otro cilindro. El ratón es colocado nuevamente en la arena para su exploración durante 10 minutos. Ambos

estadios fueron grabados usando el ANY-Maze™ Video Tracking Software (Stoelting). Se midió el tiempo que dedicó el ratón a explorar el interior de cada uno de los cilindros.



Figura 3: Aparato utilizado para el test de interacción social. Los tubos fueron cubiertos a fin de evitar el escape de los ratones estímulo o la entrada del ratón a testear (no incluido en la foto)

3.2.3. Dominancia social.

El dispositivo consiste en un tubo acrílico de 3,4 cm de diámetro y 30 cm de largo (Figura 4). El test se realizó enfrentando un ratón control y uno hipoproteico del mismo sexo, edad y peso. Se colocaron los ratones uno en cada extremo y soltándolos al mismo tiempo de modo que se encuentren en el medio del cilindro. El test concluyó cuando uno de los ratones retrocedió quedando la base de la cola en el extremo del tubo o cuando ninguno de los ratones retrocedió hasta dicha posición dentro de los 3 minutos de iniciado el test. Se denominó dominante al ratón que se mantuvo dentro del tubo y se midió la latencia para la emergencia de uno de los ratones.



Figura 4: Tubo utilizado para el test de dominancia social.

3.2.4. Laberinto elevado en cruz.

El aparato consiste en un laberinto de piso oscuro con una plataforma central (5x5 cm) que conecta cuatro brazos perpendiculares de 30 cm de longitud. Dos brazos tienen paredes oscuras de poliestireno de 15 cm de altura (brazos cerrados), y los otros dos sin

paredes salvo un pequeño zócalo de 0,5 cm (brazos abiertos). El laberinto se ubica a 50 cm del suelo (Figura 5). La prueba se realizó colocando el ratón en la plataforma central frente a uno de los brazos abiertos y permitiendo que explore el dispositivo durante 5 min. La sesión fue filmada con una cámara de video colocada por encima del laberinto y grabada con el ANY-Maze™. Un observador sentado fuera de la habitación registró, utilizando el software mencionado, las siguientes actividades: el número de veces que el ratón se paró en dos patas (*rearings*), el número de inmersiones de cabeza y el número de inmersiones de cabeza protegidas (inmersión de cabeza mientras el animal aún estaba en la plataforma central) y el tiempo total que el animal dedicó a acicalarse. Las luces se fijaron en 100 lux.



Figura 5: Vista superior del laberinto elevado en cruz.

3.2.5. Campo abierto.

El campo abierto consiste en una arena cuadrada de 45 cm de lado con paredes y fondo oscuros (Figura 6). Una zona central de 23 cm de lado fue marcada virtualmente mediante el Software ANY-Maze™. El resto de la superficie de la caja se denomina periferia. El ratón fue colocado junto a uno de los lados y se les permitió explorar el ambiente durante 20 min. La sesión fue grabada y el movimiento de los ratones fue registrado utilizando el ANY-Maze™. Un observador sentado fuera de la habitación registró, utilizando el software mencionado, las siguientes actividades: el número de veces que el ratón se paró en dos patas (*rearings*), y el tiempo total que el animal dedicó a acicalarse. Las luces se fijaron en 100 lux.



Figura 6: Vista superior del campo abierto.

3.2.6. Escape de la jaula.

Los ratones fueron colocados en una jaula idéntica a su jaula de alojamiento con 3 cm de lecho limpio y dejados durante 10 min en la habitación. Durante ese tiempo se registraron las siguientes actividades: número de trepadas a la pared de la jaula (definida como el número de veces que el ratón se toma del borde la pared con las extremidades delanteras levantando del suelo las extremidades posteriores) y los intentos de escape (definido como el número de veces que el ratón alcanza ubicarse con las cuatro patas sobre la pared de la jaula). Los ratones fueron devueltos a la jaula de testeo luego de cada intento de escape cada vez que se lo consideró necesario. Las luces fueron fijadas en 10 lux.

3.2.7. Test de suspensión por la cola.

El dispositivo está constituido por un alambre delgado sostenido por dos soportes verticales (Figura 7). Los ratones fueron suspendidos del alambre por la cola mediante cinta adhesiva de algodón durante 6 minutos. Se registró el tiempo total de inmovilidad durante la sesión la sesión. Las luces se mantuvieron a 100 lux.



Figura 7: Vista superior del aparato para el test de suspensión por la cola.

3.2.8. Laberinto en Y. Alternancia espontánea.

La memoria de trabajo se evaluó mediante el desempeño en una tarea de alternancia espontánea en un laberinto en Y. El equipo consiste de una pieza de acrílico transparente con tres brazos de 40 cm de largo, 13 cm de altura, 3 cm de ancho en la base y 10 cm en los bordes superiores, con ambas paredes del brazo inclinadas con el mismo ángulo interno (Figura 8). Los pisos del laberinto están cubiertos con una base de syntrax negro para facilitar el seguimiento de los animales. El ratón fue colocado en el extremo de un brazo y se le permitió explorar libremente el laberinto durante una sesión de 8 minutos. El recorrido realizado por el ratón fue registrado con una cámara colocada directamente sobre el laberinto y luego analizado con el software ANY-Maze. La luz se fijó a 30 lux durante el test. La alternación correcta fue definida como una serie de tres entradas consecutivas, una en cada uno de los brazos del laberinto. De esta forma el número máximo de alternancias fue igual al número total de entradas menos dos, por lo que el porcentaje de alternancia se calculó como: $\text{alternancias correctas} / \text{máximo de alternancias}$. Las reentradas al mismo brazo luego de pasar por el centro, no fueron consideradas como cambios de zona.



Figura 8: Vista superior del laberinto en Y.

3.2.9. Laberinto en Y. Testeo con clave.

Con el objeto de evaluar el reconocimiento y aprendizaje espacial se aplicó una prueba de dos sesiones con claves espaciales en el laberinto en Y (246). Se utilizó el mismo equipo que en el punto anterior. Si bien el interior de los tres brazos es idéntico, por lo que no hay posibilidad de identificación espacial, la transparencia de sus paredes permite la visualización de claves externas. Las mismas consistieron en diferentes figuras geométricas con o sin patrones de colores, ubicadas en las paredes de la sala. El ratón a testear fue colocado en el extremo de uno de los brazos (brazo de inicio), y se le permitió explorar el laberinto con uno de sus brazos cerrados (brazo novedoso) durante 10 minutos (sesión de entrenamiento). Se utilizó el mismo brazo de inicio para todos los ratones, pero se alternó la ubicación del brazo que se mantiene abierto (familiar) durante el entrenamiento. Terminada la sesión de entrenamiento y luego de un lapso de 20 min el ratón fue colocado nuevamente en el brazo de inicio del laberinto y se le permitió explorar libremente los tres brazos del mismo durante 5 min (sesión de testeo). La luz se mantuvo a 30 lux durante ambas sesiones. Para todos los individuos se registró la elección del primer brazo (novedoso vs. familiar), el número de entradas, la distancia recorrida y el tiempo que dedicaron a la exploración de cada brazo con el programa ANY-Maze. No se encontraron diferencias entre individuos del mismo tratamiento de acuerdo a cual fue la designación del brazo novedoso y del familiar, por lo que se decidió promediar estos resultados.

3.2.10. Reconocimiento del objeto novedoso.

3.2.10.1. Testeo de memoria de corto término.

El test de reconocimiento de objeto novedoso fue llevado a cabo en una arena experimental de paredes negras (21x30x23 cm) (Figura 9). Cada ensayo consistió de tres sesiones. Durante la primera sesión (habituaación) los ratones fueron colocados en el campo experimental durante 5 min. En la segunda sesión, dos objetos idénticos (objetos familiares) fueron colocados en la arena y se permitió a los ratones explorar durante otros 5 min (entrenamiento). Los objetos utilizados se muestran en la (Figura 10 A y B). Durante la última sesión, sesión de testeo, los objetos fueron reemplazados por un objeto idéntico al familiar y otro nuevo (objeto novedoso). La duración de la última sesión fue también de 5 minutos. Entre sesiones los ratones fueron removidos de la arena y colocados en una jaula idéntica a la de alojamiento por cinco minutos. Los ensayos fueron grabados y el movimiento de los animales registrado utilizando el ANY-Maze™ Video Tracking Software (Stoelting). El tiempo de exploración de cada objeto (cabeza del ratón apuntando hacia el objeto a corta distancia) durante las fases de entrenamiento y de testeo fue determinado por un observador utilizando las grabaciones del software. Se calculó el porcentaje de tiempo durante el cual el ratón explora el objeto novedoso con respecto al tiempo de exploración de ambos objetos durante el testeo. Se alternó el tipo de objeto novedoso y la posición (derecha o izquierda) en la arena entre individuos de forma balanceada para ambos tratamientos. No se encontraron diferencias dentro de cada tratamiento en el tiempo de exploración del objeto novedoso de acuerdo al tipo o la ubicación del mismo, por lo que se promediaron estos resultados. Las luces se mantuvieron a 10 lux durante todo el ensayo.

