Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Participación del óxido nítrico en las alteraciones comportamentales y neuroendócrinas inducidas por estrés prenatal

Maur, Damián Gustavo

2015-08-21

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:
Maur, Damián Gustavo. (2015-08-21). Participación del óxido nítrico en las alteraciones comportamentales y neuroendócrinas inducidas por estrés prenatal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Maur, Damián Gustavo. "Participación del óxido nítrico en las alteraciones comportamentales y neuroendócrinas inducidas por estrés prenatal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-08-21.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Participación del óxido nítrico en las alteraciones comportamentales y neuroendócrinas inducidas por estrés prenatal

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLOGICAS**

Damián Gustavo Maur

Director de tesis: Dra. María Aurelia Zorrilla Zubilete

Consejero de Estudios: Dr. Alejandro Delorenzi

Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (UBA-CONICET) y Primera Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2015

Resumen

Participación del óxido nítrico en las alteraciones comportamentales y neuroendócrinas inducidas por estrés prenatal

Durante el desarrollo prenatal los organismos son vulnerables a factores que pueden afectar su homeostasis. Ha sido demostrado que el estrés durante la preñez tiene efectos en la descendencia que pueden perdurar hasta la adultez, afectando numerosos procesos fisiológicos. Sin embargo, los mecanismos subyacentes aún no han sido completamente dilucidados.

El objetivo de esta tesis fue estudiar la participación del óxido nítrico (NO) en las alteraciones comportamentales y neuroendócrinas inducidas por estrés prenatal (EP).

Se observó un incremento en el comportamiento de tipo ansiogénico y un peor desempeño en una tarea de aprendizaje asociativo en machos EP que revirtió parcialmente con un dador de NO.

Se detectó una disminución de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el hipocampo de machos adultos, mientras que en las hembras no se encontraron cambios. En el hipotálamo se observó un incremento en nNOS en hembras EP, mientras que en los machos no se observaron cambios. La exposición a estrés agudo en la adultez estimuló el incremento de corticosterona en plasma, que revirtió más lentamente en los machos EP que en los controles. En las hembras, la recuperación fue más rápida en las EP que en controles. El tratamiento con un dador de NO atenuó la respuesta al estrés en ambos grupos de hembras y en los machos EP, pero no en los controles, en los que facilitó la reversión. El tratamiento con un inhibidor de nNOS anuló en todos los grupos la reversión de la corticosterona a niveles basales luego del estrés agudo. Por lo tanto, la señalización mediada por NO estaría involucrada en las alteraciones conductuales y neuroendócrinas descriptas en este modelo.

Palabras Clave: Estrés Prenatal- Rata- Hipocampo- Hipotálamo- Óxido Nítrico- Corticosterona

Abstract

Participation of nitric oxide in the behavioural and neuroendocrine alterations induced by prenatal stress

During prenatal development organisms are vulnerable to factors that can affect homeostasis. It has been established that stress during pregnancy affects many physiological processes in the offspring that persist in adulthood. However, the underlying mechanisms have not been fully ellucidated.

The objective of this thesis was to study the role of nitric oxide (NO) in the behavioural and neuroendocrine alterations induced by prenatal stress (PS).

An increase in anxiety-like behaviour and an impairment in associative learning in male PS rats were found. Treatment with a NO donor partially reverted these changes.

There was a decrease in hippocampal nitric oxide synthase (NOS) in male adults, without changes in females. Levels of hypothalamic nNOS in PS female rats were increased, while in male rats there were no changes. Acute stress exposure in adulthood led to an increase in plasma corticosterone levels that reverted slower in PS males than controls. Treatment with a NO donor atenuated stress response in both female groups and in PS males, while in control males it facilitated reversion. Treatment with a nNOS inhibitor blocked the revertion of corticosterone levels to basals after stress in all experimental groups.

Therefore, NO mediated signaling would be involved in the behavioural and neuroendocrine alterations here described.

Keywords: Prenatal Stress- Rat- Hippocampus- Hypothalamos- Nitric Oxide- Corticosterone

Agradecimientos:

En el largo camino que culmina en este trabajo de tesis me acompañaron familia, amigos, colegas cuya participación merece ser destacada. Es así que en esta sección agradezco a:

mi directora de tesis, María, por haberme guiado durante el doctorado, y haberme dado las herramientas para poder desenvolverme de manera independiente en el laboratorio,

Ana Genaro, por haber participado en mi formación, por haberme tratado siempre como un becario suyo,

María Rosa, Ale, Roxi, Laurita, María Laura, por toda la ayuda prestada, las discusiones estadísticas, etc,

Hugo Ríos y demás integrantes de su laboratorio, por entrenarme en histología, por el buen humor constante y por permitirme trabajar en su laboratorio como un miembro más,

los investigadores, becarios y técnicos del CEFyBO por toda la ayuda y colaboración prestada,

la gente de la 1ra Cátedra de Farmacología, Pato, Eva, Alfredo y Ezequiel, Laura, Sole y Lu,

Ceci, Lenki, Bere, Edu, Emi, Flor, Yami, Romi, Joy, Ro, por los mates, las charlas de laboratorio, las birras y las cenas,

Ana, Graciela, Miriam y María por haber construido tan lindo espacio de trabajo, responsables de haber reunido tan buena gente,

mis viejos y mis hermanos, por acompañarme durante estos años, a mis dos sobrinitos, por su afecto y su curiosidad acerca de la profesión del tío,

mis amigos, por las birras, los asados, los viajes, el fútbol, la joda, todo aquello que le hace tan bien a uno para despejarse del trabajo,

la Universidad de Buenos Aires y especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por extender una enseñanza de alto nivel, gratuita. A sus docentes por el empeño en generar un ámbito de discusión dando siempre espacio al pensamiento crítico,

CONICET, por las becas otorgadas que me permitieron realizar este trabajo.

Índice

Introducción *1*

1.1. Homeostasis y alostasis **2**

1.2. Estrés agudo **3**

1.2.1. Mecanismo de acción de los glucocorticoides 5

1.2.2. Regulación de la respuesta al estrés 5

1.2.3. Regulación de la biodisponibilidad de glucocorticoides. 7

1.3. Estrés crónico **7**

1.4. Estrés prenatal **9**

1.5. El hipocampo **14**

1.5.1. Organización y desarrollo del hipocampo 17

1.5.1.1. Conectividad en la formación hipocampal 18

1.5.1.2. Conectividad de la formación hipocampal con otras áreas del cerebro 18

1.5.1.3. Desarrollo 19

1.5.1.3.1. Nacimiento de células piramidales 20

1.5.1.3.2. Nacimiento de las células granulares del giro dentado 20

1.5.1.3.3. Diferenciación y sinaptogénesis 20

1.5.1.3.4. Conexiones aferentes 21

1.5.2. Estudio de la memoria declarativa y algunos mecanismos celulares implicados. 21

1.6. La neurotransmisión nitrérgica. **23**

1.6.1. Estructura y cofactores 23

1.6.2. Vías de acción del óxido nítrico 25

1.6.3. Funciones del óxido nítrico 26

Hipótesis y Objetivos *29*

2.1. Hipótesis **30**

2.2. Objetivo general **30**

2.3. Objetivos específicos **30**

Materiales y Métodos *32*

3.1. Reactivos y equipos utilizados **33**

3.2. Descripción del modelo experimental **34**

3.2.1. Alojamiento de los animales 34

3.2.2. Apareo 34

3.2.3. Estrés Prenatal 35

3.2.4. Tratamientos farmacológicos 36

3.3. Estudios de comportamiento **37**

3.3.1 Exploración en un campo abierto 37

3.3.1.1 Descripción de los materiales 37

3.3.1.2. Descripción de la metodología empleada 38

3.3.1.3. Parámetros evaluados 38

3.3.2. Exploración en un Laberinto Elevado en Cruz 39

3.3.2.1. Descripción de los materiales 39

3.3.2.2. Descripción de la metodología empleada 40

3.3.2.3. Parámetros evaluados 40

3.3.3. Ensayo de Evitación Inhibitoria 41

3.3.3.1. Descripción de los materiales 41

3.3.3.2. Descripción de la metodología empleada 42

3.3.3.2.1 Habituación de los animales a la manipulación 42

3.3.3.2.2. Experimento 42
3.3.3.3. Parámetros evaluados 43

3.4. Determinaciones fisiológicas y neuroquímicas 43
3.4.1. Determinación de la ganancia de peso 44
3.4.2. Medición de los niveles de corticosterona en plasma 44
3.4.2.1. Obtención de la muestra 44
3.4.2.2. Extracción de la corticosterona 44
3.4.2.3. Radioinmunoensayo de corticosterona 45
3.4.2.3.1. Preparación de la muestra 45
3.4.2.3.2. Preparación de la curva estándar 45
3.4.2.3.3. Experimento 45
3.4.2.3.4. Análisis de los datos 46
3.4.3. Actividad enzimática de la NOS 47
3.4.3.1. Descripción de la metodología empleada 47
3.4.3.2. Análisis de los datos 48
3.4.4. Actividad enzimática de PKC 48
3.4.5. Determinación de los niveles de proteínas: Electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunodetección 49
3.4.6. Histología 50
3.4.6.1. Fijación y obtención de cortes histológicos 50
3.4.6.2. Tinción de NADPH diaforasa 51
3.4.6.2.1. Descripción de la metodología empleada 51
3.4.6.2.2. Adquisición de las fotomicrografías y análisis morfométrico 52
3.4.6.3. Inmunotinciones 53
3.4.6.3.1. Descripción de la metodología empleada 53
3.4.6.3.2. Adquisición de las fotomicrografías y análisis morfométrico 54

3.5. Análisis estadístico 54

Resultados 56

4.1. Estudios de comportamiento 57
4.1.1. Exploración en un campo abierto 57
4.1.2. Exploración en un Laberinto Elevado en Cruz 62
4.1.3. Ensayo de Evitación Inhibitoria 63

4.2. Determinación de la ganancia de peso 65

4.3. Efecto del estrés prenatal sobre el óxido nítrico hipocampal 67
4.3.1. Determinación de la actividad enzimática de la NOS. 67
4.3.2. Determinación de la actividad enzimática de PKC 69
4.3.3. Determinación de proteínas por Western Blot 71
4.3.3.1. Resultados de la inmunodetección de nNOS 71
4.3.3.2. Resultados de la inmunodetección de GR 72
4.3.4. Histología 73
4.3.4.1. Resultados de la Tinción de NADPH diaforasa 73
4.3.4.2. Inmunotinción de nNOS 76
4.3.4.3. Inmunotinción de GR 79

4.4. Estudio del rol del óxido nítrico en el aprendizaje 82

4.5. Estudio del efecto del estrés prenatal sobre el eje HPA 84
4.5.1. Determinación de los niveles de corticosterona 84
4.5.2. Determinación de proteínas por Western Blot 90
4.5.3. Histología 92
4.5.3.1. Resultados de la Tinción de NADPH diaforasa 92

Discusión 95

5.1. Estudios de comportamiento 98

5.2. Determinación de la ganancia de peso **101**
5.3. Efecto del estrés prenatal sobre el óxido nítrico hipocampal **102**
5.4. Estudio del rol del óxido nítrico en el aprendizaje **104**
5.5. Estudio del efecto del estrés prenatal sobre el eje HPA **106**
5.6. Conclusiones generales **111**
Bibliografía ***114***

Abreviaturas

7NI = 7-Nitroindazol

11βHSD = 11 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa

ACTH = hormona adrenocorticotrofa

ADN = ácido desoxirribonucleico

AMPA = receptor glutamatérgico ácido α-Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ANOVA = análisis de la varianza

ARNm = ácido ribonucleico mensajero

ATP = adenosina trifosfato

AVP = arginina vasopresina

BDNF = factor neurotrófico derivado de cerebro

BH4 = tetrahidrobiopterina

BNST = núcleo del lecho de la *stria terminalis*

C = control

CA = *cornu ammonis*

CaM = calmodulina

Col. = colaboradores

CRH = hormona liberadora de corticotrofina

DAB = 3,3´- diaminobencidina

EDTA = ácido etilendiaminotetraacético

EE = error estándar

EGTA = ácido etilenglicoltetraacético

EP = estrés prenatal

ERG = elemento de respuesta a glucocorticoides

FAD = flavina adenina dinucleótido

FMN = flavina mononucleótido

g = aceleración de la gravedad

G = día gestacional

GC = glucocorticoide

GD = giro dentado

GMPc = guanosina monofosfato cíclica

GR = receptor de glucocorticoides

HPA = hipotálamico-pituitario-adrenal

IL = interleuquina

kDA = kiloDalton

LC = *locus ceruleus*

L-NAME = L-nitro-arginina-metil-éster

LOG = logaritmo

LTP = potenciación de largo término

Mol = molsidomine

MR = receptor de mineralocorticoides

NADPH = nicotinamida dinucleótido fosfato, forma reducida

NMDA = receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato

NO = óxido nítrico

NOS = óxido nítrico sintasa

NS = no significativo

PKC = proteína kinasa C

PKG = proteína kinasa G

PN = edad postnatal

POMC = pro-opiomelanocortina

PVN = núcleo paraventricular

RIA = radioinmunoensayo

SDS = dodecil sulfato de sodio

sGC = guanilato ciclasa soluble

SON = núcleo supraóptico

StAR = proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

TNF = factor de necrosis tumoral

Introducción

1.1. Homeostasis y alostasis

La supervivencia de los organismos depende del mantenimiento de un equilibrio interno u homeostasis frente a un ambiente externo cambiante. La presión evolutiva durante tiempos en escala geológica seleccionó en los organismos vivos mecanismos tendientes a mantener ese equilibrio u homeostasis lo más estable posible para asegurar la supervivencia (Darwin, 1859). Esta presión selectiva condujo a la aparición de sistemas que le permitieran a los organismos presentar una resistencia a cambios ambientales (Karatsoreos & McEwen, 2013). En este marco Hans Selye definió en 1950 el concepto "enfermedades de adaptación": ciertas enfermedades se deben a un trastorno en mecanismos que son fundamentalmente útiles para enfrentarse a patógenos (Selye, 1950). De esta manera, Selye tomó el término *Estrés* de la Ingeniería de Materiales, que en este campo refiere a la resistencia de un material cuando se ejerce una fuerza sobre el mismo. Trasladando el concepto a un marco biológico, Karatsoreos y McEwen definen resiliencia como la habilidad de un organismo de enfrentar un cambio en el ambiente "doblándose, pero sin partirse". Sin embargo, el uso del término estrés ha despertado críticas debido a sus múltiples significados, que llevan a que su uso sea contraproducente en la interpretación de resultados experimentales (Korte y col., 2005). De esta manera, Sterling y Eyer (Sterling & Eyer, 1988) definieron alostasis como el proceso adaptativo de mantener la estabilidad a través del cambio. En términos biológicos, alostasis se refiere a los sistemas que promueven, por ejemplo, la adaptación a estímulos aversivos, entre otros, el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), el sistema nervioso autónomo, los sistemas metabólicos (eje tiroideo, insulina, glucagón) y el sistema inmune. Las respuestas fisiológicas de estos sistemas conducen a la protección y adaptación del individuo a estos desafíos. El proceso de alostasis es esencial para mantener la homeostasis. Sin embargo, este proceso tiene un costo sobre el organismo, que fue definido como carga alostática (McEwen, 1998). La carga alostática es el *desgaste por uso* que sufre el cuerpo y el cerebro resultante de la hiperactividad crónica o inactividad de los sistemas fisiológicos que están normalmente involucrados en la adaptación a desafíos ambientales. En ese trabajo, McEwen definió 3 tipos de respuestas fisiológicas que conforman la carga alostática:

Tipo 1, estrés frecuente: En este caso es la frecuencia e intensidad del estrés la que determina cuanta carga alostática se acumula.