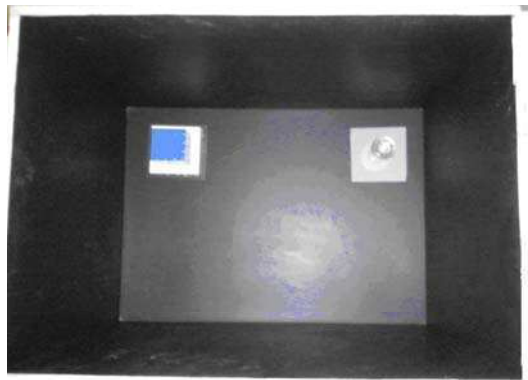


Figura 9: Test de reconocimiento del objeto novedoso. Área de testeo con dos objetos diferentes a fines ilustrativos.

3.2.10.2. Testeo de memoria de largo término.

Esta variante se realizó en la misma arena experimental con los objetos que se muestran en la (Figura 10 B y C). Se realizaron dos sesiones de 5 min de habituación en días consecutivos. A partir del día siguiente se realizaron 3 sesiones de entrenamiento con dos objetos iguales (familiares) de 7 min cada una. Los animales fueron testeados 24 h después con el objeto familiar y el novedoso durante 5 min. Al final de la sesión de cada día los individuos fueron devueltos a sus jaulas. Todo el test fue llevado a cabo con la intensidad de la luz fijada a 10 lux. Se midieron los mismos parámetros que para la versión de testeo de memoria de corto término. De igual forma se balanceó la posición y tipo de objeto novedoso entre individuos del mismo tratamiento.

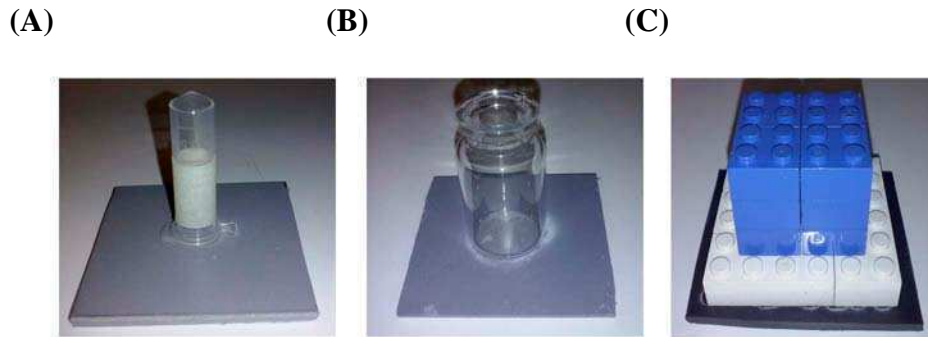


Figura 10: Test de reconocimiento del objeto novedoso. Objetos utilizados. (A) y (B) fueron empleados para testear la memoria de corto término, mientras que (B) y (C), para la de largo término.

3.2.11. Condicionamiento del miedo.

El equipo consiste en una cámara de condicionamiento de acrílico transparente (24,5 x 24,5 x 42 cm) ubicada dentro de una caja de madera con tapa frontal transparente. El piso de la cámara es una grilla de barras paralelas de acero inoxidable, cada barra de 0,3 mm de diámetro y espaciadas 0,8 mm entre ellas. La grilla se conecta a un dispositivo que controla las presentaciones (duración e intensidad) de los tonos y los shocks eléctricos para el condicionamiento. El experimento se realiza en tres sesiones. El entrenamiento (día 1) consistió en una sesión que se inició con un período de aclimatación a la cámara de dos minutos. Cumplido este tiempo, se le presentó a cada ratón un tono de 80 dB durante 10 s, superpuesto durante el último segundo con un shock eléctrico (0.6 mA, 1 s) proporcionado a través de la grilla. Los ratones se mantuvieron durante un minuto más en la cámara y luego fueron retornados a sus jaulas. El condicionamiento de miedo asociado al contexto fue evaluado 24 h después del entrenamiento (día 2) colocando nuevamente al ratón en la cámara de condicionamiento en ausencia de tono y shock eléctrico. Los animales fueron

testeados también con el tono en el día posterior (día 3) para evaluar el condicionamiento con clave. Este testeo se realizó presentando el mismo tono utilizado en la sesión de entrenamiento, pero en un contexto modificado. Para esto se colocó en la misma cámara de condicionamiento un piso blanco para ocultar la grilla, paredes semicirculares de color verde y aroma a esencia de vainilla. Además se cambió la intensidad de la luz de la sala y, entre individuos, se limpió la cámara con ácido acético 4%. A cada ratón se le permitió explorar la cámara modificada durante 2 minutos antes del tono. A continuación se les presentó el mismo tono usado en el día 1, pero durante 4 minutos. Las tres sesiones fueron grabadas. Se determinó el *freezing* (cuando el ratón no realiza más movimiento que el de respiración) durante el entrenamiento, el testeo contextual y el testeo de clave antes y después del tono.

La memoria fue expresada como el porcentaje de tiempo que el ratón presentó una respuesta de *freezing*, el cual es un rasgo ampliamente utilizado para evaluar la respuesta de miedo del animal (247). El mismo se midió realizando una observación del animal cada 5 segundos y registrando si se encontraba en un estado de *freezing* o no. Para el entrenamiento y el testeo contextual se obtuvieron 60 mediciones a lo largo de 300 segundos, y para el testeo con clave 24 mediciones en los 120 segundos pre-tono y 24 mediciones durante los 240 segundos de duración del tono.

4. Análisis de la expresión génica.

4.1. Extracción de corteza e hipocampo.

Ratones de ambos sexos fueron sacrificados por dislocación cervical a las 3, 6 y 12 semanas de vida. Cada ratón fue decapitado y se extrajo el cerebro del cual se separó la corteza y el hipocampo. Cada una de las muestras fue rápidamente depositada en nitrógeno líquido y conservada a -80 °C hasta su uso para la extracción de RNA y proteínas totales.

4.2. Análisis de ARNm por RT-PCR.

4.2.1. Extracción de ARN.

Se realizó la extracción de ARN mensajero de corteza e hipocampo utilizando el reactivo Trizol[®] de Invitrogen de acuerdo al protocolo que se describe a continuación.

La muestra de tejido fue colocada en un tubo eppendorf de 1,5 ml al que se le agregaron 500 µl de Trizol. Se utilizó un potter plástico apto para eppendorf para disgregar

el tejido con la solución de Trizol y se centrifugó en una centrífuga HERMLE (Z233 MK-2) a 12.000 g a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se le agregaron 50 µl de cloroformo y se agitó cada tubo a mano durante 15 s aproximadamente. Se centrifugaron las muestras durante 15 min a 12.000 g y 4 °C. Se separaron 150 µl de la fase acuosa (ARN) y se le agregó 150 µl de isopropanol. Se dejó precipitar por lo menos 1 hora a -20 °C y luego se centrifugó nuevamente durante 10 min a 12.000 g y 4 °C. Se lavó el pellet con la adición de 1 ml de etanol 75% frío, se vortexeó hasta que el mismo se despegó del fondo del tubo y se centrifugó por 10 min a 7.500 g y 4 °C. Este proceso se realizó dos veces en total. A continuación, se secó el pellet durante 5-10 min a temperatura ambiente cuidando que el mismo no se seque demasiado y luego se resuspendió el ARN en 20 µl de H₂O Milli-Q. Para facilitar la resuspensión del ARN se llevaron las muestras a -80 °C por al menos 5 min y luego se calentaron a 60 °C por 12 min. La concentración y pureza del ARN se determinó en un µl de la suspensión midiendo en un Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermoscientific) la absorbancia a 280 nm y la relación de absorbancias a 280/260 nm y 280/230 nm, respectivamente. El resto de la muestra fue almacenada a -80 °C hasta su utilización.

4.2.2. Síntesis de cDNA.

Se utilizó 1 µg de ARN por reacción. En caso de que la concentración de la muestra fuera mayor a 0,5 µg/µl se le agregó el volumen de H₂O Milli-Q necesario para llevarla a esa concentración. Se tomaron 2 µl de esta solución para la reacción de síntesis. En caso de haber obtenido concentraciones menores a 0,5 µg/µl se tomó el volumen necesario para llegar a una cantidad de 1 µg de ARN. Luego se agregó a cada tubo 1 µl de dNTPs 10 mM y 1 µl de oligodT de 17 nucleótidos de largo y se llevó a 13 µl con H₂O Milli-Q. Las muestras fueron calentadas a 65 °C por 3 min en un termociclador Biorad (MyCyclerTM). Luego se enfriaron durante 1 min en hielo y se les agregaron 4 µl de buffer de reacción 5X (Promega), 1 µl de enzima transcriptasa reversa de M-MLV (Promega) y 2 µl de H₂O Milli-Q. La reacción de retro-transcripción se llevó a cabo durante 50 min a 37 °C y fue finalizada calentando a 70 °C durante 15 min en el termociclador. Una vez obtenido el cDNA se diluyó 5 veces con el agregado de H₂O Milli-Q.

4.2.3. PCR semi-cuantitativa.

Las reacciones de PCR se hicieron por separado para cada par de primers.

De forma general cada una llevó 2,5 µl de buffer de reacción 10X (Invitrogen), 2,5 µl de mezcla de dNTPS 2 mM cada uno, 1 µl de mezcla de *primers* directo (Fw) y reverso (Rv) 5 mM cada uno, 5% DMSO y 1,25 unidades de enzima Taq polimerasa (Invitrogen). La cantidad de MgCl₂ utilizada para cada par de *primers* se detalla en la Tabla 1. La mezcla de reacción fue llevada a un volumen final de 25 µl con H₂O. La reacción de PCR se llevó a cabo en el equipo mencionado anteriormente y tuvo los siguientes ciclos:

Desnaturalización inicial 95 °C 3 min	}	Y repeticiones
Desnaturalización 94 °C durante 1 min		
Hibridización X °C durante 30 s		
Síntesis 70 °C 1 min		

Los *primers* utilizados para cada gen, la temperatura de hibridización y el número de ciclos se detallan a continuación en la tabla 3.

Gen	Primer Fw	Primer Rv	MgCl ₂ (µg/µl)	Temperatura Hibridización (X)	Número de repeticiones (Y)
GAPDH	5'- GGCATTGCTCTCA ATGACAA-3'	5'- GGCCTCTCTTGCT CAGTGTC-3'	1.5	57	19
CalN _α	5'- CAGTCGGACGGG ACGAGCAG-3'	5'- GCAACGGCTTCA CCACCCTG-3'	1.5	56	26
CalN _γ	5'- CATGAATGCAGGC ATCTTAC-3'	5'- TAAGAGGGCAGCA AGAGGAA-3'	1.5	53	32
Arc	5'- AGTCTTGGGCAGC ATAGCTC-3'	5'- TGGTATGAATCAC TGCTGGGG-3'	1.5	57	27
Egr1	5'- TTCAATCCTCAAG GGGAGCC-3'	5'- GAGAAGCGGCCA GTATAGGT-3'	1.5	57	26

TrkC	5'- CCAGGAAGACCTT CCCAAAG-3'	5'- AGAACCCCCAGTA CTTCCGT-3'	1.5	57	29
TrkB	5'- CATGAAAGGCCCA GCTTCGGTCA-3'	5'- GTCGGGACCGCC CTCCGAAG-3'	1.25	57	27
Reelin	5'- CTCGACAAGCATC CAGTCTTC-3'	5'- AGGTTGGTTGTAG GCAGGTG-3'	1.5	56	32
BDNF	5'- GCCTTCATGCAAC CGAAGTA-3'	5'- TGAGTCTCCAGGA CAGCAAA-3'	1.5	55	29
NGF	5'- TCTGTGTACGGTT CTGCCTG-3'	5'- CAGCTTTCTATACT GGCCGC-3'	1.5	55	29
c-Fos	5'- TTCGACCATGATG TTCTCGGG-3'	5'- TTGGCACTAGAGA CGGACAG-3'	1.5	57	30

Tabla 3: Secuencia de los iniciadores (*primers*) hacia adelante (*Fw-forward*) y reverso (*Rv-reverse*) utilizados para cada gen, junto con el porcentaje de MgCl₂ y DMSO de la reacción, la temperatura de hibridización y el número de ciclos totales.

Cada muestra fue analizada por duplicado o triplicado para cada gen.

4.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.

Las muestras fueron tratadas con 5 µl de buffer de siembra (30% glicerol, 0,1 µg/ml de Orange G) y sembradas en un gel de agarosa 2% en Buffer TBE (tris base 1,08%, ácido bórico 0,55%, EDTA 0,01%) con 1 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 120 V en buffer TBE. El producto de PCR se visualizó y fotografió utilizando el equipo G-Box de Syngene. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J (NIH).

4.3. Análisis de proteínas por western blot.

4.3.1. Extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas totales cada muestra fue homogenizada con *potter* plástico en un eppendorf de 1,5 ml con el agregado de 500 µl de una solución SDS 2% en buffer tris 0,125M pH 6,8. Una vez disgregada la muestra fue incubada a 70 °C durante 10 min y luego centrifugada por 20 min a 8.500 g. Se separó el sobrenadante y se descartó el pellet. La concentración de proteínas se determinó en una alícuota utilizando el reactivo “BCA protein assay” de Pierce[®], siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron resuspendidas en Buffer de siembra 5X (tris 0,125M, glicerol 22%, SDS 5%, β-mercaptoetanol 0,7 M y azul de bromofenol) en una relación 4:1. Previo a la realización de la corrida electroforética, cada muestra fue sonicada por 15 seg a 50% de amplitud y calentada a 100 °C durante 10 min.

4.3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

En todos los casos las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (248). Se utilizó el sistema vertical Mini Format 1-D Electrophoresis Systems de Bio-Rad. El gel separador (inferior) se preparó al 12% (1,5 ml de H₂O destilada estéril, 1,6 ml de solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 0,8 ml de tris 1,5 M pH 8,8, 40 µl de SDS 10%, 40 µl de persulfato de amonio 10% y 2,5 µl de TEMED). En algunos casos el porcentaje de poliacrilamida utilizado fue del 10% o 15%. En ambos casos el gel concentrador (superior) se preparó al 5% (2,04 ml de H₂O destilada estéril, 0,51 ml de solución de acrilamida/ bisacrilamida al 30%, 0,37 ml de tris 1 M pH 6,8, 30 µl de SDS 10%, 30 µl de persulfato de amonio 10% y 3 µl de TEMED). En un pocillo se sembró 1 µl del marcador de peso molecular (PageRuler[®] prestained protein ladder, Fermentas). Luego se realizó la electroforesis, a 120 V, en buffer tris-glicina-SDS 1X (tris base 25 mM, glicina 250 mM pH 8,3, SDS 0,1%.) hasta que el azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel separador.

4.3.3. Transferencia a membrana.

Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido, en este caso una membrana de nitrocelulosa (249). Una de las caras del gel fue apoyada sobre un fragmento de membrana de nitrocelulosa (RPN303D Hybond -

ECL 0,45 µm GE Healthcare) del mismo tamaño y ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3MM previamente humedecidos en buffer de transferencia 1X (Tris-glicina 1X, SDS 0,01%, metanol 20%) y estos a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en la cuba electroforética, con buffer de transferencia 1X y con la membrana de nitrocelulosa del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 200 mA, durante 60 min.

4.3.4. Detección de proteínas.

Luego de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue sumergida en una solución de bloqueo (leche descremada en polvo 5% en PBS 1X) y se dejó en agitación ON. a 4 °C para reducir los sitios potenciales de unión de proteínas irrelevantes. La membrana se lavó 2 veces con Tween 20 0,05% en PBS 1X, durante 10 min. Luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rabanito (HRP) diluido en solución de bloqueo durante 60 min a temperatura ambiente. La membrana se lavó 2 veces nuevamente con Tween 20 0,05% en PBS 1X, durante 10 min. Para visualizar las proteínas de interés se utilizó el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. La señal fue detectada en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyser Fujifilm LAS-1000. Como control de carga del gel se utilizó la técnica de tinción de un gel de proteínas corrido en paralelo con el colorante Coomassie Blue.

Anticuerpos primarios utilizados:

Anticuerpo H3 acetilada (policlonal en conejo). 06-599 Upstate.

Anticuerpo H4 acetilada (policlonal en conejo). 06-598 Upstate

Anticuerpo anti- Actina (monoclonal ratón). Sc-47778 Santa Cruz.

Anticuerpo anti-histona H3, (policlonal de conejo). C-16 sc-8654-R, Santa Cruz Biotechnology.

Anticuerpo anti-ANAPC2, (policlonal conejo). H-295 Santa Cruz

Anticuerpo anti-Bax, (policlonal conejo) N-20 Santa Cruz.

Anticuerpo anti-CDK5, (policlonal de conejo). C-8 Santa Cruz

Anticuerpo anti-Arc, (policlonal de conejo). H-300 Santa Cruz

Anticuerpo anti-Egr1, (policlonal de conejo). 588 Santa Cruz

Anticuerpo anti-H3 3 metilada Lisina 9, (policlonal de conejo). 07-030 Upstate

Anticuerpo anti-H3 2 metilada Lisina 4, (policlonal de conejo). 07-441 Upstate
Anticuerpo anti-H4 acetilada Lisina 12, (policlonal de conejo). sc-34266 Santa cruz
Anticuerpo anti-HP1 α (monoclonal ratón). 2HP-G9-AS Euromedex.
Anticuerpo anti-HP1 γ (monoclonal ratón). MAB3450 Chemicon International.
Anticuerpo anti-sinaptofisina (monoclonal ratón). SVP-38 SIGMA

Anticuerpos secundarios utilizados:

Goat anti-mouse conjugado con HRP, A-4416 SIGMA.
Goat anti-rabbit conjugado con HRP, A-6154 SIGMA.