Tipo 2, apagado fallido: refiere a la actividad crónica del sistema y a fallas en su apagado.

Tipo 3, respuesta inadecuada: El sistema no responde al desafío.

En resumen, las respuestas del cerebro y el cuerpo deben estar bien reguladas en el dominio temporal: deben activarse rápidamente y sólo ante las situaciones apropiadas, mantenerse durante la duración de la perturbación y apagarse eficiente y efectivamente.

1.2. Estrés agudo

La exposición aguda a una amenaza, un estímulo aversivo, conduce a una rápida activación del sistema nervioso autónomo. Rápidamente se activan el complejo amigdalino y el *locus coeruleus* (LC), dos estructuras que están interconectadas. La amígdala es a la vez modulada por la corteza prefrontal, involucrada en la evaluación cognitiva de la información externa recibida y por el hipocampo, relacionado con el almacenamiento de memorias de experiencias similares. La intervención de estas estructuras está relacionada con la amplia variedad de respuestas frente al estrés (Moisan & Moal, 2012; Herman, 2012). La estimulación por parte de las vías noradrenérgicas (Arabia y col., 2002) sobre las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo estimula la secreción de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y de vasopresina (AVP) hacia la circulación portal (Plotsky, 1987; Hill & Tasker, 2013), induciendo a su vez la expresión de pro-opiomelanocortina (POMC) en la pituitaria anterior. POMC es procesado a la hormona adrenocorticotrofa (ACTH), melanocortina y péptidos opioides. ACTH es liberada a circulación, estimulando la zona fasciculata de la corteza adrenal para la síntesis y secreción de glucocorticoides <GC> (corticosterona en roedores, cortisol en humanos). Específicamente, ACTH se une a su receptor MC2R, acoplado a proteína G, estimulando una cascada de señalización intracelular que lleva a la fosforilación y activación de factores de transcripción que inducen la expresión de genes, principalmente la síntesis de StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda),

involucrada en el transporte del colesterol a la membrana interna de la mitocondria, uno de los pasos limitantes de la síntesis de glucocorticoides, y la síntesis del citocromo P450 11A, que cataliza la síntesis de pregnenolona a partir de colesterol (Asser y col., 2014; Liu y col., 2013). En una fase temprana, la secreción de catecolaminas, neuropéptidos y glucocorticoides contribuye a una adecuada respuesta frente al estímulo desencadenante (el estresor) estimulando un estado de alerta, atención y vigilancia (de Kloet y col., 2005).

Se han descripto dos receptores para glucocorticoides, el receptor de glucocorticoides propiamente dicho (GR) y el receptor de mineralocorticoides (MR). Este último presenta una afinidad diez veces mayor por los glucocorticoides que GR. En condiciones basales los niveles bajos de corticosterona actúan a través de MR. Sin embargo, ante una situación de amenaza o estrés, los elevados niveles de glucocorticoides se unen también al receptor GR. De esta manera, los esteroides ejercen acciones facilitadoras, preparativas, estimulatorias y supresoras (Korte y col., 2005). A continuación se describen brevemente estas funciones:

-Acciones facilitadoras son aquellas que ejercen los glucocorticoides presentes antes de la aparición del estresor. Sus consecuencias se manifiestan durante la respuesta inicial al estrés y no dependen de que esa respuesta induzca un incremento en los GC.

-Las acciones preparativas se definen como aquellas que no afectan la respuesta inmediata al estresor que las desencadena sino que modulan la respuesta del organismo frente a un estresor posterior.

-Las acciones estimulatorias son aquellas atribuidas al incremento de GC inducido por la exposición a estrés, que resultan en un aumento en los efectos de la fase temprana de respuesta, que involucra a CRH, noradrenalina y adrenalina entre otras hormonas.

-Finalmente, las acciones supresoras se atribuyen al incremento en GC inducido por el estrés, y su función es evitar que los mecanismos de respuesta al estrés se hiperactiven, lo cual puede generar un daño en el organismo (Sapolsky y col., 2000).

Regresando a la respuesta al estrés, el incremento de los GC en circulación conlleva una movilización de energía desde los sitios de reserva hacía el músculo en ejercicio, un incremento en el transporte vía sistema circulatorio a través del aumento en el tono cardiovascular, una inhibición de la fisiología y el comportamiento reproductivo, efectos estimulatorios e inhibitorios a nivel del sistema inmunológico, una disminución en la ingesta y el apetito, y finalmente un incremento en la perfusión y el uso de glucosa en el cerebro (Wurtman & Axelrod, 1966; Dhabhar & McEwen, 1997; Sapolsky y col., 2000; Hadoke y col., 2009; Zunszain y col., 2011).

1.2.1. Mecanismo de acción de los glucocorticoides

La mayoría de los efectos descriptos se producen a través de la estimulación o inhibición de la expresión génica a través de la unión de los GC a su receptor (MR o GR) en citoplasma. Los receptores forman complejos con distintas proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock protein*). Una vez unida la hormona, estos complejos se disocian formando el complejo activado que a su vez es fosforilado. La disociación del complejo expone señales de localización nuclear, que gatillan su translocación al núcleo celular (Joels y col., 2012). Estos receptores actúan como factores de transcripción activados por ligando. En el núcleo, el receptor activado se une a elementos de respuesta a glucocorticoides (ERG) en el ADN. En estos sitios, facilitan o impiden la unión de factores de transcripción en sus secuencias consenso (Sapolsky y col., 2000; de Kloet y col., 2005). Alternativamente pueden unirse directamente a factores de transcripción, alterando su eficacia. Cabe destacar que se han descripto efectos no genómicos de los GC, aunque aún no está claro a través de qué caminos actúan. Evidencia de la vía no genómica es el hecho de que los GC pueden modular la actividad neuronal en un dominio temporal incompatible con los tiempos que demanda la vía genómica (Joels y col., 2012).

1.2.2. Regulación de la respuesta al estrés

El incremento en los niveles de GC en sangre inducidos por estrés gatilla mecanismos de retroalimentación negativa que modulan la actividad del eje HPA disminuyendo en consecuencia la secreción de los mismos. Estos procesos ocurren en distintas ventanas temporales. Por un lado, rápidamente se activan mecanismos no genómicos,

independientes de la síntesis de proteínas, que estarían mediados por receptores de membrana. Este tipo de mecanismos actúa en la rápida inhibición de la liberación de CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo. La activación de estos receptores inhibiría terminales glutamatérgicas que actúan sobre las neuronas secretoras de CRH y vasopresina, suprimiendo la excitación de estas neuronas y por lo tanto la secreción de estos péptidos (Hill & Tasker, 2013). Los GC inhiben además la secreción vesicular de ACTH en la glándula pituitaria. A su vez, los GC actuando a través del receptor GR modulan la expresión de genes a distintos niveles del eje HPA, resultando en una disminución en la síntesis y liberación de corticosterona. A nivel del núcleo paraventricular del hipotálamo, actuando a través de GR inhiben la expresión génica de CRH y AVP. A nivel de la pituitaria, la unión de glucocorticoides a GR gatilla la unión del receptor a un ERG que inhibe la expresión génica de ACTH (Pecoraro y col., 2006). Finalmente, los glucocorticoides se unen a GR en la corteza adrenal disminuyendo la expresión de StAR y por lo tanto su síntesis (Gummow y col., 2014).

La actividad del eje no sólo se autoregula a través de los GC liberados a circulación, sino que además activa una compleja red de estructuras en el sistema nervioso central que regula su actividad. Entre ellas se destaca el rol del hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal medial. El hipocampo ejerce una acción inhibitoria sobre el PVN. Esta estructura límbica expresa altos niveles de GR y MR. Desde el hipocampo ventral y el *subiculum* ventral se proyectan eferentes hacia el núcleo del lecho de la *stria terminalis* (*bed nucleus of the stria terminalis*, BNST), el área preóptica medial y el hipotálamo dorsomedial, entre otros núcleos hipotalámicos. Estas áreas presentan neuronas GABAérgicas que proyectan sobre el PVN, inhibiendo su actividad secretora. Se ha demostrado que lesiones hipocampales, inhibición farmacológica de GR o lesiones en el *subiculum* ventral resultan en un incremento en la liberación de corticosterona y en un déficit en su regulación por retroalimentación negativa (Sapolsky y col., 1991; Herman, 2012). La corteza prefrontal medial es una estructura involucrada en el procesamiento de información vinculada a la exposición a estrés. Lesiones en esta estructura incrementan la liberación de ACTH y corticosterona en respuesta a una exposición a estrés. Finalmente, distintos núcleos amigdalinos modulan positivamente la actividad del eje HPA. Lesiones en el núcleo amigdalino medial bloquean el incremento de ACTH y corticosterona inducido por exposición a

estrés. Esta estructura tiene proyecciones GABAérgicas al BNST. Por lo tanto, la estimulación de estas vías removería el tono inhibitorio que ejerce el BNST sobre el PVN (Jankord & Herman, 2009). En resumen, una compleja serie de mecanismos a nivel de distintas estructuras actúa modulando la respuesta del eje HPA frente a la exposición a estrés, evitando que el sistema se hiperactive.

1.2.3. Regulación de la biodisponibilidad de glucocorticoides.

Además de la regulación de los niveles de esteroides adrenales mediada por el eje HPA y estructuras límbicas, distintas proteínas regulan la disponibilidad y funcionalidad de los GC. Una de ellas es CBG, una proteína plasmática transportadora. Junto con la albúmina, unen hasta el 95% de la corticosterona o cortisol presente en plasma. Sólo la fracción libre está disponible para atravesar membranas (Joels y col., 2012). Los niveles intracelulares de GC son regulados también por la p-glicoproteína de resistencia a multi-drogas, una proteína de membrana cuya función es bombear hacia afuera de la célula distintas moléculas potencialmente tóxicas (Pariante, 2008). Una enzima fundamental en la regulación de la funcionalidad del cortisol y la corticosterona es la enzima 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11βHSD). Se han descripto dos isoformas de esta enzima. La 11βHSD-1 cataliza la oxidación del grupo 11β-hidroxilo a 11-ceto de los GC activos, inactivándolos, y la reducción de las formas inactivas, activándolas. Esta isoforma está presente en la mayoría de los tejidos. La 11βHSD-2 cataliza la oxidación tanto del cortisol como de la corticosterona, inactivándolas. Esta última está prácticamente ausente en sistema nervioso central (Sapolsky y col., 2000; Joels y col., 2012).

1.3. Estrés crónico

En las secciones previas se ha detallado un espectro amplio de las múltiples acciones de los GC a nivel de diversos sistemas y los mecanismos que previenen el daño que provocaría una elevación sostenida en el tiempo de GC en circulación. Sin embargo, y no obstante estos mecanismos, el efecto perjudicial del estrés crónico sobre el organismo ha sido ampliamente demostrado. La exposición recurrente a estrés afecta los mecanismos de retroalimentación negativa que modulan el eje HPA (Nollet y col.,

2012), observándose una respuesta prolongada en el tiempo. Esta se evidencia en los niveles de ACTH y corticosterona en plasma, que permanecen elevados por más tiempo luego de haber cesado el estímulo estresor (Pecoraro y col., 2006). Además se observa un incremento en los niveles del ARNm de CRH en el PVN y una disminución en la expresión de GR (Herman y col., 2008). Se han encontrado alteraciones en la regulación del eje ejercida por el sistema límbico. La exposición a estrés crónico induce una disminución en los niveles de GR en el hipocampo y se ha observado que distintos tratamientos farmacológicos que revierten los efectos deletéreos en el comportamiento desencadenados por la exposición a estrés crónico conllevan una recuperación en la expresión de GR a valores del control (Neigh & Nemeroff, 2006; Li y col., 2014). A su vez, modelos animales en los que se disminuyó la expresión de GR en hipocampo utilizando estrategias de manipulación genética muestran una desregulación del eje HPA (Ridder y col., 2005). Finalmente, en animales estresados crónicamente se observa un incremento en la marca positiva para c-FOS en distintos núcleos de la amígdala. Además, la administración de corticosterona sobre el núcleo central de la amígdala incrementa la expresión de CRH en la misma y los niveles de ARNm de CRH en el PVN (Dallman y col., 2003).

La alteración en los niveles circulantes de GC desencadena cambios en una multiplicidad de órganos y sistemas directamente relacionada con la diversidad de acciones fisiológicas que presentan. A nivel del sistema cardiovascular, el estrés crónico induce un incremento en el ritmo cardíaco en reposo y una disminución en su variabilidad, que está relacionada con un defecto en el control autonómico de la regulación cardiovascular (Grippo & Johnson, 2010). A su vez se ha observado una respuesta exagerada en el ritmo cardíaco frente a un ambiente novedoso, un incremento del tono simpático y un menor umbral para la aparición de arritmias ventriculares, que podrían señalizar un mayor riesgo de eventos cardíacos (Grippo y col., 2004).

Niveles elevados de GC estimulan la ingesta de azúcares y grasas. Se ha observado que esta conducta apetitiva actúa restaurando el CRH hipotalámico a niveles del control, y habría una correlación negativa entre el nivel de sacarosa consumida y de grasa mesentérica con los niveles de CRH en el PVN (Dallman y col., 2003; Sominsky &

Spencer, 2014). Este tipo de conducta podría desencadenar el desarrollo de obesidad, diabetes de tipo II, enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares.

El estrés crónico afecta los niveles de distintas citoquinas, que a su vez están relacionadas con la modulación del eje HPA. Tal es el caso de IL-1β, que se encuentra elevada en modelos de estrés crónico y en el suero de pacientes con síntomas de depresión. IL-1β a su vez puede estimular el eje HPA. Los niveles de TNF-α e IL-6 también están incrementados en estos pacientes (Gadek-Michalska y col., 2013). La exposición a estrés crónico altera las respuestas proliferativas de linfocitos T y B y afecta la actividad de las células NK (Silberman y col., 2003; Silberman y col., 2004; Hayley, 2011).