5. Análisis histológicos.

5.1. Obtención de cortes de cerebro.

Ratones de ambos sexos de 3, 6 y 12 semanas de edad fueron anestesiados con avertina 2% (0,4 mg de avertina/g de peso) en H₂O_d y perfundidos primero con solución salina (0,9% NaCl) y luego con paraformaldehído al 4% en PBS. Se utilizó aproximadamente 1 ml de cada solución por gramo de peso del animal. Para la obtención de cortes para inmunofluorescencia o tinción de Nissl, los cerebros fueron extraídos y post-fijados durante la noche en el mismo fijador, previo a ser cortados a 60 μ m de espesor utilizando un micrótopo de vibración Integraslice 7550PSDS vibrating microslicer (Campden Instruments). Las secciones se almacenaron en una solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilenglicol, 50% buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4) a -20 °C hasta su utilización. Para la tinción de Golgi-Cox los hemiserebros fueron posfijados solo durante dos horas luego de la extracción.

5.2. Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia se realizó en cortes en suspensión utilizando entre 6 y 8 cortes de la zona a analizar, distribuidos de forma equidistante. Las secciones se bloquearon durante 1 h en PBS con 0,3% de Triton X-100 y 5% de suero de cabra y se incubaron durante 24 h a 4 °C en un rotador con anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (MAB377 Millipore) diluido en solución de bloqueo. Luego de dos lavados de 15 min a temperatura ambiente con PBS-Tween 0,04% se procedió a incubar las secciones con el anticuerpo secundario fluorescente (anti-ratón Alexa 555, 1:1000; Invitrogen), durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de otros dos lavados con PBS-Tween 0,04%,

las secciones se tiñeron durante 15 min con DAPI (Sigma) para evidenciar los núcleos. A continuación fueron montadas en un portaobjetos con PBS:glicerol 1:1 y almacenadas en oscuridad hasta su uso. Las láminas fueron analizadas en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000 con un objetivo 20X y un zoom digital de 1,8X. La cuantificación del número de células positivas para NeuN en un área de 0,01486 mm² para el CA1, CA2 y CA3 y de 0.00836 mm² para el giro dentado, fue realizada manualmente con la ayuda del programa Fiji. Para esto se seleccionaron dos áreas del CA1, una del CA2, tres del CA3 y 3 del giro dentado. De cada área se tomaron dos fotos confocales separadas 8 µm en el eje Z. Se contó el número de células positivas en ambas fotos y se obtuvo un valor promedio que a su vez se promedió con los valores de las otras áreas de la misma zona del hipocampo. Este proceso se repitió en todos los cortes provenientes del mismo animal, obteniéndose un único valor de cada zona por animal. N fue el número total de animales estudiados.

5.3. Tinción de Nissl.

Los cortes de cerebro fueron montados en portaobjetos con carga positiva y se los dejó secando una noche a temperatura ambiente. A continuación fueron colocados en vasos de Coplin con una solución etanol-cloroformo 1:1 y dejados hasta el día siguiente en la misma solución. Luego se realizaron los pasajes por las siguientes soluciones:

- 2 pasajes de 2 min en etanol ~100%
- 2 pasajes de 2 min en etanol 95%
- 15 min en violeta de cresilo 0,1% precalentado a 37°C
- 1 lavado con H₂O para retirar el exceso de colorante
- 2 pasajes de 2 min en etanol 95%
- 2 pasajes de 2 min en etanol ~100%
- 1 pasaje de 4 min en xileno

Los preparados fueron montados con medio DPX (Sigma).

Se fotografiaron los cortes con una cámara incorporada a un microscopio Nikon Eclipse E200 con un aumento de 10x. Se midió el área del hipocampo y de las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado en 4-6 cortes distribuidos equidistantemente de cada

animal., utilizando el programa ImageJ. Se utilizó una regla estándar de 1 mm fotografiada en las mismas condiciones para obtener las medidas en μm .

5.3. Tinción de Golgi-Cox.

Luego de las dos horas postfijación se separó una mitad del cerebro y se transfirió a PBS 1X. A continuación las mismas fueron transferidas a una solución 2,8% (m/v) de bicromato de potasio y 8% formaldehído en H_2O de simple ósmosis durante 48 h en oscuridad. Luego se cortaron los hemisferios conservando una única sección de 5 mm de espesor de la zona del hipocampo. La tinción se continuó colocando la misma en una solución 2,8% (m/v) de bicromato de potasio y 2% formaldehído en H_2O simple ósmosis durante 24 hs en oscuridad y durante 5 días en una solución 3,5% (m/v) de bicromato de potasio en H_2O simple ósmosis, también en oscuridad. Luego de este período, las secciones fueron transferidas a una solución de nitrato de plata 0,75% en H_2O simple ósmosis durante 48 hs en oscuridad, y luego mantenidas a 4 °C en sacarosa 30% entre 1 y 30 días. Los tejidos fueron cortados usando un vibrátomo (Vibratome 1000P), en secciones de 200 μm de espesor. Las mismas fueron montadas en portaobjetos, secadas con papel de filtro Whatman para evitar su despegado durante la deshidratación con alcohol y xileno, y montadas usando Bálsamo de Canadá sintético. Fotografías de la zona de la corteza y del hipocampo fueron tomadas utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 con un aumento de 1000X. Se fotografiaron hasta 30 segmentos de dendritas de no menos de 20 μm de longitud por cerebro, en las cuales se contó el número de espinas. Los resultados fueron expresados en número de espinas por μm , siendo N el número de espinas analizadas.

6. Análisis estadístico.

Los test estadísticos utilizados en esta tesis están descriptos en las leyendas de las figuras y en el texto referente a cada una. Se testeó normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks y homocedasticidad utilizando la prueba de Levene. Cuando los datos cumplieron con ambos principios se realizó el test *t*-Student. En caso de no cumplir con los criterios de homocedasticidad se realizó la corrección de Welch. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney en caso de que la distribución no fuera normal. Para parámetros analizados durante una serie de días o sesiones en el mismo individuo se utilizó un diseño de ANOVA de dos factores con medidas repetidas, con un test *a posteriori* de Tukey para comparar entre tratamientos a diferentes días. No se informaron las

significancias al comparar días diferentes para el mismo tratamiento para la geotaxis negativa, reflejo de enderezamiento, fuerza de agarre y peso, ya que no era el objeto de estudio, y para simplificar el texto y los gráficos. Solo se informaron las significancias entre sesiones del condicionamiento de miedo. En caso de resultar significativa la interacción entre los dos factores, no se informó la significancia de los efectos principales y se procedió a informar el resultado de los contrastes directamente. El porcentaje de preñez de las hembras fue calculado a lo largo de diferentes ensayos, siendo N el número de ensayos. Para la evaluación del desarrollo físico, peso, geotaxis negativa, reflejo de enderezamiento y fuerza de agarre de la F1, se realizó un promedio de las observaciones de todos los individuos de la camada para cada variable, siendo N el número de camadas analizadas. Para el reflejo de sobresalto y para el desarrollo físico y neurológico de la F2, se individualizaron dos o tres individuos de cada sexo en cada camada marcándolos con cristal violeta y se siguió el desarrollo de los mismos a lo largo de la lactancia. En estos casos, N fue el número de individuos marcados. En los test realizados luego del destete, N fue el número de individuos estudiados. No se utilizaron más de 3 individuos de la misma camada para los mismos. La tabla de contingencia para el desarrollo físico de la F2, fue realizada categorizando las variables dependientes como edad “Normal” a la moda de dicha variable, y como “Temprano” y “Tardío” a edades anteriores y posteriores a la “Normal” de aparición de la característica analizada, respectivamente. Se utilizó un análisis multivariado a fin de buscar diferencias entre grupos combinando todas las variables dependientes para el test de campo abierto de la F2.

Para el cálculo de densidad de espinas dendríticas se analizaron todos los cortes correspondientes a la zona del hipocampo de dos animales por grupo experimental.

Los datos fueron testeados con el método de Grub con el fin de detectar la presencia de *outliers*. Los datos que fueron considerados *outliers* ($\alpha=0,05$) fueron removidos del set antes de realizar el análisis estadístico.