Una de las estructuras más estudiada en referencia a los efectos del estrés crónico es el hipocampo. Como se desarrollará más adelante, el hipocampo está involucrado en aspectos clave de la memoria espacial y memoria declarativa. Se ha demostrado que la administración de corticosteroides afecta la memoria espacial de forma dosis dependiente (Brown y col., 1999). A su vez, es una de las pocas estructuras donde se ha comprobado la presencia de neurogénesis adulta (Kempermann y col., 1997; van Praag y col., 1999). Ha sido ampliamente demostrado que la exposición crónica a estrés disminuye la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Snyder y col., 2010; Palumbo y col., 2012; McEwen, 2006), conjuntamente con un remodelado dendrítico en el área *Cornu Ammonis* (CA) 3. Se ha observado también un incremento en el estrés oxidativo, comprobado en un aumento de peroxidación lipídica, de los niveles de especies reactivas de oxigeno, que estarían relacionados con un incremento en la expresión de la NADPH oxidasa (Seo y col., 2012).

1.4. Estrés prenatal

Como se ha descripto en el presente trabajo, los glucocorticoides tienen numerosas funciones fisiológicas, y su liberación desregulada desencadena el desarrollo de numerosas patologías, de las cuales sólo se describen unas pocas. De particular interés es la función de los GC durante el desarrollo prenatal del individuo, dado que una desregulación en los niveles de los mismos podría afectar la programación neuroendócrina del feto en gestación.

Durante la preñez se producen relevantes cambios en la funcionalidad del eje HPA materno. Tal es así que los niveles de cortisol en humanos aumentan considerablemente, llegando a un pico en el tercer trimestre. Este incremento se debe en parte a la liberación de CRH por parte de la placenta hacia la circulación materna. El CRH placentario (CRHp) estimula la liberación de ACTH en la pituitaria materna y la liberación de cortisol en las glándulas adrenales. Se ha demostrado además que el cortisol estimula la liberación de CRHp, opuesto a lo que sucede en el PVN materno. En la madre, el CRHp es inactivado por la proteína de unión a CRH, con la excepción de las últimas dos semanas de preñez. No obstante estos incrementos, los niveles de GC en placenta son hasta 10 veces menores debido a la acción de la 11βHSD-2. Los niveles de esta enzima se incrementan durante la preñez, protegiendo al feto del incremento de GC en circulación (Mulder y col., 2002). En los últimos estadios de la gestación, CRHp estimula la liberación de ACTH en la pituitaria fetal, que a su vez estimula la síntesis de cortisol adrenal. El cortisol en la placenta estimula la liberación de CRHp, resultando en un mecanismo de retroalimentación positiva, que facilita la maduración de órganos en el feto, y la síntesis de dehidroepiandrostenediona-sulfato, precursor de los estrógenos, que desencadena una cascada de eventos que incrementa la actividad uterina y finalmente el parto.

No obstante el rol fisiológico que tiene el incremento en la secreción de GC hacia el final de la gestación, una secreción desregulada de los mismos podría saturar los mecanismos que regulan la biodisponibilidad y actividad biológica de los mismos e influir en el desarrollo fetal. Numerosos estudios han vinculado la exposición de mujeres durante la gestación a desastres ambientales, guerras, violencia familiar con cambios en el desarrollo de su descendencia. Se han descripto déficits de atención, una mayor incidencia de esquizofrenia, ansiedad y depresión (Kofman, 2002; Weinstock, 2008). El efecto del estrés durante el desarrollo se ha evidenciado en alteraciones en la funcionalidad del eje HPA, observándose niveles elevados de cortisol salival en respuesta a estrés agudo, que perduraron elevados por mayor tiempo en niños de alrededor de 10 años de edad (Weinstock, 2008). En un estudio acerca de complicaciones durante la gestación en Glasgow, Escocia entre 1965 y 1966 se encontró una asociación entre problemas maritales y “tensiones personales” con retrasos en el desarrollo motor y alteraciones en el comportamiento (Kofman, 2002).

En la mayoría de estos estudios es difícil controlar la influencia temporal del estresor, su duración. Esto implica una mayor variabilidad en los grupos experimentales y por lo tanto una mayor dificultad en determinar los efectos del estrés en la descendencia. Un caso particular en la evaluación de los efectos del estrés durante el desarrollo es el "Proyecto Tormenta de Hielo (*Proyect Ice Storm*)". En enero de 1998 una serie de tormentas de hielo dejaron sin suministro eléctrico a 1.4 millones de personas en Quebec, Canadá. A partir de junio de ese año se comenzó a evaluar a las mujeres que estaban embarazadas durante ese desastre natural. La particularidad de este estudio es que se puede determinar exactamente el período de la preñez afectado por el siniestro, su duración. Además permite distinguir entre el evento objetivo (qué fue lo que sucedió) y la percepción que cada mujer tuvo del mismo (distress subjetivo). En este estudio se observaron efectos del estrés prenatal en el desarrollo motor (una menor coordinación bilateral e integración visual-motora), en niños de 5 años de edad (Cao y col., 2011). A su vez se observaron puntuaciones menores en tests de coeficiente intelectual (asociadas a habilidad cognitiva y a desarrollo del lenguaje). Se observó además una relación entre la exposición a la tormenta de hielo y el desarrollo de caracteres de tipo autista (Walder y col., 2014). Finalmente, se determinó una correlación entre la exposición a estrés y la secreción de insulina en los hijos a los 13 años de edad (Dancause y col., 2013). El incremento en la secreción de insulina se relaciona con el desarrollo de insulino-resistencia, que puede desencadenar la patología diabética.

Dadas las inherentes dificultades que implica el estudio del efecto del estrés prenatal en humanos, se han desarrollado diferentes modelos de estrés prenatal en animales, desde ratas, ratones, cobayos hasta cerdos y monos. En roedores de laboratorio, estos modelos incluyen la suspensión del individuo preñado desde la cola, la administración de shocks eléctricos, la exposición al ruido, administración de inyecciones de solución salina, o restricción del movimiento, entre otros (Maccari y col., 2003; Weinstock, 2008). Estos tratamientos prenatales inducen una amplia gama de efectos en el desarrollo de la cría, que se han evidenciado en la adultez como cambios en el comportamiento. Estos cambios son a su vez dependientes del modelo de estrés aplicado, del estadio prenatal en que se aplicó y de la amplitud temporal durante la cual se aplicó el modelo de estrés.

Como en el caso del estrés crónico aplicado a animales adultos, la exposición a estrés durante la gestación induce la activación del eje HPA, a través de los procesos descriptos en la sección anterior. Los GC atraviesan la placenta, actuando sobre el feto en desarrollo como un factor programador. Se ha definido *programado perinatal* a aquellos factores no genéticos que pueden actuar tempranamente en el desarrollo organizando permanentemente los sistemas fisiológicos. De esta manera, un ambiente externo adverso es transmitido al feto mediante factores programadores, actuando sobre tejidos específicos durante períodos del desarrollo sensibles a estos factores, afectando por lo tanto su organización y función. Dado que las células y tejidos son sensibles a distintos factores a estadios diferentes, los efectos del ambiente en la fisiología del individuo dependerán del tejido, del estadio de desarrollo en que ocurrió el estrés y del tipo de estresor (Barker, 1995; Harris & Seckl, 2011).

Como se ha detallado previamente, la placenta cuenta con mecanismos para regular los niveles de GC que pueden acceder al feto en desarrollo, como es el caso de la presencia de la enzima 11βHSD-2. Sin embargo, se ha demostrado que el estrés prenatal induce una marcada disminución en los niveles del ARNm de esta proteína, y una disminución de su actividad enzimática (Mairesse y col., 2007; Jensen Peña y col., 2012). A continuación se detallan algunos de los cambios inducidos por estrés prenatal observados en animales de laboratorio. El estrés prenatal programa el eje HPA de la cría alterando la respuesta del mismo frente a situaciones de estrés en la adultez. Esto se ha evidenciado como un incremento en la duración de la liberación de corticosterona en plasma en respuesta a un estrés agudo (Maccari y col., 2003; Kofman, 2002). A su vez, algunos autores han informado un incremento en los niveles basales de corticosterona (Kofman, 2002). Se ha observado que el estrés prenatal altera los ritmos circadianos. Estas ratas se adaptaron más lentamente que los animales del grupo control a un desplazamiento del ciclo de luz-oscuridad (Maccari & Morley-Fletcher, 2007). El estrés prenatal afecta la regulación de los niveles de glucosa. En embriones de 21 días se determinó una disminución en el peso del páncreas y una disminución de la masa de células β, que son las que secretan insulina (Mairesse y col., 2007). En ratas de 24 meses se observó un incremento en los niveles de glucosa en sangre en un test de tolerancia a la administración oral. A su vez, luego

de un ayuno de 24 horas, se observó una mayor ingesta de alimento en las ratas estresadas prenatalmente (Lesage y col., 2004).

Han sido reportados efectos del estrés prenatal en el sistema inmune. En ratas adultas expuestas a estrés prenatal se observó un incremento en los niveles circulantes de células NK y $CD8^+$, y un incremento en la secreción de IFN-γ en respuesta a mitógeno (Vanbesien-Mailliot y col., 2007). En ratones se ha reportado un incremento en los niveles de ARNm de IL-1β y TNF-α en el hipocampo, debido a la exposición a estrés prenatal. A su vez, la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS) indujo un incremento en las células que expresan TNF-α en el área CA1 del hipocampo. Se observó además un aumento de la presencia de microglía reactiva en el área CA1 del hipocampo, y un incremento en el Giro Dentado en respuesta a LPS. Esto sugiere un incremento en el status pro-inflamatorio en estos ratones (Diz-Chaves y col., 2013).

Numerosos estudios han explorado las consecuencias de la exposición a estrés durante la gestación sobre el sistema nervioso central. El estrés por restricción del movimiento produjo defectos en el fenómeno de potenciación de largo término (LTP, de sus siglas en inglés) en hipocampo conjuntamente con una reducción en la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA y de la subunidad GluR1 del receptor AMPA, ambos glutamatérgicos (Yaka y col., 2007; Lui y col., 2011). Similares efectos se observaron cuando el estrés prenatal se llevó a cabo mediante la administración de shocks eléctricos a la hembra preñada (Yang y col., 2007). Se ha determinado además una disminución en la neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo (Lemaire y col., 2000; Morley-Fletcher y col., 2011), una disminución en el número de espinas dendríticas en neuronas de la corteza órbitofontal y la corteza cingulada dorsal anterior. En ratas macho se detectó una reducción pronunciada en la longitud y complejidad de las dendritas apicales de neuronas piramidales en estas regiones corticales. Estas alteraciones no se observaron en hembras (Murmu y col., 2006). En relación al contenido de neurotransmisores, se ha informado una disminución en los niveles de noradrenalina y un incremento de sus metabolitos en el hipocampo, neocorteza y LC, un incremento en la liberación de acetilcolina en hipocampo (Maccari y col., 2003), una disminución en los niveles de dopamina en el LC y de sus metabolitos en hipotálamo, en el área CA3 del hipocampo y corteza prefrontal en machos (en hembras se encontró un incremento en los metabolitos de dopamina en esta

estructura) (Bowman y col., 2004). A su vez se encontró una disminución en los niveles de GAD67, enzima limitante en la síntesis de GABA, en corteza frontal en ratones estresados prenatalmente (Matrisciano y col., 2013) y un incremento en los niveles del receptor para serotonina 5-HT2 y del ARNm de 5-HT1a en la corteza prefrontal (Maccari & Morley-Fletcher, 2007).

Estos cambios en fenómenos de plasticidad neuronal, expresión y metabolismo de neurotransmisores, de los cuales sólo se ha detallado una pequeña parte, se reflejan en una amplia gama de alteraciones comportamentales que se han descripto en animales estresados prenatalmente. Asociadas a las alteraciones en el eje HPA, se ha encontrado en machos que estos animales presentan un comportamiento de tipo ansiogénico (Vallée y col., 1997; Marrocco y col., 2012), mientras que en hembras no se observaron diferencias (Van den Hove y col., 2013); a su vez se ha observado una disminución en la interacción social cuando se expuso a un macho adulto estresado prenatalmente junto con un macho nuevo, en comparación con el comportamiento de individuos cuyas madres no fueron estresadas durante la preñez (Lee y col., 2007). En concordancia con los cambios que el estrés prenatal induce en procesos de plasticidad hipocampal, hay numerosas evidencias del efecto de este tratamiento en procesos de aprendizaje dependientes de esta estructura límbica. Estos animales muestran mayores latencias para encontrar la plataforma oculta en un test de memoria espacial (Laberinto de Agua de Morris) (Lemaire y col., 2000) y defectos en el reconocimiento de un objeto novedoso y en tareas que requieren memoria de trabajo (Markham y col., 2010). Finalmente, el estrés durante la gestación conlleva un peor desempeño en tareas que implican el uso de memoria asociativa (Wu y col., 2007).

1.5. El hipocampo

Henry fue ingresado al departamento de Neurología y Neurocirugía luego de un largo historial de ataques epilépticos que no respondían a la medicación anticonvulsivante en ninguna de las dosis administradas, aumentando con los años la frecuencia e intensidad. Debido a la falta de respuesta a la medicación, el equipo médico sugirió la intervención quirúrgica del paciente, conociendo las características epileptogénicas del hipocampo. Durante la operación, se expusieron los lóbulos temporales, realizándose la

remoción de tejido. La recuperación postoperatoria fue satisfactoria, disminuyéndose a su vez el número e intensidad de los ataques epilépticos. Sin embargo se observó una consecuencia inesperada de la intervención: el paciente no logra reconocer al equipo médico del hospital ni encontrar el camino al baño. Ha llegado a almorzar, sin poder recordar, apenas media hora después, que es lo que ha comido, ni siquiera recordar que efectivamente ha almorzado. En los test de aprendizaje asociativo, su capacidad fue nula, no logrando mejoras con la práctica. Incluso, al comenzar un nuevo tipo de test, la naturaleza del anterior es olvidada, y no reconocida si se repite luego. Por lo demás, para el observador casual parece un individuo normal, dado que su entendimiento y capacidad de razonamiento no se encuentran disminuidos. Los tests no revelaron ninguna clase de déficit en percepción, pensamiento abstracto o raciocinio (Adaptado de Scoville & Milner, 1957).

Desde la descripción de las alteraciones observadas en el paciente H.M. en 1955, conjuntamente con su posterior evaluación a lo largo de los años subsiguientes, y la descripción de nuevos casos clínicos, el rol fundamental del hipocampo en la adquisición de memoria declarativa fue reconocido y establecido. Este tipo de memoria es dependiente de la integridad del lóbulo temporal medial, y confiere la capacidad de recordar conscientemente hechos y eventos. La memoria declarativa es proposicional, puede ser verdadera o falsa. Está involucrada en el almacenamiento de representaciones sobre hechos del mundo exterior. En cambio, la memoria no declarativa no es ni verdadera ni falsa. Involucra cambios en habilidades y la posibilidad de responder de manera adecuada a un estímulo a través de la práctica, como resultado del condicionamiento o del aprendizaje de un hábito. También incluye la habilidad de detectar o identificar objetos como resultado de encuentros recientes con los mismos, conocida como primado. En el caso de la memoria no declarativa, el desempeño mejora con la práctica, pero esta mejora ocurre sin pruebas de un acceso consciente a episodios previos. Muchas formas de memoria no declarativa como el condicionamiento clásico, la habituación y sensibilización son filogenéticamente antiguos y bien desarrollados en modelos animales invertebrados, que carecen de lóbulo temporal medial o hipocampo (Milner y col., 1998).

Regresando al caso H.M., el hecho de que la lesión de un área cerebral relativamente circunscripta pudiera generar una severa pérdida de memoria confrontó con las

teorías contemporáneas antilocalizacionistas, justificadas en las imposibilidades de aislar la engrama. Estudios en este paciente permitieron reconocer que sólo la memoria declarativa (explícita) estaba afectada por la lesión hipocampal, sin efectos en la memoria no declarativa (implícita). El estudio de casos clínicos permitió distinguir variantes de memoria declarativa: memoria episódica, relacionada con el recuerdo de

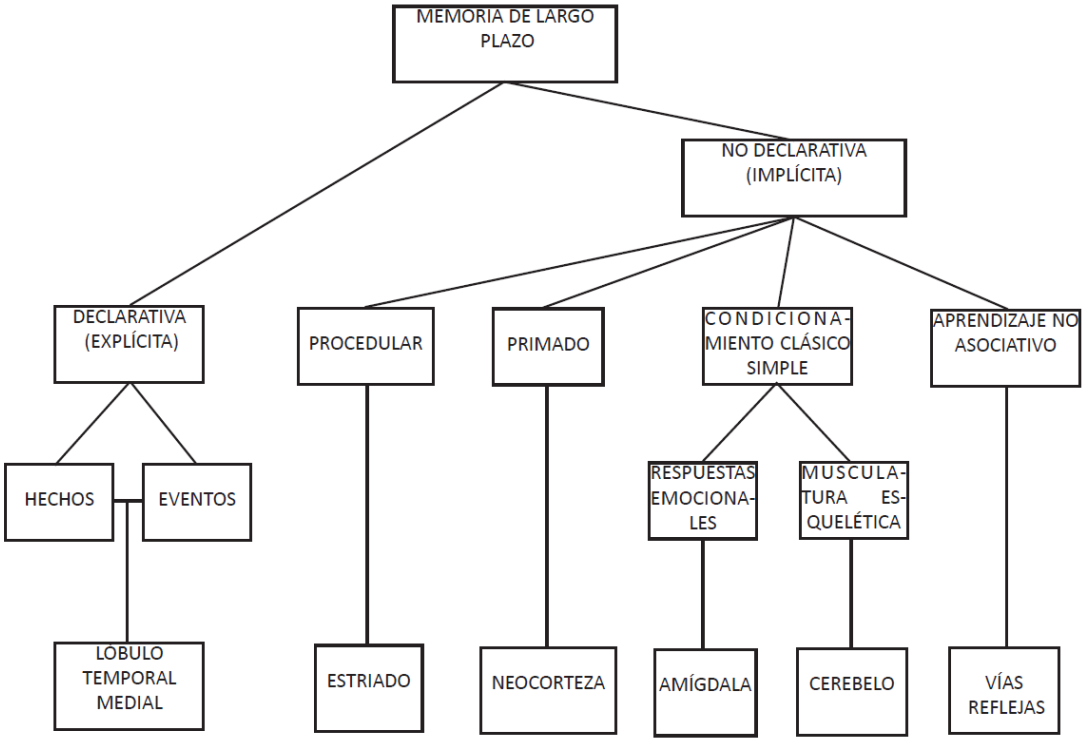


Figura 1: Tipos de memoria de Largo Plazo
En la figura se esquematizan distintos tipos de memoria declarativa y no declarativa y las estructuras implicadas en mamíferos (adaptada de Milner y col., 1998).

eventos experimentados por el propio individuo y la memoria semántica, relacionada con el recuerdo de hechos generales del mundo (Rosenbaum y col., 2014). En relación a esta distinción entre memoria explicita e implícita, resultó sorprendente para los evaluadores demostrar que H.M. no mostraba dificultades en una tarea de aprendizaje motriz, mostrando la típica curva de aprendizaje, aun cuando día tras día no recordara haber hecho esa tarea. Posteriormente se observó que H.M. tampoco mostraba defectos en otro tipo de memoria implícita, el primado.

Estos reportes de casos clínicos de pacientes con lesiones hipocampales que presentaban amnesia impulsaron el desarrollo de modelos animales para el estudio de memoria declarativa, dependiente del hipocampo. Como es de esperar, *los animales de laboratorio no pueden declarar nada*, sin embargo, se han desarrollado métodos que permiten explorar distintos aspectos de este tipo de memoria. Particularmente, los roedores pueden ser evaluados en su reconocimiento de lugares, objetos, olores. Este tipo de estudios ha demostrado que lesiones en el hipocampo interfieren con el almacenamiento de este tipo de memorias (Milner y col., 1998).

Sin embargo, el hipocampo no sólo está involucrado en la adquisición de memoria declarativa, sino que a su vez, como ya se ha descripto previamente en este trabajo, está implicado en la modulación de la respuesta al estrés y el comportamiento emocional y su malfuncionamiento se vincula con desórdenes afectivos como la depresión. El detallado análisis de la conectividad del hipocampo con otras estructuras y el estudio de lesiones localizadas ha permitido diferenciar dos estructuras separadas dentro del hipocampo, una rostral/dorsal implicada en las funciones cognitivas y una caudal/ventral relacionada con las funciones afectivas (Fanselow & Dong, 2010).

1.5.1. Organización y desarrollo del hipocampo

El hipocampo es una estructura en forma de "C" situada en la parte caudal del cerebro. Se puede dividir en tres subregiones: el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho, que consiste de las áreas *Cornu Ammonis*[1] (CA) 3, CA2 y CA1, y el *subiculum*. La corteza que conforma la formación hipocampal presenta tres capas. La primera es una capa profunda, que comprende fibras aferentes y eferentes e interneuronas. En el GD esta capa se denomina *hilus*, mientras que en las regiones del CA se lo conoce como *stratum oriens.* Sobre la superficie de esta capa se encuentra la capa celular, compuesta por células principales e interneuronas. En el GD se la denomina capa granular, mientras que en el CA y el *subiculum* se conoce como capa de células piramidales (*stratum piramidale*). Finalmente, la capa más superficial es la capa molecular (en el GD y *subiculum*). En CA esta capa se divide en subcapas. En CA3 se distinguen tres subcapas: *stratum lucidum*, que recibe aferencias del GD, el *stratum*

[1] La denominación *Cornu Ammonis* deriva de su similitud con las astas de un carnero, simbología asociada al dios egipcio Amón.

radiatum que comprende las dendritas apicales de las neuronas del *stratum piramidale* y el *stratum lacunosum-moleculare*. En CA2 y CA1 la laminación es similar, con la excepción de que carecen de *stratum lucidum*.

1.5.1.1. Conectividad en la formación hipocampal

En el modelo standard, el primer paso de la vía polisináptica está formado por una proyección unidireccional desde el GD hacia CA3, conocido como fibras musgosas. Desde CA3 las células piramidales proyectan sus axones hacia CA1, lo que se conoce como colaterales de Schaffer. Finalmente, CA1 proyecta hacia el *subiculum*. Sin embargo, se han descripto proyecciones hacia atrás que discuten este modelo unidireccional. Específicamente, se ha observado que las células piramidales de CA3 proyectan hacia el *hilus* y la capa molecular interna del GD. También se ha descripto una proyección de CA1 a CA3 y del *subiculum* a CA1 (van Strien y col., 2009).

1.5.1.2. Conectividad de la formación hipocampal con otras áreas del cerebro

El área CA1 del hipocampo dorsal envía proyecciones hacia el *subiculum*. Desde CA1 y el *subiculum* salen proyecciones hacia la corteza retrosplenial y la corteza cingulada anterior (en ratas). Estas áreas corticales están implicadas en el procesamiento cognitivo de información visuoespacial, de memoria, y en la exploración del ambiente. Además, CA1 y CA3 dorsales envían proyecciones hacia el núcleo lateral septal, que a su vez proyecta hacia el complejo medial septal y el núcleo supramamilar, que controlan el ritmo *theta* hipocampal activado durante la locomoción voluntaria. Finalmente, otras proyecciones finalizan en el área tegmental ventral (relacionada con la locomoción) y la *substantia nigra* (involucrada con los movimientos de orientación de la cabeza, ojos y miembros anteriores). Por lo tanto, estas estructuras participan en aspectos centrales de la exploración: locomoción, movimientos de orientación y direccionamiento espacial. En resumen desde el hipocampo dorsal se forma una crítica red cortical que media procesos cognitivos de aprendizaje, memoria, navegación y exploración.

El área CA1 ventral envía proyecciones al bulbo olfatorio. Además presenta una comunicación bidireccional con la amígdala. El área CA1 ventral y la amígdala conectan con la corteza insular infralímbica, prelímbica y agranular. Estas estructuras, ya sea directa o indirectamente a través del septo lateral, la amígdala, o el BNST, inervan las

zonas periventriculares y mediales del hipotálamo. Estas proyecciones desde el hipocampo ventral a través del BNST pueden ser críticas en la comprensión de desórdenes neuropsiquiátricos como depresión, ansiedad y estrés post-traumático porque este núcleo proyecta directamente sobre las neuronas CRH del núcleo paraventricular del hipotálamo. El área CA1 ventral y el *subiculum* ventral envían proyecciones a la corteza del núcleo accumbens (procesamiento de la recompensa) y axones que se solapan con *inputs* del núcleo supraquiasmático del hipotálamo relacionado con el control del ciclo sueño-vigilia. En relación a esto se ha observado en pacientes depresivos dificultades en el dormir (Fanselow & Dong, 2010). A continuación se muestra un esquema del hipocampo de rata y algunas de sus interconexiones (Figura 2 A y B).

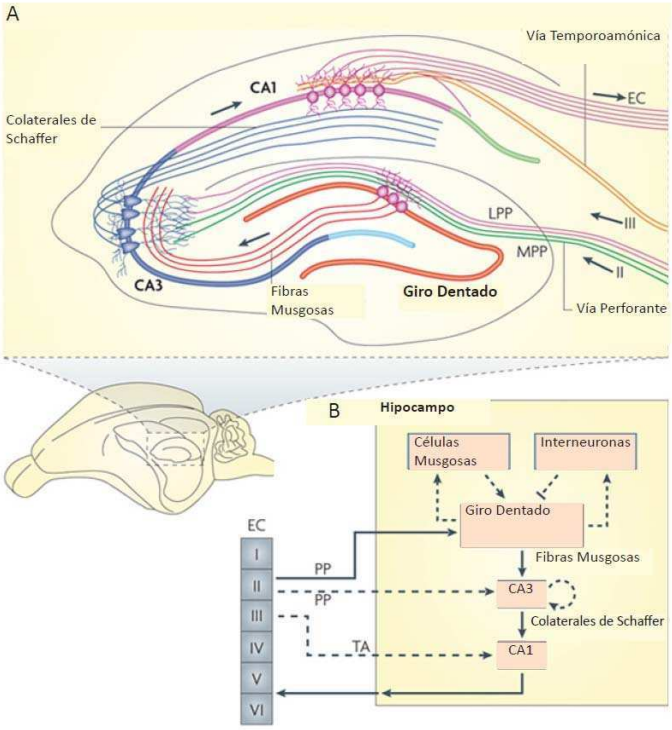


Figura 2: El hipocampo de rata y sus conexiones
A: se muestra una vista anatómica de algunas de las conexiones entre las distintas áreas del hipocampo y vías aferentes y eferentes hacia otras estructuras.
B: vista esquemática de las conexiones intrahipocampales y las conexiones con la corteza entorrinal (EC).
Figura adaptada de Deng y col., 2010.

1.5.1.3. Desarrollo

El estudio del hipocampo en modelos animales de laboratorio debe tener en cuenta las diferencias que esta estructura presenta en el curso temporal de su desarrollo con respecto a la progresión en humanos. A continuación se describen algunos de los hitos en su desarrollo, comparando el curso temporal en roedores y humanos (Avishai-Eliner y col., 2002).

1.5.1.3.1. Nacimiento de células piramidales

En humanos, su nacimiento comienza en la primera mitad de la gestación, luego de la semana 15, finalizando en la semana 24 de gestación.

En la rata, el nacimiento de estas células se produce en la segunda mitad de la gestación, iniciándose a los 15 días prenatales y finalizando a los 19 días prenatales.

1.5.1.3.2. Nacimiento de las células granulares del giro dentado

En el humano el 70% de estas células nacen en estadios prenatales, a partir de las semanas 13-14, llegando a un pico en la semana 34. Estas células continúan naciendo durante la vida adulta, a lo largo de la vida.

En la rata comienzan su desarrollo en el día 18 prenatal, desarrollándose el 85% de estas células postnatalmente, su mayoría durante el primer mes de vida. Como en humanos, se continúan generando nuevas células durante toda la vida.

1.5.1.3.3. Diferenciación y sinaptogénesis

-complejo de fibras musgosas en dendritas de células piramidales proximales de CA3

En el humano se desarrollan entre el tercer y séptimo mes postnatal y alcanzan su madurez entre el tercer y quinto año de vida.

En la rata su desarrollo comienza a los 9 días postnatales y su maduración se alcanza a los 21 días.

-espinas pedunculadas en dendritas de células piramidales distales de CA3

En el humano comienzan su desarrollo con el nacimiento y maduran entre los 3 y 5 años.

En la rata, su desarrollo comienza a los 7 días postnatales y su maduración se alcanza a los 21 días.

-pico en la formación de sinapsis en giro dentado

Entre el primer y segundo año en humanos.

Entre los 9 y 14 días postnatales en la rata.

-densidad de sinapsis a niveles de adulto en la capa molecular

En el humano, entre el mes 7 y 10.

En la rata, a los 21 días postnatales.

-período de mayor diferenciación de las células musgosas en giro dentado

Entre los 7 y 30 meses postnatales en humano, alcanzando el nivel observado en adultos a los 5 años.

En la rata, entre los 7 y 14 días luego del nacimiento, alcanzando su madurez a los 14 días.

1.5.1.3.4. Conexiones aferentes

-Corteza entorrinal-giro dentado

En humanos entre la semana postnatal 19 y 20.

En la rata, al día 17 de gestación.

-Aferentes supramamilares alcanzan capas celulares juxtagranulares y células piramidales de CA2

En humanos, a la semana 20 prenatal.

En rata, se presume que a la primer semana postnatal (Avishai-Eliner y col., 2002).

Como ha sido mencionado en esta descripción, la zona subgranular del giro dentado es una de las pocas áreas donde se continúan generando nuevas neuronas a lo largo de la vida del individuo (otra región donde ocurre este proceso es la zona subventricular). Este proceso es relevante en el estudio del estrés porque, como ya ha sido mencionado, tanto el estrés crónico en la adultez como el estrés prenatal afectan la neurogénesis adulta, y se ha observado que tratamientos farmacológicos con antidepresivos (u otros agentes) que recuperan algunos de los fenotipos a niveles del control también revierten los defectos en neurogénesis hipocampal (Morley-Fletcher y col., 2011).