Bibliografía

1. Rosene, D. L., Lister, J. P., Schwagerl, A. L., Tonkiss, J., McCormick, C. M., and Galler, J. R. (2004) *Nutritional neuroscience* **7**, 281-289
2. Nicholls John, G. M., Robert; Wallace, Bruce, and A, F. P. (2012), 479
3. Tau, G. Z., and Peterson, B. S. (2010) *Neuropsychopharmacology* **35**, 147-168
4. Morgane, P. J., Mokler, D. J., and Galler, J. R. (2002) *Neuroscience and biobehavioral reviews* **26**, 471-483
5. Schuurmans, C., and Kurrasch, D. M. (2013) *Clin Genet* **83**, 108-117
6. Habib, K. E., Gold, P. W., and Chrousos, G. P. (2001) *Endocrinol Metab Clin North Am* **30**, 695-728; vii-viii
7. Selye, H. (1949) *Practitioner* **163**, 393-405
8. Monk, C., Georgieff, M. K., and Osterholm, E. A. (2013) *J Child Psychol Psychiatry* **54**, 115-130
9. Bale, T. L., Baram, T. Z., Brown, A. S., Goldstein, J. M., Insel, T. R., McCarthy, M. M., Nemeroff, C. B., Reyes, T. M., Simerly, R. B., Susser, E. S., and Nestler, E. J. (2010) *Biol Psychiatry* **68**, 314-319
10. Copp, A., Cogram, P., Fleming, A., Gerrelli, D., Henderson, D., Hynes, A., Kolatsi-Joannou, M., Murdoch, J., and Ybot-Gonzalez, P. (2000) *Methods Mol Biol* **136**, 135-160
11. Copp, A. J. (2005) *J Anat* **207**, 623-635
12. Kippin, T. E., Cain, S. W., Masum, Z., and Ralph, M. R. (2004) *J Neurosci* **24**, 2832-2836
13. Kawamura, T., Chen, J., Takahashi, T., Ichitani, Y., and Nakahara, D. (2006) *Neuroreport* **17**, 1515-1518
14. Belnoue, L., Grosjean, N., Ladeveze, E., Abrous, D. N., and Koehl, M. (2013) *PloS one* **8**, e72972
15. Lin, Y. L., and Wang, S. (2013) *Behavioural brain research* **259**, 24-34
16. Malkova, N. V., Yu, C. Z., Hsiao, E. Y., Moore, M. J., and Patterson, P. H. (2012) *Brain Behav Immun* **26**, 607-616
17. Yoshimi, N., Futamura, T., and Hashimoto, K. (2013) *Expert Rev Neurother* **13**, 747-750
18. Huttenlocher, P. R. (1979) *Brain research* **163**, 195-205
19. Bourgeois, J. P. (1997) *Acta Paediatr Suppl* **422**, 27-33

20. Nishi, M., Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., and Matsunaga, W. (2012) *Gen Comp Endocrinol* **181**, 306-309
21. Lehmann, J., and Feldon, J. (2000) *Rev Neurosci* **11**, 383-408
22. Francis, D. D., Champagne, F. A., Liu, D., and Meaney, M. J. (1999) *Ann N Y Acad Sci* **896**, 66-84
23. Huot, R. L., Gonzalez, M. E., Ladd, C. O., Thrivikraman, K. V., and Plotsky, P. M. (2004) *Psychoneuroendocrinology* **29**, 279-289
24. Levine, S. (2005) *Psychoneuroendocrinology* **30**, 939-946
25. Plotsky, P. M., Thrivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Caldji, C., Sharma, S., and Meaney, M. J. (2005) *Neuropsychopharmacology* **30**, 2192-2204
26. Roman, E., and Nylander, I. (2005) *Stress (Amsterdam, Netherlands)* **8**, 157-174
27. Kikusui, T., and Mori, Y. (2009) *J Neuroendocrinol* **21**, 427-431
28. Kikusui, T., Kiyokawa, Y., and Mori, Y. (2007) *Brain research* **1133**, 115-122
29. Xu, M., Sulkowski, Z. L., Parekh, P., Khan, A., Chen, T., Midha, S., Iwasaki, T., Shimokawa, N., Koibuchi, N., Zavacki, A. M., and Sajdel-Sulkowska, E. M. (2013) *Cerebellum (London, England)* **12**, 572-586
30. Bennett, H. A., Einarson, A., Taddio, A., Koren, G., and Einarson, T. R. (2004) *Obstet Gynecol* **103**, 698-709
31. Marcus, S. M. (2009) *Can J Clin Pharmacol* **16**, e15-22
32. Rai, D., Lee, B. K., Dalman, C., Golding, J., Lewis, G., and Magnusson, C. (2013) *BMJ* **346**, f2059
33. Korhonen, M., Luoma, I., Salmelin, R., and Tamminen, T. (2013) *Nord J Psychiatry*
34. Chang, H. Y., Keyes, K. M., Lee, K. S., Choi, I. A., Kim, S. J., Kim, K. W., Shin, Y. H., Ahn, K. M., Hong, S. J., and Shin, Y. J. (2014) *Early Hum Dev*
35. Patel, E., and Reynolds, M. (2013) *Toxicol Lett* **222**, 265-272
36. Eberhart-Phillips, J. E., Frederick, P. D., Baron, R. C., and Mascola, L. (1993) *Obstet Gynecol* **82**, 797-801
37. Champagne, F. A. (2008) *Front Neuroendocrinol* **29**, 386-397
38. Crawley, J. N. (2001) *Curr Protoc*, Wiley
39. Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., and Meaney, M. J. (2003) *Physiology & behavior* **79**, 359-371

40. Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M., and Meaney, M. J. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5335-5340
41. Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., and Meaney, M. J. (1997) *Science (New York, N.Y)* **277**, 1659-1662
42. Sapolsky, R. M., Meaney, M. J., and McEwen, B. S. (1985) *Brain research* **350**, 169-173
43. Liu, D., Diorio, J., Day, J. C., Francis, D. D., and Meaney, M. J. (2000) *Nature neuroscience* **3**, 799-806
44. Gaynes, B. N., Gavin, N., Meltzer-Brody, S., Lohr, K. N., Swinson, T., Gartlehner, G., Brody, S., and Miller, W. C. (2005) *Evid Rep Technol Assess (Summ)*, 1-8
45. Tarantino, L. M., Sullivan, P. F., and Meltzer-Brody, S. (2011) *Front Psychiatry* **2**, 44
46. Meaney, M. J. (2001) *Annual review of neuroscience* **24**, 1161-1192
47. Mueller, B. R., and Bale, T. L. (2007) *Physiology & behavior* **91**, 55-65
48. Mueller, B. R., and Bale, T. L. (2008) *J Neurosci* **28**, 9055-9065
49. Kundakovic, M., and Champagne, F. A. (2011) *Brain Behav Immun* **25**, 1084-1093
50. Kundakovic, M., Gudsruk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R. L., Perera, F. P., and Champagne, F. A. (2013) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 9956-9961
51. Qureshi, I. A., and Mehler, M. F. (2010) *Prog Brain Res* **186**, 77-95
52. Nugent, B. M., and McCarthy, M. M. (2011) *Neuroendocrinology* **93**, 150-158
53. Lancet, T. (2013) *Lancet* **382**, 1858
54. Hochberg, Z., Feil, R., Constancia, M., Fraga, M., Junien, C., Carel, J. C., Boileau, P., Le Bouc, Y., Deal, C. L., Lillycrop, K., Scharfmann, R., Sheppard, A., Skinner, M., Szyf, M., Waterland, R. A., Waxman, D. J., Whitelaw, E., Ong, K., and Albertsson-Wikland, K. (2011) *Endocr Rev* **32**, 159-224
55. Susser, E., Hoek, H. W., and Brown, A. (1998) *Am J Epidemiol* **147**, 213-216
56. Monk, C., Spicer, J., and Champagne, F. A. (2012) *Dev Psychopathol* **24**, 1361-1376
57. Brown, A. S., van Os, J., Driessens, C., Hoek, H. W., and Susser, E. S. (2000) *The American journal of psychiatry* **157**, 190-195

58. Kar, B. R., Rao, S. L., and Chandramouli, B. A. (2008) *Behav Brain Funct* **4**, 31
59. **ONU-FAO.** (2013)
60. Victora, C. G., Adair, L., Fall, C., Hallal, P. C., Martorell, R., Richter, L., and Sachdev, H. S. (2008) *Lancet* **371**, 340-357
61. Garcia Rada, A. (2013) *BMJ* **347**, f5261
62. Boulle, F., van den Hove, D. L., Jakob, S. B., Rutten, B. P., Hamon, M., van Os, J., Lesch, K. P., Lanfumey, L., Steinbusch, H. W., and Kenis, G. (2012) *Mol Psychiatry* **17**, 584-596
63. Mokler, D. J., Torres, O. I., Galler, J. R., and Morgane, P. J. (2007) *Brain research* **1148**, 226-233
64. Alamy, M., and Bengelloun, W. A. (2012) *Neuroscience and biobehavioral reviews* **36**, 1463-1480
65. Duran, P., Cintra, L., Galler, J. R., and Tonkiss, J. (2005) *Nutritional neuroscience* **8**, 167-172
66. Galler, J. R., Waber, D., Harrison, R., and Ramsey, F. (2005) *The American journal of psychiatry* **162**, 1760-1761; author reply 1761
67. Shen, Q., Li, Z. Q., Sun, Y., Wang, T., Wan, C. L., Li, X. W., Zhao, X. Z., Feng, G. Y., Li, S., St Clair, D., He, L., and Yu, L. (2008) *Schizophrenia research* **99**, 48-55
68. St Clair, D., Xu, M., Wang, P., Yu, Y., Fang, Y., Zhang, F., Zheng, X., Gu, N., Feng, G., Sham, P., and He, L. (2005) *Jama* **294**, 557-562
69. Laus, M. F., Vales, L. D., Costa, T. M., and Almeida, S. S. (2011) *Int J Environ Res Public Health* **8**, 590-612
70. Crnic, L. S., and Chase, H. P. (1978) *The Journal of nutrition* **108**, 1755-1760
71. Huber, R. C., Kolb, A. F., Lillico, S., Carlisle, A., Sandoe, P., Sorensen, D. B., Remuge, L., Whitelaw, B. C., and Olsson, A. I. (2013) *Nutritional neuroscience* **16**, 125-134
72. Levay, E. A., Paolini, A. G., Govic, A., Hazi, A., Penman, J., and Kent, S. (2008) *Behavioural brain research* **191**, 164-172
73. Santillan, M. E., Vincenti, L. M., Martini, A. C., de Cuneo, M. F., Ruiz, R. D., Mangeaud, A., and Stutz, G. (2010) *Nutrition* **26**, 423-431
74. Wainwright, P. E., Jalali, E., Mutsaers, L. M., Bell, R., and Cvitkovic, S. (1999) *Physiology & behavior* **66**, 833-839