1.5.2. Estudio de la memoria declarativa y algunos mecanismos celulares implicados.

A lo largo de los años se han diseñado numerosos tests de comportamiento con el fin de estudiar memoria dependiente del hipocampo. Algunos ya han sido mencionados en este trabajo, como por ejemplo el test de reconocimiento de objetos. Se han diseñado distintas variantes de test de memoria espacial, como el laberinto radial, el laberinto acuático de Morris o el laberinto de Barnes, que utilizan distintas estrategias motivacionales para evaluar la capacidad del roedor de encontrar un refugio o

recompensa, generando una representación espacial del recinto que le permite mejorar sesión a sesión su desempeño. Otros tests buscan la asociación de una locación particular con una experiencia aversiva, como es el caso del test de evitación inhibitoria. Muchos otros test han sido diseñados, pero no es objetivo de este trabajo su desarrollo.

A la identificación del hipocampo como estructura necesaria para la adquisición de memorias declarativas, sobrevino la identificación de los procesos celulares involucrados. En 1973 Bliss y Lømo describieron el proceso de LTP en hipocampo. Se encontró que en las tres vías principales del hipocampo, la vía perforante, las colaterales de Schaffer, y las fibras musgosas un corto tren de potenciales de acción de alta frecuencia induce un incremento en la fuerza sináptica que puede mantenerse por horas y hasta durante días (Bliss & Lømo, 1973). Posteriormente se identificó este proceso de plasticidad sináptica en otras regiones del cerebro. La identificación de este mecanismo llevó a los investigadores a buscar una relación con la adquisición de memoria. Se encontró así que lesiones de origen genético en esta vía que afectan el proceso de LTP pueden producir déficits en memoria (McHugh y col., 1996; Almonte y col., 2014; Ayala y col., 2010).

Previamente se ha mencionado que en el hipocampo se generan nuevas neuronas en la adultez, proceso conocido como neurogénesis adulta. Numerosos investigadores han intentado vincular este proceso con mecanismos de aprendizaje dependientes de hipocampo, sin embargo se han encontrado resultados disímiles, por ejemplo, algunos grupos reportan que la inhibición de la neurogénesis adulta bloquea formas de aprendizaje hipocampo-dependientes, mientras que otros no han encontrado cambios. En un trabajo publicado en 2008 por Dupret y col. se observó que la inhibición de la neurogénesis adulta no afectó algunas formas de aprendizaje hipocampo-dependiente, como la habituación en la exploración en un ambiente novedoso ni el condicionamiento de miedo contexto dependiente, pero si produjo un déficit en la memoria espacial relacional, evaluada en el laberinto acuático de Morris (Dupret y col., 2008).

1.6. La neurotransmisión nitrérgica.

Desde las primeras evidencias de la producción de nitritos y nitratos en macrófagos (Stuehr & Marletta, 1985), luego su identificación como el "factor relajante derivado de endotelio" (Palmer y col., 1987) hasta la actualidad, el conocimiento del óxido nítrico (NO) y sus funciones en sistemas biológicos se ha incrementado notablemente. El NO es una molécula pequeña y de vida media relativamente corta, rápidamente se oxida a nitratos y nitritos. Dado su carácter lipofílico, fácilmente difunde a través de membranas biológicas. Esta molécula es sintetizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que utiliza como sustrato L-arginina, produciendo además citrulina en cantidad equimolar. Se han identificado 3 isoformas de esta enzima, la isoforma neuronal nNOS o NOS I, la isoforma inducible iNOS o NOS II y la isoforma endotelial eNOS o NOS III. Los números adjudicados se deben al orden en que originariamente fueron purificadas y sus ADN copia (ADNc) obtenidos (Forstermann y col., 1994). A su vez, la caracterización "neuronal" o "endotelial" refiere a los tipos celulares en donde fueron descubiertos (pero no restringe su expresión a estos).

1.6.1. Estructura y cofactores

La NOS es una enzima homodimérica, que presenta dos dominios funcionales: un dominio N-terminal que presenta actividad oxigenasa y un dominio C-terminal que presenta actividad reductasa. Todas las isoformas requieren los mismos cofactores: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN), que se asocian al dominio reductasa, y 6(R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) que se une al dominio oxidasa. Este dominio une además un grupo hemo y presenta el sitio de unión para el sustrato L-arginina (Stuehr, 1999). Además de los cofactores mencionados, las NOS requieren de calmodulina (CaM) para su actividad catalítica. CaM incrementa la tasa de transferencia de electrones desde el NADPH a las flavinas del dominio reductasa y gatilla además el flujo de electrones desde FMN al grupo hemo, acoplando de esta manera el dominio oxigenasa de NOS con el dominio reductasa. CaM facilita a su vez la reducción del citocromo C y la ferricianida de BH4 y del hemo oxidado (Alderton y col., 2001). CaM requiere de calcio para su unión con las isoformas nNOS y eNOS, mientras que su unión a iNOS es independiente de calcio. Tanto nNOS como eNOS se expresan

de forma constitutiva, mientras que la expresión de iNOS es inducible. A continuación se describe para cada isoforma sus características particulares.

nNOS

Esta isoforma presenta un peso molecular aproximado de 150 kiloDaltons (kDa). Como ya ha sido mencionado, su expresión es constitutiva y su actividad depende de calcio. Su ubicación subcelular es principalmente citoplasmática (hasta en un 90%). Algunos de los sitios putativos de regulación de la transcripción del gen de nNOS son: AP-2, CREB, ATF, cFos, NFκB, NF-1, TEF-1. Originariamente se describió su expresión en cerebro, sin embargo a la actualidad se ha identificado su presencia y actividad en numerosos tejidos y tipos celulares. Algunos de estos son: ganglios simpáticos, glándulas adrenales, células epiteliales de pulmón, células de la mácula densa del riñón, en el estómago, en células de los islotes pancreáticos, músculo esquelético, en el útero, en el pene y en espermatozoides. En cerebro se ha detectado su expresión en distintas áreas, entre ellas, los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, el hipocampo, amígdala, corteza cerebral y cerebelo (Forstermann y col., 1994; Yun y col., 1997; Tricoire & Vitalis, 2012; Yamaguchi y col., 2010; Maur y col., 2012). La actividad enzimática de esta isoforma puede ser modulada a través de la fosforilación por diferentes proteínas kinasas: PKC y CaMKII, que disminuyen la actividad de nNOS (Bredt y col., 1992), mientras que Akt incrementa su actividad (Garthwaite, 2008).

iNOS

Esta isoforma tiene un peso molecular aproximado de 130 kDa. Es una enzima principalmente citoplasmática. Su expresión es inducible por distintas citoquinas, por ejemplo IL-1β e INF-γ, a través de la estimulación de NFκB o de la vía de transducción Jak/STAT (Burke y col., 2013; Pautz y col., 2010). Se expresa principalmente en células del sistema inmune, como macrófagos y linfocitos. Además se ha encontrado iNOS en células β del páncreas, en hepatocitos, miocitos, osteoblastos y fibroblastos, entre otros. En el cerebro se expresa en células de la microglía y astrocitos (Lu y col., 2014). La actividad de esta isoforma es independiente de los niveles intracelulares de calcio dado que no requiere del mismo para su unión a calmodulina. Una vez sintetizada la enzima, produce NO en grandes cantidades hasta su degradación. No se conoce

modulación por proteínas quinasas, sin embargo se han descripto proteínas que, al asociarse a iNOS, pueden impedir la dimerización, inhibiendo su actividad.

eNOS

La isoforma endotelial presenta un peso molecular de 140 kDa. Así como nNOS, su expresión es constitutiva y su actividad depende de calcio. A diferencia de las otras isoformas, eNOS se encuentra mayormente asociada a membrana. La adición de un grupo miristilo cotraduccional gatilla su localización en membrana, donde además se agregan dos grupos palmitilo, lo cual también ayuda al anclaje. El gen eNOS tiene sitios posibles de regulación de la transcripción por AP-1, AP-2 y NF-1, entre otros. Se expresa en células del endotelio vascular. Su actividad puede ser modulada por la interacción con otras proteínas. Tal es el caso de la caveolina, que inhibe tónicamente la interacción de eNOS con CaM. Su actividad es modulada por proteínas quinasas. Como en el caso de nNOS, Akt estimula su actividad. El mismo residuo serina puede ser fosforilado por PKC, PKA, PKG y CaMKII. También se autoregula a través de S-nitrosilación, es decir, la modificación del grupo tiol de residuos cisteína. En estado basal se encuentra nitrosilada, pero en presencia de estimulación la enzima es rápidamente denitrosilada (Dudzinski y col., 2006; Garthwaite, 2008).

1.6.2. Vías de acción del óxido nítrico

Años antes del descubrimiento del NO en sistemas biológicos, se había ya identificado a su receptor, una guanilato ciclasa soluble (sGC). La unión del NO al grupo hemo del receptor estimula la síntesis de GMPc, activando entre otros a la proteína kinasa dependiente de GMPc (PKG) y canales iónicos dependientes de nucleótido cíclico. El óxido nítrico modula también otras metaloproteasas, como el citocromo P450 scc, esencial para las reacciones esteroidogénicas, y la ciclooxigenasa, necesaria para la síntesis de prostaglandinas (Rettori y col., 2009). Otro mecanismo de modulación de proteínas es a través de la S-nitrosilación. Se ha determinado que la S-nitrosilación de CREB, conjuntamente con su fosforilación (el mecanismo clásicamente descripto para la modulación de CREB), controlan la unión de esta proteína al ADN y por lo tanto la inducción en la expresión de genes (Riccio y col., 2006). La S-nitrosilación del factor de transcripción MEF2 en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo inhibe la

neurógenesis adulta (Okamoto & Lipton, 2014). Como éstas, numerosas vías de modulación por S-nitrosilación han sido descriptas.

1.6.3. Funciones del óxido nítrico

Dada la ubicuidad de las enzimas que lo sintetizan, el NO tiene numerosas funciones, de las que se describirán sólo algunas. En el endotelio vascular, el NO sintetizado por eNOS tiene una función vasodilatadora. Esta acción es mediada por el incremento de GMPc, que estimula a PKG, que activa una fosfatasa que defosforila la miosina del músculo liso, resultando en su relajación y consecuente vasodilatación (Dudzinski y col., 2006).

En el caso de iNOS, su principal función descripta es su actividad citotóxica en respuesta a agentes infecciosos. En particular se han descripto efectos antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y antitumorales. La velocidad máxima de producción de NO por iNOS es hasta 10 veces mayor que la de las otras isoformas. El NO reacciona con el radical superóxido (O_2^-) formando peroxinitrito, un potente oxidante (Yun y col., 1997; Lowenstein & Padalko, 2004). Además puede formar nitrosotioles, dióxido de nitrógeno y otras especies nitrosativas. Estas especies reactivas pueden atravesar las paredes bacterianas y fungales y reaccionar con distintos blancos. El NO puede inhibir la síntesis de ADN bacteriano, puede incrementar la susceptibilidad del ADN a daño oxidativo a través del bloqueo de la respiración celular. Además puede oxidar lípidos. El NO puede nitrosilar una proteasa en virus de ARN, inhibiendo el clivaje de la poliproteína viral y por lo tanto bloqueando la replicación (Lowenstein & Padalko, 2004).

Un gran número de funciones del NO en sistema nervioso han sido descriptas, que en su mayoría involucran a nNOS como catalizadora. En muchas sinapsis nNOS se encuentra asociada al receptor glutamatérgico NMDA. La entrada de calcio a través de este receptor activa a nNOS. El óxido nítrico contribuye a procesos de plasticidad sináptica a través de LTP en hipocampo (Lu y col., 1999; Bon & Garthwaite, 2001) y amígdala (Lange y col., 2012). La modulación de la actividad eléctrica por la vía del NO se ha observado también en otras áreas, como por ejemplo la *substantia nigra* (Carletti y col., 2009). La proteína post sináptica PSD-95 está involucrada en procesos de plasticidad sináptica. Su sobreexpresión afecta las características morfológicas de las

espinas dendríticas y resulta además en la formación de espinas contactadas por varios axones (espinas multiinervadas). Se ha demostrado que este proceso depende de la interacción entre PSD-95 y nNOS y de la síntesis de NO (Nikonenko y col., 2008). En estrecha relación con el rol del NO en procesos de plasticidad sináptica, se ha demostrado que esta molécula de señalización está involucrada en procesos de aprendizaje dependientes de hipocampo y amígdala, entre otros. Se ha observado en roedores a los que se les ha anulado la expresión de nNOS a través de manipulaciones genéticas (Kelley y col., 2009) o a través del uso de inhibidores de la actividad enzimática (Tan, 2003; Zinn y col., 2009) que estos muestran un defecto en la memoria asociativa, que puede ser revertido administrando un dador de NO (Kelley y col., 2010). Mediante el uso de un inhibidor preferencial de nNOS, 7-nitroindazol (7NI), se ha demostrado que la actividad de nNOS es necesaria para el aprendizaje espacial, evaluado en el laberinto radial de 8 brazos y en el laberinto acuático de Morris (Holscher y col., 1996), observando que los animales tratados con 7NI cometían un mayor número de errores y les llevaba mayor tiempo finalizar el laberinto de 8 brazos, y en el caso del laberinto acuático, la distancia nadada hasta encontrar la plataforma fue mayor.

Se ha descripto la participación de nNOS en la modulación del eje HPA y la liberación de corticosterona. La administración intracerebroventricular de un inhibidor de NOS conduce a un incremento en la expresión del ARNm de CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo, y del de POMC en la pituitaria anterior, y un incremento en los niveles de ACTH en plasma (Givalois y col., 2002) e incrementa la liberación de ACTH y corticosterona en respuesta a un agonista colinérgico (Bugajski y col., 2006). A su vez, una exposición aguda a estrés, así como la administración de una endotoxina (lipopolisacárido bacteriano) estimulan la actividad de NOS en el PVN, evaluada *in vitro* o en cortes histológicos mediante la tinción NADPH diaforasa (Sanchez y col., 1999; Uribe y col., 1999). La modulación del eje HPA por el NO no sólo ocurre a nivel del sistema nervioso central. Se ha demostrado que el NO media la rápida liberación de corticosterona de las glándulas adrenales, estudiado *in vitro* (Mohn y col., 2005).

Dadas las múltiples funciones del óxido nítrico en el sistema nervioso y neuroendócrino, tanto en equilibrio fisiológico como en estados patológicos, se puede

hipotetizar una participación del mismo en situaciones de estrés durante el desarrollo prenatal. Sin embargo, hasta el momento el rol de este neurotransmisor no ha sido estudiado.

Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

El estrés prenatal induce en las crías alteraciones conductuales. Dichas alteraciones se asocian con cambios neuroquímicos relacionados con la producción de óxido nítrico en áreas involucradas en procesos de aprendizaje y memoria. Asimismo, existe mayor vulnerabilidad ante nuevas situaciones de estrés en ratas adultas estresadas prenatalmente.

2.2. Objetivo general

Este trabajo tiene como objetivo general estudiar el rol del óxido nítrico en las alteraciones comportamentales y neuroendócrinas inducidas por estrés durante el desarrollo prenatal. A su vez se propone indagar si existe una mayor susceptibilidad ante nuevas situaciones de estrés en la adultez en animales provenientes de madres estresadas durante la gestación en comparación con las crías de madres que no fueron estresadas.

2.3. Objetivos específicos

1) Evaluar alteraciones conductuales en animales adultos, machos y hembras, estresados prenatalmente.
   1.a) Estudiar la actividad exploratoria.
   1.b) Estudiar el comportamiento de tipo ansiogénico.
   1.c) Estudiar el aprendizaje asociativo.

2) Evaluar desde el destete hasta la adultez si hay diferencias en el peso de las crías del grupo control y las crías estresadas prenatalmente.

3) Determinar secuencialmente desde el nacimiento hasta la etapa adulta alteraciones neuroquímicas relacionadas con la producción de óxido nítrico en el hipocampo e hipotálamo en animales controles y sometidos a estrés prenatal.
   3.a) Estudiar la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa.
   3.b) Determinar la actividad de la proteína kinasa C.
   3.c) Evaluar la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa.

4) Estudiar el rol del óxido nítrico en el aprendizaje asociativo utilizando para ello agentes farmacológicos.

5) Analizar la capacidad de respuesta o susceptibilidad de las crías estresadas prenatalmente frente a nuevas situaciones de estrés determinando la respuesta del eje neuroendócrino.

Materiales y Métodos

3.1. Reactivos y equipos utilizados

ANTICUERPOS
Todos los anticuerpos utilizados son policlonales. Los anticuerpos primarios fueron hechos en conejo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti nNOS (Millipore), anti GR (Santa Cruz Biotechnology), anti corticosterona y anti actina (Sigma-Aldrich). Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti conejo-HRP (Santa Cruz y Abcam) y anti conejo biotinilado (Chemicon).
Se utilizó además streptoavidina-HRP (Jackson Inmunoresearch).

REACTIVOS
Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich: diaminobencidina, 7-nitroindazol, L-NAME, citrulina, NADPH, molsidomine, luminol, S-Ponceau, Tween 20, acrilamida, bisacrilamida, Trizma Base, HEPES, EDTA, seroalbúmina bovina, glicina, L-valina y leupeptina. El paraformaldehido fue manufacturado por Merck. Las sales fueron obtenidas de Anedra, Ciccarelli y Carlo Erba. Los solventes fueron adquiridos de Biopack.
La ketamina, la xilacina y la heparina fueron obtenidas de los laboratorios Holliday-Scott S.A., Richmond Vet Pharma y Veinfar, respectivamente.
La resina AG 50W-X8, el SDS y los marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope utilizados en las electroforesis fueron obtenidos de Bio-Rad.
Los compuestos con marca radioactiva, arginina-^{14}C (actividad específica= 360 mCi/mmol), corticosterona-^{3}H (actividad específica= 62.2 Ci/mmol) y ATP-^{32}P (actividad específica= 3000 Ci/mmol) y el líquido de centelleo Hisafe 2 y Hisafe 3 fueron obtenidos de PerkinElmer.
Otros reactivos que no hayan sido especificados aquí fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

EQUIPOS
Centrífuga refrigerada 5417R (Eppendorf)
Centrífuga para microhematocrito CH24 (Rolco)
Centrífuga concentradora de vacio Centrivap (Labconco)
Centrífuga para RIA Centra 8R (International Equipment Company)
Contador de Centelleo β Tricarb 2800TR (PerkinElmer)
Sonicador 250 (Branson Ultrasonics)
Microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss)
Lector de Placas 3550 (Bio-Rad)
Cuba electroforética Mini Protean III y fuente Powerpack 300 (Bio-Rad)
ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences)

3.2. Descripción del modelo experimental

Con el objetivo de estudiar los efectos del estrés prenatal en la descendencia, se adaptó un modelo de estrés prenatal desarrollado inicialmente por Ward & Weisz, 1984, y ampliamente utilizado durante los últimos 30 años (Maccari y col., 1995; Maccari y col., 2001; Vallée y col., 1999). Se utilizaron ratas de la cepa Wistar exocriadas, de 80-90 días de edad, obtenidas del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

3.2.1. Alojamiento de los animales

Machos y hembras nulíparas en edad reproductora (80-90 días de edad) fueron alojadas en un Bioterio para ratas establecido en la Primera Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Las condiciones de iluminación y temperatura del mismo fueron controladas de manera de mantener un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas (h) y una temperatura de 20-22°C. Una vez en el Bioterio, los animales fueron alojados según su sexo en jaulas de acero inoxidable de 3-4 individuos. Como cama para los animales se utilizó viruta de madera esterilizada, la cual se renovó cada 48 h. Los animales tuvieron libre acceso a alimento balanceado en forma de pellets y agua potable corriente suministrada en botellas con pico de acero inoxidable tipo mamadera. Se mantuvo a los animales al menos 10 días en las jaulas desde su arribo hasta comenzar los apareos, para permitir la habituación de los individuos al nuevo Bioterio, reducir el estrés del traslado y facilitar la sincronización de los ciclos estrales de las hembras.

3.2.2. Apareo

Se diseñaron los apareos en jaulas de barrotes de acero inoxidable, donde se ubicó un macho junto con dos hembras provenientes de la misma jaula. Al día siguiente y los posteriores, se trasladó a las hembras a un laboratorio contiguo y utilizando una pipeta plástica tipo Pasteur cargada con solución fisiológica, se tomaron muestras para realizar un extendido vaginal y determinar la presencia de espermatozoides en las mismas, como así también corroborar el estadio del ciclo de la hembra. Se tomó como día cero de preñez la aparición de espermatozoides en la muestra. Las hembras preñadas fueron separadas de los machos y alojadas en jaulas de acero inoxidable en

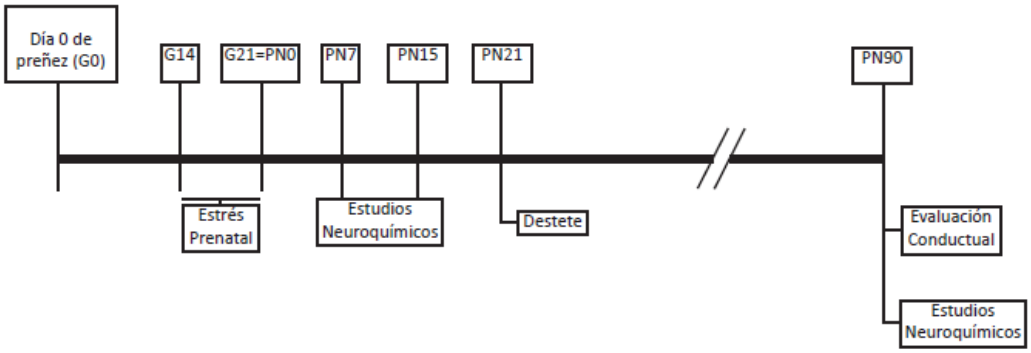
grupos de 3 ó 4 durante los primeros 10 días de gestación. Luego se separaron en jaulas individuales y se asignaron al azar los tratamientos control (C) o estrés prenatal (EP).

3.2.3. Estrés Prenatal

A los 14 días desde la verificación del apareo, designado como día gestacional 14 (G14), las ratas asignadas a estrés prenatal fueron retiradas de sus jaulas y trasladadas a un laboratorio anexo, en el que fueron sometidas a un modelo de estrés prenatal por restricción del movimiento. Las mismas fueron colocadas en cilindros de plástico transparente de 14 cm de largo por 7 cm de diámetro, con aberturas adelante y atrás para facilitar la libre ventilación de la rata. Se realizó este procedimiento tres veces por día, 45 minutos por vez, alrededor de las 9, 12 y 15 h. desde G14 hasta la parición. Una vez que nacieron las crías, las madres ya no fueron manipuladas, con excepción de los cambios de viruta realizados periódicamente. Dos días después del nacimiento (PN2), se controló el peso y número de crías, en caso de que una madre tuviera más de 10 crías las mismas (las excedentes sobre 10) fueron sometidas a eutanasia. Se procedió de esta manera por la necesitad de estandarizar las condiciones de cría y porque las crías de una camada numerosa no se desarrollarían de igual manera que las crías de una camada estándar, llevando a un incremento de la variabilidad de los resultados obtenidos. Se controló además que la proporción de machos y hembras fuera balanceada. Tampoco se utilizaron camadas con menos de 6 crías, dado que podría implicar alguna patología de la madre durante el desarrollo independiente del tratamiento (no se observaron diferencias en el tamaño de la camada o peso de la cría a PN2).

Las crías tanto del grupo control como del grupo estrés prenatal (EP) permanecieron con su madre hasta los 21 días de edad, momento en el cual fueron separadas según su sexo en jaulas de acero inoxidable de 3 a 5 individuos. Entre los 45 y 50 días de edad los animales fueron trasladados a nuevas jaulas de mayores dimensiones, construidas a partir de barrotes de acero inoxidable, y apoyadas sobre bandejas del mismo material. En estas jaulas se mantuvieron hasta ser utilizados para los estudios de comportamiento o hasta la eutanasia. En caso de observar algún individuo con signos de enfermedad, el mismo fue retirado de la jaula y trasladado a una nueva en

cuarentena. Si el mismo no se recuperara a los pocos días, fue sometido a eutanasia mediante la exposición a una cámara en presencia de dióxido de carbono en niveles de saturación. A continuación se esquematiza una línea temporal indicando las distintas manipulaciones experimentales.



3.2.4. Tratamientos farmacológicos

En algunos experimentos se administró a crías de PN7, PN15 y PN90 de ambos sexos, del grupo control y estresadas prenatalmente agentes farmacológicos para modular la vía del óxido nítrico.

Administración de 7-nitroindazol

Se administró 7-nitroindazol (7NI), inhibidor de nNOS, en una dosis de 50 mg/kg. Dado su carácter lipofílico, primero se solubilizó la droga en dimetilsulfóxido (DMSO) resultando en un volumen administrado de este solvente de 170 µl/kg. El volumen administrado se completó con aceite de maní. Las crías de PN7 recibieron un volumen final de 20 µl y las de PN15 40 µl, aproximadamente, por vía oral, dos horas antes de la eutanasia. Los individuos de PN90 recibieron un volumen aproximado de entre 250 µl y 350 µl (según su peso), inyectado por vía intraperitoneal (Bush & Pollack, 2000; Coert y col., 2003).

Administración de molsidomine

Se administró molsidomine (mol), dador de NO, en una dosis de 4mg/kg, disuelto en solución fisiológica (NaCl 0.9% m/v). Este tratamiento se realizó únicamente en individuos adultos, que recibieron un volumen aproximado de entre 250 µl y 350 µl (según su peso), inyectado por vía intraperitoneal (Kelley y col, 2011).

Los individuos que no fueron tratados con el agente farmacológico recibieron una dosis de vehículo (DMSO y aceite de maní o solución fisiológica).

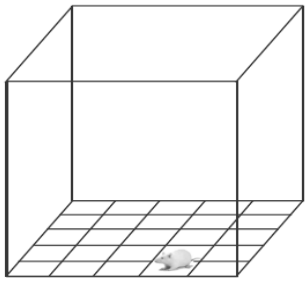
3.3. Estudios de comportamiento

Todos los estudios de comportamiento se realizaron en una habitación delimitada dentro del Bioterio de ratas diseñada específicamente para tal fin, denominada "cuarto de comportamiento". La misma cuenta con un dispositivo controlador de la intensidad lumínica para regular la misma en niveles estables según el ensayo de comportamiento realizado. A la vez cuenta con un extractor que genera un ruido blanco de fondo, para minimizar cualquier perturbación sonora proveniente del exterior. Los estudios fueron realizados entre las 9 y las 13 horas.

3.3.1. Exploración en un campo abierto

3.3.1.1. Descripción de los materiales

Se estudió la actividad exploratoria en ratas macho y hembra de los grupos experimentales control y estrés prenatal en el test de campo abierto (Pawlak & Schwarting, 2002). Para llevar a cabo este test, se utilizó una caja de madera de 50 centímetros (cm) x 50 cm de lado, con paredes de 45 cm de altura. La superficie de la caja está dividida en 25 cuadrados de 10cm de lado cada uno, resultando en una grilla de 5x5. Este grillado permite la cuantificación de la actividad locomotora como "líneas cruzadas" por cada animal durante el tiempo de exposición. A la vez, permite definir el "espacio centro" y "espacio periferia", que se utilizará al cuantificar el tiempo que los animales pasan en el espacio centro, el número de entradas al mismo, y la latencia a la primera entrada al espacio centro. La iluminación de la caja se obtiene a partir de una lámpara atenuada a 2,5 metros (m) de altura medida desde la superficie de la caja. A continuación se muestra un esquema de la caja utilizada.



3.3.1.2. Descripción de la metodología empleada

Antes de cada experimento se acondicionó el cuarto de comportamiento y la caja utilizada para el test de campo abierto. Se retiró cualquier residuo de defecación u orina de la misma y se limpió con un paño de papel embebido en alcohol etílico al 70%, utilizado para enmascarar cualquier clave olfativa que pudiera persistir entre cada animal evaluado.

Luego de acondicionar el cuarto de comportamiento, se trasladaron allí a los animales en su propia jaula para habituarlos. La habituación consiste en dejar a los animales no menos de 20 minutos en la habitación, permitiendo el acostumbramiento a la intensidad lumínica, sonido de fondo y olores que pudieran persistir dentro de la misma.

El experimento comienza cuando se coloca a la rata en una esquina de la caja de campo abierto. Se registra la actividad del animal durante 15 minutos mediante una cámara de filmación Sony. Finalizado el periodo de registro se retorna al animal a su jaula. Entre cada animal se retiran eventuales defecaciones y se limpia la superficie de la caja con alcohol al 70% en agua. Luego de finalizar el registro de los individuos de una jaula, se retorna la misma al Bioterio de ratas y se ingresa la siguiente jaula.

Con el objetivo de estudiar la habituación de la actividad exploratoria de ratas macho y hembra control y EP, a las 24 horas de exponer a cada animal al campo abierto se vuelve a trasladar a los animales al cuarto de comportamiento, repitiendo mismo el procedimiento realizado el día previo.

3.3.1.3. Parámetros evaluados

A partir de los videos registrados se analiza la actividad de las ratas, determinando distintos parámetros, clasificados en dos grupos: actividad exploratoria y comportamiento tipo ansiogénico. Dentro de los parámetros asociados a actividad exploratoria se evalúa la actividad horizontal, correspondiente a las líneas cruzadas por el animal durante su desplazamiento por la caja en los 15 minutos de filmación, y se estudia la actividad vertical cuantificando el número de eventos en los cuales el animal se eleva en sus dos patas traseras (conocido como "*rearing*") ya sea apoyando o no sus patas delanteras en la pared.