75. De Oliveira, L. M., and Almeida Sde, S. (1985) *Physiology & behavior* **34**, 141-145
76. Reyes-Castro, L. A., Rodriguez, J. S., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Chavira, R., Bautista, C. J., McDonald, T. J., Nathanielsz, P. W., and Zambrano, E. *Behavioural brain research* **227**, 324-329
77. Smart, J. L. (1993) *Proc Nutr Soc* **52**, 189-199
78. Barnes, R. H., Cunnold, S. R., Zimmermann, R. R., Simmons, H., MacLeod, R. B., and Krook, L. (1966) *The Journal of nutrition* **89**, 399-410
79. Reyes-Castro, L. A., Rodriguez, J. S., Charco, R., Bautista, C. J., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., and Zambrano, E. (2012) *Int J Dev Neurosci* **30**, 39-45
80. Workman, A. D., Charvet, C. J., Clancy, B., Darlington, R. B., and Finlay, B. L. (2013) *J Neurosci* **33**, 7368-7383
81. Rice, D., and Barone, S., Jr. (2000) *Environ Health Perspect* **108 Suppl 3**, 511-533
82. Clancy, B., Finlay, B. L., Darlington, R. B., and Anand, K. J. (2007) *Neurotoxicology* **28**, 931-937
83. Heim, C., and Nemeroff, C. B. (2009) *CNS Spectr* **14**, 13-24
84. Korosi, A., Naninck, E. F., Oomen, C. A., Schouten, M., Krugers, H., Fitzsimons, C., and Lucassen, P. J. *Behavioural brain research* **227**, 400-409
85. Pascual-Leone, A., Freitas, C., Oberman, L., Horvath, J. C., Halko, M., Eldaief, M., Bashir, S., Vernet, M., Shafi, M., Westover, B., Vahabzadeh-Hagh, A. M., and Rotenberg, A. (2011) *Brain Topogr* **24**, 302-315
86. Gemma, C., and Bachstetter, A. D. (2013) *Front Cell Neurosci* **7**, 229
87. Gage, F. H. (2000) *Science (New York, N.Y)* **287**, 1433-1438
88. Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H., and Inokuchi, K. (2009) *Cell* **139**, 814-827
89. Zhao, C., Deng, W., and Gage, F. H. (2008) *Cell* **132**, 645-660
90. Lledo, P. M., Alonso, M., and Grubb, M. S. (2006) *Nature reviews* **7**, 179-193
91. Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., and Tsai, L. H. (2007) *Nature* **447**, 178-182
92. Hu, Y. S., Xu, P., Pigino, G., Brady, S. T., Larson, J., and Lazarov, O. (2010) *Faseb J* **24**, 1667-1681
93. Benarroch, E. E. (2013) *Neurology* **81**, 1443-1452

94. Bonaguidi, M. A., Song, J., Ming, G. L., and Song, H. (2012) *Curr Opin Neurobiol* **22**, 754-761
95. Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., and Moser, E. I. (2007) *Science (New York, N.Y)* **315**, 961-966
96. Buss, R. R., Sun, W., and Oppenheim, R. W. (2006) *Annual review of neuroscience* **29**, 1-35
97. Hara, M. R., and Snyder, S. H. (2007) *Annual review of pharmacology and toxicology* **47**, 117-141
98. Bredesen, D. E., Rao, R. V., and Mehlen, P. (2006) *Nature* **443**, 796-802
99. Wagner, B., Natarajan, A., Grunaug, S., Kroismayr, R., Wagner, E. F., and Sibilial, M. (2006) *The EMBO journal* **25**, 752-762
100. Leavitt, B. R., van Raamsdonk, J. M., Shehadeh, J., Fernandes, H., Murphy, Z., Graham, R. K., Wellington, C. L., Raymond, L. A., and Hayden, M. R. (2006) *Journal of neurochemistry* **96**, 1121-1129
101. Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S., and Quirion, R. (2007) *Progress in neurobiology* **81**, 179-196
102. Bredy, T. W., Grant, R. J., Champagne, D. L., and Meaney, M. J. (2003) *Eur J Neurosci* **18**, 2903-2909
103. Weaver, I. C., Grant, R. J., and Meaney, M. J. (2002) *Journal of neurochemistry* **82**, 998-1002
104. Caporale, N., and Dan, Y. (2008) *Annual review of neuroscience* **31**, 25-46
105. Bourne, J. N., and Harris, K. M. (2008) *Annual review of neuroscience* **31**, 47-67
106. Meyer, D. A., Richer, E., Benkovic, S. A., Hayashi, K., Kansy, J. W., Hale, C. F., Moy, L. Y., Kim, Y., O'Callaghan, J. P., Tsai, L. H., Greengard, P., Nairn, A. C., Cowan, C. W., Miller, D. B., Antich, P., and Bibb, J. A. (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18561-18566
107. Hofer, S. B., Mrcic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T., and Hubener, M. (2009) *Nature* **457**, 313-317
108. Yang, G., Pan, F., and Gan, W. B. (2009) *Nature* **462**, 920-924
109. Reichardt, L. F. (2006) *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **361**, 1545-1564
110. Hennigan, A., O'Callaghan, R. M., and Kelly, A. M. (2007) *Biochemical Society transactions* **35**, 424-427

111. Allen, S. J., and Dawbarn, D. (2006) *Clin Sci (Lond)* **110**, 175-191
112. Cao, L., Liu, X., Lin, E. J., Wang, C., Choi, E. Y., Riban, V., Lin, B., and During, M. J. (2010) *Cell* **142**, 52-64
113. Branchi, I. (2009) *Neuroscience and biobehavioral reviews* **33**, 551-559
114. Boersma, G. J., Lee, R. S., Cordner, Z. A., Ewald, E. R., Purcell, R. H., Moghadam, A. A., and Tamashiro, K. L. (2013) *Epigenetics* **9**
115. Neeley, E. W., Berger, R., Koenig, J. I., and Leonard, S. (2011) *Physiology & behavior* **104**, 334-339
116. Davis, S., Bozon, B., and Laroche, S. (2003) *Behavioural brain research* **142**, 17-30
117. Miyashita, T., Kubik, S., Lewandowski, G., and Guzowski, J. F. (2008) *Neurobiology of learning and memory* **89**, 269-284
118. Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S. F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bosl, M. R., Lipp, H. P., Grant, S. G., Bliss, T. V., Wolfner, D. P., and Kuhl, D. (2006) *Neuron* **52**, 437-444
119. Xie, L., Korkmaz, K. S., Braun, K., and Bock, J. (2013) *Journal of neurochemistry* **125**, 457-464
120. Kosten, T. A., Huang, W., and Nielsen, D. A. (2013) *Developmental psychobiology*
121. Probst, A. V., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009) *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 192-206
122. Blaze, J., and Roth, T. L. (2013) *Int J Dev Neurosci* **31**, 804-810
123. Borrelli, E., Nestler, E. J., Allis, C. D., and Sassone-Corsi, P. (2008) *Neuron* **60**, 961-974
124. Hirabayashi, Y., and Gotoh, Y. (2010) *Nature reviews* **11**, 377-388
125. Riccio, A. (2010) *Nature neuroscience* **13**, 1330-1337
126. McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., Turecki, G., and Meaney, M. J. (2009) *Nature neuroscience* **12**, 342-348
127. Yang, X., Schadt, E. E., Wang, S., Wang, H., Arnold, A. P., Ingram-Drake, L., Drake, T. A., and Lusis, A. J. (2006) *Genome Res* **16**, 995-1004
128. Tsai, H. W., Grant, P. A., and Rissman, E. F. (2009) *Epigenetics* **4**, 47-53