En cuanto a los parámetros vinculados a comportamiento tipo ansiogénico, estos se basan en la distinción entre “espacio centro” y “espacio periferia” a la que ya se ha hecho referencia líneas arriba. Evidencias en el estudio del comportamiento de ratas y otros roedores indican que los mismos muestran una preferencia por sitios resguardados frente a sitios expuestos, en los que, en estado natural, podrían presentar el riesgo de ataque de un predador. Trasladado esto al laboratorio y al experimento en cuestión, esto indicaría una preferencia de los animales por la periferia de la caja de campo abierto en relación al tiempo que pasaría en el centro de la caja (Stanford, 2007).

Como parámetros de comportamiento de tipo ansiogénico se evaluó la latencia a la primera entrada al espacio centro, el número de entradas al mismo, y el tiempo total transcurrido allí.

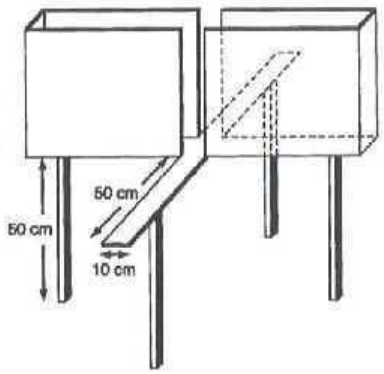
Finalmente, se estudió la memoria de habituación cuantificando los parámetros de actividad exploratoria resultante de exponer a cada rata al campo abierto en una primera sesión de 15 minutos y en una segunda sesión 24 horas después, también de 15 minutos de duración.

3.3.2. Exploración en un Laberinto Elevado en Cruz

3.3.2.1. Descripción de los materiales

Para este experimento se utiliza un laberinto de madera de cuatro brazos perpendiculares ubicado a 50 cm de altura desde el suelo. Dos de los brazos están abiertos, sin paredes que los limiten, y están enfrentados. Los otros dos brazos, también enfrentados, constan cada uno de tres paredes que se elevan hasta 30 cm sobre la superficie. Toda la superficie y las paredes del laberinto están pintadas en negro. Cada brazo tiene una longitud de 50 cm y un ancho de 10 cm. La iluminación del laberinto se obtiene a partir de una lámpara atenuada, a 2,7 m de altura desde la superficie del mismo (Pellow y col., 1985).

A continuación se muestra un esquema del laberinto (figura adaptada de Smith, 2012).



3.3.2.2. Descripción de la metodología empleada

De la misma manera en que fue descripto para el test de campo abierto, antes de comenzar este experimento se acondiciona el cuarto de comportamiento y el laberinto elevado en cruz. A continuación se ingresa a los animales en su jaula dejándolos no menos de 20 minutos antes de comenzar el test. Luego de esta habituación, se toma a un animal y se lo coloca en el centro del laberinto, con el cuerpo direccionado hacia un brazo cerrado (siempre el mismo brazo cerrado para cada animal). Luego de soltar a la rata comienza el experimento. Este finaliza luego de transcurridos 5 minutos. Se registra la actividad del animal mediante una cámara de filmación.

3.3.2.3. Parámetros evaluados

En este test se determina el tiempo absoluto que cada animal pasa en los brazos abiertos ($t_{Brazo\ Abierto}$) y se obtiene el porcentaje de tiempo en brazo abierto como el cociente entre $t_{Brazo\ Abierto}$ y el tiempo total de registro (300 segundos):

$$\% \text{ brazo abierto} = \frac{t_{Brazo\ Abierto}}{300s} \times 100$$

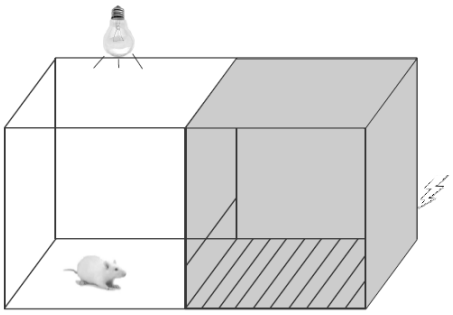
A su vez, se determina el número de entradas realizadas a brazos abiertos durante el tiempo de exposición al laberinto. Se define que una rata entro a un brazo cuando ingresa sus cuatro patas en el mismo.

3.3.3. Ensayo de Evitación Inhibitoria

3.3.3.1. Descripción de los materiales

Se realizó esta prueba en una caja acrílica de 60 cm x 60 cm y de paredes de 37 cm de altura, dividida en dos espacios de iguales dimensiones (60 cm x 29 cm) por una pared que los separa desde el límite superior de la caja hasta 9 cm por sobre la superficie. De esta manera esta delimitación permite el pasaje de las ratas de un espacio al otro. Estos dos espacios se definen según su iluminación y las características de su superficie, de manera que son diferenciados en "espacio iluminado" y "espacio oscuro". El espacio iluminado consta de una superficie lisa de PVC de color blanco, y está iluminado por una lámpara incandescente a 85 cm desde la superficie. El espacio oscuro presenta una superficie de barras de acero inoxidable paralelas, de 3 mm de grosor y separadas 1 cm entre sí. Estas barras tienen la capacidad de conducir corriente eléctrica, de manera que pueden entregar una descarga eléctrica en la planta del pie de un individuo ubicado sobre su superficie. El techo del espacio oscuro impide el paso de la luz, de manera que solo penetra una luz tenue proveniente del espacio iluminado, que ingresa por la comunicación entre los dos espacios.

La caja está conectada a una computadora que permite controlar la intensidad de la descarga eléctrica, el registro de tiempo desde que empieza cada ensayo, y además permite controlar la entrega de la descarga eléctrica de forma manual, mediante un software diseñado *ad hoc* (Sakamoto y col., 2004). A continuación se muestra un esquema del aparato utilizado.



3.3.3.2. Descripción de la metodología empleada

3.3.3.2.1. Habituación de los animales a la manipulación

Previamente al experimento propiamente dicho, se habitúa a las ratas a la manipulación. Dado que en este experimento no se introduce la jaula completa de los animales en el cuarto de comportamiento, para evitar que las vocalizaciones de las ratas al recibir la descarga eléctrica puedan influir en las otras ratas, se habitúa a las mismas a ser sujetadas con un paño que impide la visión del roedor y que ayuda a trasladarlas hasta la caja de evitación inhibitoria minimizando la perturbación de la rata. Esta habituación se realiza una vez por día entre 1 y 2 minutos, durante los 3 días previos al ensayo, evaluando cualitativamente la respuesta de la rata a la manipulación, de manera de poder discriminar animales que se muestren hiperactivos ante la manipulación, señal de disconfort. Se evalúa positivamente a su vez una progresiva disminución de la actividad de la rata ante el manipuleo.

En los experimentos en los que se realizó un tratamiento farmacológico de los animales mediante inyección intraperitoneal de agentes químicos o vehículo, los mismos fueron habituados además a este procedimiento. Esta habituación consiste en inyectar vehículo (solución fisiológica) por vía intraperitoneal tres días consecutivos, siendo el cuarto día el comienzo del experimento propiamente dicho.

3.3.3.2.2. Experimento

Este experimento se fundamenta en un modelo de condicionamiento clásico. El objetivo del mismo es que la rata aprenda a asociar un contexto particular a un evento aversivo, evaluándose como aprendizaje la evitación de la rata a ingresar al sitio asociado al evento aversivo.

El experimento se divide en dos días, el día de la adquisición y el día de evaluación de la retención de la nueva memoria adquirida. En el primer día se realiza primero una habituación de cada rata a la caja de evitación inhibitoria. Se cierra previamente la conexión entre el compartimiento iluminado y el oscuro y se limpia los mismos con alcohol etílico al 70%. Para la habituación se traslada a la rata en el paño hasta el cuarto de comportamiento y se la coloca en el espacio iluminado, dejándola explorar durante 30 segundos. Luego se toma a la rata y se la coloca en el espacio oscuro por otros 30 segundos. Finalmente se regresa a la rata a su jaula en el Bioterio. Entre

animal y animal se limpia ambos compartimientos según lo detallado. En el caso de las hembras, dado que en la puesta a punto del ensayo mostraron porcentajes de aprendizaje menores a los machos, se incrementó el tiempo de la habituación a 2 minutos por compartimiento.

Una hora después de la habituación se realiza el ensayo de adquisición. Para eso se retira previamente la pared que separa los compartimientos habilitando la libre circulación entre ambos. Se toma con el paño a la rata, se la traslada al cuarto de comportamiento y se la coloca en el espacio iluminado, enfrentando la pared opuesta al espacio oscuro. Cuando la rata pasa con sus cuatro patas al espacio oscuro se cierra la conexión entre ambos y se entrega mediante la computadora una descarga de 1,2 miliampere (mA) durante 3 segundos. La rata permanece por 30 segundos en el espacio oscuro cerrado, luego de lo cual se la retira y retorna a su jaula.

Al día siguiente del ensayo de adquisición se realiza el ensayo de retención. Para esto se acondiciona la caja de comportamiento de igual manera que para el ensayo de adquisición. Se toma a la rata con el paño y se la traslada al cuarto de comportamiento, colocándola en el espacio iluminado enfrentando la pared opuesta al espacio oscuro. Una vez que la rata cruza al espacio oscuro o luego de 5 minutos en caso de que no cruce al espacio oscuro, termina el ensayo.

3.3.3.3. Parámetros evaluados

Se determina el tiempo que cada rata tarda en cruzar al compartimiento oscuro el día de la adquisición (T1), al cual es denominado “latencia de adquisición” y el día del test de retención (T2) (“latencia de retención”). Para comparar entre grupos experimentales se utiliza la latencia de retención expresada en segundos.

3.4. Determinaciones fisiológicas y neuroquímicas

Dentro de las determinaciones fisiológicas se describen las técnicas y procedimientos que no implican necesariamente la aplicación de eutanasia de los animales.

Para todas las determinaciones neuroquímicas (excepto las técnicas histológicas) se llevó a cabo la eutanasia de los animales por medio de decapitación utilizando una guillotina para ratas. Debido a que el uso de sustancias químicas podría interferir con los parámetros luego estudiados, no se aplicó ningún tipo de agente anestésico a los

animales. La práctica se realizó minimizando el estrés de los animales. Luego de la disección y obtención de los tejidos, hipocampo e hipotálamo, se pesaron y se almacenaron los mismos a -70°C hasta su uso.

3.4.1. Determinación de la ganancia de peso

Se determinó el peso de las crías macho y hembra de los grupos control y EP desde el día de destete (día 21 postnatal) hasta los 90 días de edad postnatal. Se obtuvo por cada camada el peso promedio de los machos y de las hembras, de manera de evitar el trabajo con pseudoréplicas.

3.4.2. Medición de los niveles de corticosterona en plasma

3.4.2.1. Obtención de la muestra

Con el fin de determinar los niveles de corticosterona en plasma de ratas hembra y macho de los grupos control y EP, se obtuvieron muestras de sangre de los animales. Dado que para este experimento se trabajó en animales de 7 y 90 días postnatales, se varió la metodología de extracción, dadas las limitaciones que impone el trabajo con animales de poca edad. En el caso de las crías de PN7, se obtuvo sangre troncal por decapitación del animal, resultando en la eutanasia de la cría. La sangre fue recolectada en un tubo tipo eppendorf heparinizado. Luego se centrifugaron las muestras a 3000 g por 10 minutos, separando el plasma y trasladándolo a un nuevo tubo. En el caso de los animales de PN90, se realizó una pequeña incisión en la punta de la cola y se recolectó la sangre en tubos capilares heparinizados hasta llenarlos. Los capilares fueron sellados y centrifugados en una centrífuga para microhematocrito CH24 (Rolco) a 3000g por 10 minutos. Se cortó cada capilar a la altura de la interfase sangre-plasma, y se tomó el plasma con una pipeta, almacenándolo a -70°C hasta su uso.

3.4.2.2. Extracción de la corticosterona

De cada muestra de plasma se tomaron 30 µl y se trasladaron a un tubo de vidrio cónico. Se le agregó al mismo 170 µl de solución tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0.1 M y seroalbúmina bovina (BSA) 0.1% (m/v). A continuación se le agregó 300 µl de diclorometano, se agitó unos segundos y se dejó reposar 2 minutos (se repitió el paso de agitación tres veces). Luego se tomó la fase orgánica con una pipeta y se la trasladó

a un nuevo tubo cónico. A este se agregó 300 µl de diclorometano y se repitió el procedimiento anterior, obteniendo una fase orgánica con un segundo paso de purificación. A esta fase orgánica se la traslada a un tubo KHAN, para luego evaporar el solvente orgánico. Para esto se utilizó una centrífuga de vacio centrivap®. En 5 minutos se logra evaporar todo el solvente, obteniendo el tubo seco, con la corticosterona pegada al vidrio. El mismo se puede conservar a -20°C.

3.4.2.3. Radioinmunoensayo de corticosterona

El objeto de la técnica es estimar la cantidad de corticosterona en una muestra evaluando el desplazamiento en la unión entre el anticuerpo anti corticosterona y la corticosterona radiactiva (en este caso se usó corticosterona tritiada <^{3}H-corticosterona>).

3.4.2.3.1. Preparación de la muestra

Se toman los tubos KHAN en los que se había evaporado el diclorometano y se resuspende la muestra en 100 µl de tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0.1 M y seroalbúmina bovina (BSA) 0.1% (m/v), a partir de ahora, referida como "solución de ensayo". A partir de la muestra resuspendida se llevó a cabo una dilución en solución de ensayo, volumen final 100 µl, en volúmenes previamente puestos a punto. En general, para machos en condiciones basales se usaron 50 µl de la muestra, mientras que en machos sometidos a estrés agudo se utilizaron 25 µl de la muestra.

3.4.2.3.2. Preparación de la curva estándar

Para poder obtener una determinación aproximada de la concentración de corticosterona en la muestra, es preciso realizar una curva de concentraciones conocidas de corticosterona. Para ello se preparó una solución madre de 100 µg/ml de corticosterona en etanol absoluto, la cual luego se diluyó 1/100 en etanol absoluto, y luego en solución de ensayo hasta obtener concentraciones entre 125 pg/100 µl y 2000 pg/100 µl. Además se preparó un tubo sin corticosterona, sólo con solución de ensayo (B_0).

3.4.2.3.3. Experimento

El experimento comenzó cuando se agrega el anticuerpo anti corticosterona (500 µl, diluido en solución de ensayo según puesta a punto realizada en cada nuevo lote) a

cada muestra, a la curva y al B_0 (tubo sin corticosterona). Se mezcló con un agitador y se lo incubó una hora a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C). Luego se agregaron 100 µl de ^{3}H-corticosterona diluida a partir de la madre de 1 µCi/µl aproximadamente 1:10000 (esta dilución varía de experimento a experimento, el objetivo es obtener una cantidad suficiente para que la actividad total sea de 8000 cuentas por minuto <cpm>). Luego se agitó e incubó durante una hora en heladera a 4°C. A continuación se agregaron 200 µl de una solución a 4°C de carbón-dextrano 5 mg (de cada reactivo)/ml de solución de ensayo y se agitó, colocando luego a los tubos en hielo por 10 minutos. Finalmente se centrifugó durante 15 minutos a 2000g y se volcó el sobrenadante en un tubo de plástico. A este tubo se le agregó líquido de centelleo Hisafe 3, se tapó los tubos y contó en un contador de centelleo liquido β. (Mohn y col., 2011).