129. Burdge, G. C., Hanson, M. A., Slater-Jefferies, J. L., and Lillycrop, K. A. (2007) *The British journal of nutrition* **97**, 1036-1046
130. Burdge, G. C., and Lillycrop, K. A. (2012) *Annual review of nutrition* **30**, 315-339
131. Delage, B., and Dashwood, R. H. (2008) *Annual review of nutrition* **28**, 347-366
132. Chmurzynska, A. (2010) *Nutr Rev* **68**, 87-98
133. Marco, E. M., Valero, M., de la Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramirez, M. J., and Viveros, M. P. (2013) *Neuropharmacology* **68**, 223-231
134. Chien, W. T., Leung, S. F., Yeung, F. K., and Wong, W. K. (2013) *Neuropsychiatr Dis Treat* **9**, 1463-1481
135. Association, A. P. (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
136. Jablensky, A. (2000) *Aust N Z J Psychiatry* **34 Suppl**, S26-34; discussion S35-28
137. McGrath, J., Brown, A., and St Clair, D. (2011) *Schizophr Bull* **37**, 272-283
138. Wei, J., and Hemmings, G. P. (2005) *Med Hypotheses* **64**, 547-552
139. Madeeh Hashmi, A., Awais Aftab, M., Mazhar, N., Umair, M., and Butt, Z. (2013) *Pak J Med Sci* **29**, 877-884
140. Andrade, L., Caraveo-Anduaga, J. J., Berglund, P., Bijl, R. V., De Graaf, R., Vollebergh, W., Dragomirecka, E., Kohn, R., Keller, M., Kessler, R. C., Kawakami, N., Kilic, C., Offord, D., Ustun, T. B., and Wittchen, H. U. (2003) *Int J Methods Psychiatr Res* **12**, 3-21
141. Kehne, J. H., and Cain, C. K. (2010) *Pharmacol Ther* **128**, 460-487
142. Donner, N. C., and Lowry, C. A. (2013) *Pflugers Arch* **465**, 601-626
143. Kendler, K. S., Thornton, L. M., and Gardner, C. O. (2000) *The American journal of psychiatry* **157**, 1243-1251
144. Sato, S., Nakagawasai, O., Tan-No, K., Niijima, F., Suzuki, T., and Tadano, T. (2011) *Biol Pharm Bull* **34**, 1413-1417
145. Soares, R. O., Oliveira, L. M., Marchini, J. S., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L. L., and Almeida, S. S. (2013) *Nutritional neuroscience* **16**, 104-112
146. Rocinholi, L. F., and Landeira-Fernandez, J. (2011) *Physiology & behavior* **102**, 13-16
147. Isaacs, E. B., Fischl, B. R., Quinn, B. T., Chong, W. K., Gadian, D. G., and Lucas, A. (2010) *Pediatric research* **67**, 357-362
148. de Souza, A. S., Fernandes, F. S., and do Carmo, M. (2011) *Nutr Rev* **69**, 132-144
149. Squire, L. R. (1992) *Psychol Rev* **99**, 195-231

150. Lucassen, P. J., Naninck, E. F., van Goudoever, J. B., Fitzsimons, C., Joels, M., and Korosi, A. (2013) *Trends in neurosciences* **36**, 621-631
151. Tonkiss, J., Shultz, P., and Galler, J. R. (1994) *Physiology & behavior* **55**, 217-224
152. Coupe, B., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Lefevre, F., Mairesse, J., Dickes-Coopman, A., Silhol, M., Tapia-Arancibia, L., Lesage, J., and Vieau, D. (2009) *J Neuroendocrinol* **21**, 40-48
153. Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Galvan, A., Aguilar, A., Kemper, T., and Morgane, P. J. (1991) *J Comp Neurol* **310**, 356-364
154. Maccari, S., Piazza, P. V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H., and Le Moal, M. (1995) *J Neurosci* **15**, 110-116
155. Morley-Fletcher, S., Rea, M., Maccari, S., and Laviola, G. (2003) *Eur J Neurosci* **18**, 3367-3374
156. Darnaudery, M., and Maccari, S. (2008) *Brain Res Rev* **57**, 571-585
157. Voss, M. W., Vivar, C., Kramer, A. F., and van Praag, H. (2013) *Trends Cogn Sci* **17**, 525-544
158. Greenough, W. T., Volkmar, F. R., and Juraska, J. M. (1973) *Exp Neurol* **41**, 371-378
159. van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F. H. (2000) *Nature reviews* **1**, 191-198
160. Nithianantharajah, J., and Hannan, A. J. (2006) *Nature reviews* **7**, 697-709
161. van Praag, H. (2008) *Neuromolecular Med* **10**, 128-140
162. Anderson-Hanley, C., Tureck, K., and Schneiderman, R. L. (2011) *Psychol Res Behav Manag* **4**, 129-137
163. Kern, L., Koegel, R. L., Dyer, K., Blew, P. A., and Fenton, L. R. (1982) *J Autism Dev Disord* **12**, 399-419
164. Anderson-Hanley, C., Arciero, P. J., Brickman, A. M., Nimon, J. P., Okuma, N., Westen, S. C., Merz, M. E., Pence, B. D., Woods, J. A., Kramer, A. F., and Zimmerman, E. A. (2012) *Am J Prev Med* **42**, 109-119
165. Yerokhin, V., Anderson-Hanley, C., Hogan, M. J., Dunnam, M., Huber, D., Osborne, S., and Shulan, M. (2012) *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn* **19**, 380-401
166. Colcombe, S. J., Erickson, K. I., Scalf, P. E., Kim, J. S., Prakash, R., McAuley, E., Elavsky, S., Marquez, D. X., Hu, L., and Kramer, A. F. (2006) *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**, 1166-1170

167. Francis, D., Diorio, J., Liu, D., and Meaney, M. J. (1999) *Science (New York, N.Y)* **286**, 1155-1158
168. Champagne, F. A. (2013) *Behavioral neuroscience* **127**, 628-636
169. Holland, M. L., and Rakyan, V. K. (2013) *Biochemical Society transactions* **41**, 769-776
170. Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Graff, J., Linder, N., Michalon, A., Vizi, S., and Mansuy, I. M. (2010) *Biol Psychiatry* **68**, 408-415
171. Dias, B. G., and Ressler, K. J. (2014) *Nature neuroscience* **17**, 89-96
172. Lim, J. P., and Brunet, A. (2013) *Trends Genet* **29**, 176-186
173. Castellano, C., Cabib, S., and Puglisi-Allegra, S. (1996) *Behavioural brain research* **77**, 1-21
174. Parmigiani, S., Palanza, P., Rogers, J., and Ferrari, P. F. (1999) *Neuroscience and biobehavioral reviews* **23**, 957-969
175. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey, G. C., Jr. (1993) *The Journal of nutrition* **123**, 1939-1951
176. Ranade, S. C., Rose, A., Rao, M., Gallego, J., Gressens, P., and Mani, S. (2008) *Neuroscience* **152**, 859-866
177. Ingenbleek, Y., and Kimura, H. (2013) *Nutr Rev* **71**, 413-432
178. Glynn, D., Sizemore, R. J., and Morton, A. J. (2007) *Neurobiology of disease* **25**, 483-495
179. McIntire, D. D., Bloom, S. L., Casey, B. M., and Leveno, K. J. (1999) *N Engl J Med* **340**, 1234-1238
180. Kursmark, M., and Weitzman, M. (2009) *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **12**, 310-316
181. Champagne, F. A., and Meaney, M. J. (2007) *Behavioral neuroscience* **121**, 1353-1363
182. Carobrez, A. P., and Bertoglio, L. J. (2005) *Neuroscience and biobehavioral reviews* **29**, 1193-1205
183. Bourin, M., Petit-Demouliere, B., Dhonnchadha, B. N., and Hascoet, M. (2007) *Fundam Clin Pharmacol* **21**, 567-574
184. Nishimura, D. Y., Fath, M., Mullins, R. F., Searby, C., Andrews, M., Davis, R., Andorf, J. L., Mykytyn, K., Swiderski, R. E., Yang, B., Carmi, R., Stone, E. M.,

- and Sheffield, V. C. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 16588-16593
185. Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K. R., Rush, A. J., Walters, E. E., and Wang, P. S. (2003) *Jama* **289**, 3095-3105
186. Huber, R. C., Kolb, A. F., Lillico, S., Carlisle, A., Sandoe, P., Sorensen, D. B., Remuge, L., Whitelaw, B. C., and Olsson, A. I. *Nutritional neuroscience* **16**, 125-134
187. Antunes, M., and Biala, G. (2012) *Cognitive processing* **13**, 93-110
188. Conrad, C. D., Grote, K. A., Hobbs, R. J., and Ferayorni, A. (2003) *Neurobiology of learning and memory* **79**, 32-40
189. Moustafa, A. A., Gilbertson, M. W., Orr, S. P., Herzallah, M. M., Servatius, R. J., and Myers, C. E. (2013) *Brain Cogn* **81**, 29-43
190. Reul, J. M. (2014) *Front Psychiatry* **5**, 5
191. Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., and Svoboda, K. (2002) *Annu Rev Physiol* **64**, 313-353
192. Chen, J. L., Andermann, M. L., Keck, T., Xu, N. L., and Ziv, Y. (2013) *J Neurosci* **33**, 17631-17640
193. Ohshima, T., Suzuki, H., Morimura, T., Ogawa, M., and Mikoshiba, K. (2007) *Brain research* **1140**, 84-95
194. Barnett, D. G., and Bibb, J. A. (2011) *Brain Res Bull* **85**, 9-13
195. Cherala, G., Shapiro, B. H., and D'Mello A, P. (2006) *The Journal of nutrition* **136**, 2827-2833
196. Alexander, M. H., Lazan, K. S., and Rasmussen, K. M. (1988) *The Journal of nutrition* **118**, 883-887
197. Miller, B. H., Olson, S. L., Turek, F. W., Levine, J. E., Horton, T. H., and Takahashi, J. S. (2004) *Curr Biol* **14**, 1367-1373
198. Hales, C. N., and Ozanne, S. E. (2003) *The Journal of physiology* **547**, 5-10
199. McMillen, I. C., and Robinson, J. S. (2005) *Physiological reviews* **85**, 571-633
200. Levin, B. E. (2006) *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **361**, 1107-1121
201. Pine, A. P., Jessop, N. S., and Oldham, J. D. (1994) *The British journal of nutrition* **72**, 815-830

202. Ellis, L. A., Mastro, A. M., and Picciano, M. F. (1997) *The Journal of nutrition* **127**, 985S-988S
203. Liu, B., Zupan, B., Laird, E., Klein, S., Gleason, G., Bozinoski, M., Gal Toth, J., and Toth, M. (2013) *Nature neuroscience* **17**, 97-105
204. Brawley, L., Itoh, S., Torrens, C., Barker, A., Bertram, C., Poston, L., and Hanson, M. (2003) *Pediatric research* **54**, 83-90
205. Bellinger, L., Lilley, C., and Langley-Evans, S. C. (2004) *The British journal of nutrition* **92**, 513-520
206. Campbell, C. E., Piper, M., Plachez, C., Yeh, Y. T., Baizer, J. S., Osinski, J. M., Litwack, E. D., Richards, L. J., and Gronostajski, R. M. (2008) *BMC developmental biology* **8**, 52
207. Sulkowski, Z. L., Chen, T., Midha, S., Zavacki, A. M., and Sajdel-Sulkowska, E. M. (2012) *Cerebellum (London, England)* **11**, 575-586
208. Secher, T., Novitskaia, V., Berezin, V., Bock, E., Glenthøj, B., and Klementiev, B. (2006) *Neuroscience* **141**, 1289-1299
209. Crestani, F., Low, K., Keist, R., Mandelli, M., Mohler, H., and Rudolph, U. (2001) *Molecular pharmacology* **59**, 442-445
210. Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M. J. (2004) *Nature neuroscience* **7**, 847-854
211. Cameron, N., Del Corpo, A., Diorio, J., McAllister, K., Sharma, S., and Meaney, M. J. (2008) *PloS one* **3**, e2210
212. Bosch, O. J., Musch, W., Bredewold, R., Slattery, D. A., and Neumann, I. D. (2007) *Psychoneuroendocrinology* **32**, 267-278
213. Connor, K. L., Vickers, M. H., Beltrand, J., Meaney, M. J., and Sloboda, D. M. (2012) *The Journal of physiology* **590**, 2167-2180
214. Feldman, R., Singer, M., and Zagoory, O. (2010) *Dev Sci* **13**, 271-278
215. Monk, C., Spicer, J., and Champagne, F. A. *Dev Psychopathol* **24**, 1361-1376
216. Maria Moreira Camargo, L., and de Sousa Almeida, S. (2005) *Physiology & behavior* **85**, 246-251
217. Almeida, S. S., and De Araujo, M. (2001) *Physiology & behavior* **74**, 45-51
218. van den Berg, C. L., Hol, T., Van Ree, J. M., Spruijt, B. M., Everts, H., and Koolhaas, J. M. (1999) *Developmental psychobiology* **34**, 129-138

219. Pereira-da-Silva, M. S., Cabral-Filho, J. E., and de-Oliveira, L. M. (2009) *Behavioural brain research* **205**, 286-289
220. Torres, N., Bautista, C. J., Tovar, A. R., Ordaz, G., Rodriguez-Cruz, M., Ortiz, V., Granados, O., Nathanielsz, P. W., Larrea, F., and Zambrano, E. (2010) *American journal of physiology* **298**, E270-277
221. Lesage, J., Sebaai, N., Leonhardt, M., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Deloof, S., and Vieau, D. (2006) *Stress (Amsterdam, Netherlands)* **9**, 183-198
222. Schaffer, L., Muller-Vizentini, D., Burkhardt, T., Rauh, M., Ehlert, U., and Beinder, E. (2009) *Pediatric research* **65**, 231-235
223. Reyes-Castro, L. A., Rodriguez, J. S., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Chavira, R., Bautista, C. J., McDonald, T. J., Nathanielsz, P. W., and Zambrano, E. (2012) *Behavioural brain research* **227**, 324-329
224. da Silva Hernandez, A., Francolin-Silva, A. L., Valadares, C. T., Fukuda, M. T., and Almeida, S. S. (2005) *Behavioural brain research* **162**, 240-245
225. Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., and Ramirez, M. J. (2008) *Neuroscience* **154**, 1218-1226
226. Glover, V., and Hill, J. (2012) *Physiology & behavior* **106**, 736-740
227. Wozniak, D. F., Diggs-Andrews, K. A., Conyers, S., Yuede, C. M., Dearborn, J. T., Brown, J. A., Tokuda, K., Izumi, Y., Zorumski, C. F., and Gutmann, D. H. (2013) *PloS one* **8**, e66024
228. Adams, W., Kusljic, S., and van den Buuse, M. (2008) *Neuropharmacology* **55**, 1048-1055
229. Goulart, B. K., de Lima, M. N., de Farias, C. B., Reolon, G. K., Almeida, V. R., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schroder, N., and Roesler, R. (2010) *Neuroscience* **167**, 969-973
230. Silvers, J. M., Harrod, S. B., Mactutus, C. F., and Booze, R. M. (2007) *Journal of neuroscience methods* **166**, 99-103
231. Ennaceur, A. (2010) *Behavioural brain research* **215**, 244-254
232. Andero, R., Choi, D. C., and Ressler, K. J. (2014) *Prog Mol Biol Transl Sci* **122**, 169-192
233. Roth, T. L., and Sweatt, J. D. (2011) *Horm Behav* **59**, 315-320
234. Lonergan, M. E., Gafford, G. M., Jarome, T. J., and Helmstetter, F. J. (2010) *Neural Plast* **2010**, 139891

235. Soule, J., Penke, Z., Kanhema, T., Alme, M. N., Laroche, S., and Bramham, C. R. (2008) *Neural Plast* **2008**, 269097
236. Orsini, C. A., Yan, C., and Maren, S. (2013) *Frontiers in behavioral neuroscience* **7**, 199
237. Asok, A., Schreiber, W. B., Jablonski, S. A., Rosen, J. B., and Stanton, M. E. (2013) *Neurobiology of learning and memory* **106**, 145-153
238. Penke, Z., Chagneau, C., and Laroche, S. (2011) *Frontiers in behavioral neuroscience* **5**, 48
239. Hall, J., Thomas, K. L., and Everitt, B. J. (2000) *Nature neuroscience* **3**, 533-535
240. Hawasli, A. H., Benavides, D. R., Nguyen, C., Kansy, J. W., Hayashi, K., Chambon, P., Greengard, P., Powell, C. M., Cooper, D. C., and Bibb, J. A. (2007) *Nature neuroscience* **10**, 880-886
241. Roseboom, T. J., and Watson, E. D. (2012) *Placenta* **33 Suppl 2**, e40-44
242. Seong, K. H., Maekawa, T., and Ishii, S. (2012) *Genes Cells* **17**, 249-263
243. Saavedra-Rodriguez, L., and Feig, L. A. (2013) *Biol Psychiatry* **73**, 44-53
244. White, W. J. (1999) Genetic Evaluation of Outbred Rats from the Breeder's Perspective. in *Microbial Status and Genetic Evaluation of Mice and Rats: Proceedings of the 1999 US/Japan Conference* (Research., N. R. C. U. I. C. o. t. I. f. L. A. ed.
245. Cox, K. H., and Rissman, E. F. (2011) *Genes, brain, and behavior* **10**, 465-472
246. Sarnyai, Z., Sibille, E. L., Pavlides, C., Fenster, R. J., McEwen, B. S., and Toth, M. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14731-14736
247. de la Fuente, V., Freudenthal, R., and Romano, A. (2011) *J Neurosci* **31**, 5562-5573
248. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
249. Burnette, W. N. (1981) *Anal Biochem* **112**, 195-203