3.4.2.3.4. Análisis de los datos

Los valores de cuentas por minuto que se obtienen del contador de centelleo son transformados a desintegraciones por minuto (dpm) utilizando el dato de la eficiencia del contador para el tritio (depende de cada contador y lo informa el equipo). Luego se calculó el porcentaje de unión (%unión), como el cociente entre las dpm obtenidas para cada tubo (B) y las dpm del B_0, multiplicado por 100. Para realizar la regresión lineal con los datos de la curva standard, se utilizó el método de linealización LOGIT que implica aplicar la siguiente fórmula: LOGIT = LN(%unión/(100-%unión)). Se obtiene además el logaritmo de la masa de corticosterona (LOG masa) de cada punto de la curva (expresada en picogramos) y se grafica LOGIT en función de LOG masa. El ajuste lineal devuelve la ecuación de donde se interpolan los datos transformados a porcentaje de unión, aplicando el antilogaritmo para obtener valores de masa de corticosterona expresada en picogramos. Luego se aplican los factores de dilución pertinentes para cada muestra para obtener los valores presentes en la muestra extraída y resuspendida.

Ecuaciones utilizadas:

%unión = $(B/B_0)*100$

LOGIT = Ln (%unión/(100-%unión))

Interpolación = EXP(2,306*(LOGIT-ordenada al origen)/pendiente)

3.4.3. Actividad enzimática de la NOS

El objetivo de esta técnica es estimar la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa utilizando como sustrato arginina con marca radioactiva. Como fue detallado en la Introducción, esta enzima cataliza la síntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina, generando como subproducto L-citrulina en cantidad equimolar. Por lo tanto el fundamento de esta técnica es utilizar la NOS endógena para sintetizar ^{14}C-L-citrulina a partir de ^{14}C-L-arginina, aislar una de la otra utilizando un método de separación, y determinar la radioactividad de la ^{14}C-L-citrulina como una medida del nivel de óxido nítrico. (Bredt & Snyder, 1989; Zorrilla Zubilete y col., 2005).

3.4.3.1. Descripción de la metodología empleada

Se homogeneizó el tejido en 500 µL de solución tampón Hepes 20mM pH 7.4, Valina 50 mM e inhibidores de proteasas: dithiothreitol (DTT) 1 mM, leupeptina 1 µM y parametil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 0,2 mM. Luego se dividió el volumen en dos tubos eppendorf y se agregó a uno de ellos 250 µL Ca^{2+} 4 mM (en igual solución tampón) para evaluar la actividad total. Al otro se le agregaron 250 µl de EDTA-EGTA 2 mM para evaluar la actividad independiente de calcio (iNOS) o 250 µl de solución con L-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) 2 mM, un inhibidor de todas las isoformas de NOS. Se preparó además un tubo con 500 µl de la misma solución de homogenato sin tejido, para evaluar actividad inespecífica. Se agregó además NADPH 1 mM, cofactor de la NOS. Finalmente se agregaron 10 µl de ^{14}C-L-arginina (0,5 µCi) (Perkin Elmer). A continuación se incubó por 30 minutos en una estufa 5% CO_2 en O_2 a 37°C. Se detuvo la reacción colocando los tubos en hielo y centrifugando 10 minutos a 10000g. Luego se sembraron los sobrenadantes en columnas obturadas con algodón, a las cuales previamente se les había agregado 0.4 cm^3 de resina de intercambio catiónico AG 50W-X8 (Bio-Rad), se habían equilibrado con 3 ml de Hepes 20 mM, DTT 1 mM y añadido 20 µl de L-citrulina 200 mM para saturar posibles sitios de unión inespecífica de citrulina. Se recogió el eluato en tubos de plástico y se eluyó además agregando 2 mL de agua bidestilada. Del eluato se tomaron 250 µl y se le agregó 1 ml de líquido de centelleo Hisafe 2. Luego se colocaron los tubos en un contador de centelleo β y se obtuvieron las desintegraciones por minuto (dpm).

3.4.3.2. Análisis de los datos

Las desintegraciones por minuto (dpm) de cada muestra fueron convertidas a picomoles utilizando el dato de la actividad específica de la ^{14}C-L-arginina utilizada. Se multiplicó por los factores de dilución aplicados (x20). Luego el valor obtenido se dividió por el peso del tejido expresado en mg. Entonces se expresan los datos como pmol^{14}C-L-citrulina/mg tejido/30 minutos de reacción.

3.4.4. Actividad enzimática de PKC

El objetivo de esta técnica es estimar la actividad enzimática de la proteína quinasa PKC utilizando como sustrato adenosina trifosfato (ATP) con marca radioactiva y la histona H1.

Para ello se homogeneizó el tejido en 500 µl de una solución tampón de Pipes 20 mM pH 7.4, 2-β-mercaptoetanol 10 mM, EGTA 4mM, EDTA 2mM e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM y leupeptina 0.1 µM) utilizando un homogenizador de teflón. Luego se agregaron 1.5 ml más de esa solución y se centrifugó a 10000g por 30 min a 4°C. Se separó el sobrenadante (fracción citosólica) y se resuspendió el precipitado en 1 ml de la misma solución de homogenato, pero con el agregado de tritón 0.4%. El precipitado se mantuvo en hielo por 30 min, mezclando cada 5 min. Luego se agregó 1 ml de solución de homogenato y se centrifugó a 10000g por 30 min a 4°C. El sobrenadante corresponde a la fracción de membrana. Las fracciones se sembraron en columnas de dietilaminoetil (DEAE) celulosa-52 para purificar la enzima proteína kinasa C (PKC). Luego se lavó cada columna con 6 ml de solución Hepes 5 mM 2-β-mercaptoetanol 10 mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, NaCl 20 mM. Finalmente se eluyó con 2 ml de solución Hepes 5 mM, 2-β-mercaptoetanol 10 mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, NaCl 120 mM. Se utilizó esta fracción para ensayar la actividad de PKC.

Se evaluó la actividad de PKC como la incorporación de ^{32}P de ^{32}P-γ-ATP en histona H1. Se realizó la determinación en un volumen final de 85 µl de una solución de ATP (0.4 µCi) 25 µM, 2-β-mercaptoetanol 5 mM, 50 mg histona H1, 20 µM HEPES (pH 7.4), $CaCl_2$ 0.2 µM y vesículas de fosfatidilserina (10 mg/ml). La actividad inespecífica fue determinada en tubos sin $CaCl_2$ ni vesículas de fosfatidilserina y con el agregado de EGTA 22 mM. Luego de 30 min de reacción se detuvo el experimento agregando 3 ml de ácido tricloroacético 5% y H_3PO_4 10 mM en hielo. Luego el contenido de los tubos

fue filtrado con papel de filtro mediante una bomba de vacío. Se colocó cada filtro en un tubo, se agregaron 2 ml de líquido de centelleo y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo β. (Genaro & Bosca, 1993; Zorrilla Zubilete y col., 2005).

3.4.5. Determinación de los niveles de proteínas: Electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunodetección

Se homogeneizaron los tejidos en una solución tampón de Hepes 25 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 6 mM e inhibidores de proteasas: DTT 1 mM, leupeptina 1 µM y PMSF 0,2 mM. Se sonicó el tejido en tubos eppendorf de 1.5 ml y luego se centrifugó a 10000g durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C. Se trasladó el sobrenadante a un nuevo tubo. El precipitado se resuspendió en solución de homogenato, fue agitado vigorosamente y centrifugado a 10000g por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante y se lo juntó con el primer sobrenadante. Se separó una alícuota para determinar proteínas por el método de Bradford. Se conservaron los tubos en hielo hasta continuar con el procedimiento.

Para realizar la determinación de proteínas se tomaron 5 µl de muestra y se los colocó en una policubeta de 96 pocillos. Además se preparó una curva standard con albúmina bovina. Se agregaron 250 µl de reactivo de Bradford, se agitó, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se determinó la absorvancia a 595 nm en un lector de placas.

Luego se realizó la desnaturalización de la muestra. Para ello se le agregó a las muestras de proteínas una solución tampón de Tris-HCl 50 mM pH 6.8, glicerol 10 %, SDS 1 %, azul de bromofenol 0.05% y 2-β-mercaptoetanol 140 mM en cantidad suficiente para diluir las proteínas determinadas a 10 µg/µl y se las hirvió durante 3 min, luego se transfirió los tubos rápidamente a hielo.

Se sembraron las muestras junto a marcadores de peso molecular conocido en geles de SDS- poliacrilamida al 7.5%, realizando la electroforesis en una solución tampón de Tris 25 mM pH 8.3, glicina 0.192 M, y SDS 0.1% mediante una cuba miniprotean III (Bio-Rad) conectada a una fuente a 100 volts (V) durante 2 h aproximadamente, hasta observar una buena resolución en los marcadores de interés.

Una vez finalizada la corrida electroforética, se transfirieron las proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante un Mini Transblot III (Bio-Rad) en una solución tampón de Tris 25 mM pH 8.3, glicina 0.192 M y metanol 20%, a

100 V durante 75 min. Finalizada la electrotransferencia, se verificó la presencia de proteínas en las membranas mediante una tinción con S-Ponceau 0.1%. Se enjuagaron las membranas con agua para retirar el colorante y se bloquearon sitios inespecíficos de unión del anticuerpo durante 2 h a temperatura ambiente con agitación orbital mediante una solución de leche descremada 5% y gelatina 1% en Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM (TBS). Se descartó la solución de bloqueo, se lavó durante 45 minutos con 4 cambios de solución tampón de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y Tween 0.1% (TTBS) y se incubó con anticuerpos primarios (anti nNOS 1:1000, anti GR 1:200 ó anti actina 1:500) hechos en conejo, diluidos en una solución de TTBS y albúmina sérica bovina al 0.02% m/v durante 16h a 4°C. A continuación se removió la solución de anticuerpo y se lavó durante 45 minutos con 4 cambios de TTBS. Se incubó 2 h con una solución de anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a la peroxidasa de rabanito (HRP) a temperatura ambiente y agitación orbital. Luego se removió la solución y se lavó con TTBS por 45 minutos con 4 cambios de solución.

El revelado se lleva a cabo incubando las membranas en una solución de Tris 1 M pH 8.5, luminol 1.25 mM, ácido p-cumárico 0.2 mM y agua oxigenada (30 volúmenes) 0.015% v/v durante 2 minutos. Luego se colocaron las membranas en un equipo ImageQuant (GE) equipado con una cámara digital que adquiere fotogramas en una progresión temporal preestablecida y acumulativa. Se cuantificó la densidad óptica de las bandas obtenidas mediante el software ImageJ. Se expresaron los resultados como densidad óptica de la proteína de interés relativizada a la densidad óptica de la actina. (Laemmli y col., 1970; Maur y col., 2012).

3.4.6. Histología

3.4.6.1. Fijación y obtención de cortes histológicos

Para obtener las muestras para las distintas técnicas realizadas, primero se anestesió a las ratas (machos y hembras) de los grupos control y EP utilizando una mezcla de ketamina (anestésico disociativo) 50 mg/kg de peso y xilacina (analgésico sedante) 6.67 mg/kg dosificadas mediante inyección intraperitoneal. Una vez corroborada la falta de reflejo de la rata se procedió a su operación, exponiendo el corazón. Se inyectó en el ventrículo izquierdo 500 unidades de heparina sódica. Unos segundos después se realizó una incisión en la aurícula derecha y se inyectó solución Ringer

lactato (300 ml/kg) a través del ventrículo izquierdo para lavar el sistema circulatorio de la rata y evacuar toda la sangre. Luego se inyectó solución fijadora de paraformaldehido 4% en solución tampón de fosfato (PB) 0,1 M pH 7.4 (300 ml/kg). Finalmente se cortó la cabeza, el cráneo y se extrajo el cerebro intacto. El mismo fue incubado 3 horas a 4°C en la misma solución de paraformaldehido 4%, luego de lo cual se le realizaron 3 lavados de 30 minutos en solución tampón fosfato 0.1M, NaCl 0.01M (PBS) pH 7.4 y finalmente se los conservó en la misma solución hasta realizar los cortes histológicos.

Previamente a realizar los cortes, se incubaron los tejidos en sacarosa 5% m/v en solución tampón fosfato durante 3 horas y luego en sacarosa 30% m/v en solución tampón fosfato por 36 horas para la crioprotección. Luego de esas 36 horas se congeló el tejido sobre una platina enfriada con hielo seco en metanol y se realizaron cortes de 30 µm de grosor utilizando un micrótomo de deslizamiento. Los cortes fueron lavados con PBS y conservados en policubetas de 12 pocillos en PBS con azida al 0,01% m/v hasta su uso. (Canzobre & Ríos, 2010).

3.4.6.2. Tinción de NADPH diaforasa

Esta técnica histológica se basa en la actividad deshidrogenasa que presenta la enzima NOS. En tejidos fijados con paraformaldehido la enzima cataliza la conversión de NADPH a NADP (el NADPH es uno de los cofactores necesarios para la actividad catalítica de esta enzima), que en presencia de nitro-blue tetrazolium (NBT) forma un complejo azul que precipita en el sitio de la reacción enzimática. Esta marca azulada se toma como parámetro de actividad enzimática de NOS.

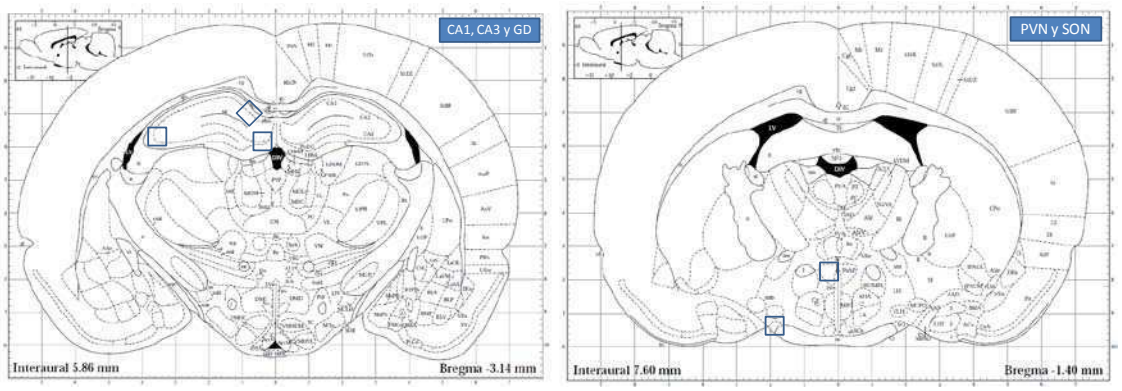
3.4.6.2.1. Descripción de la metodología empleada

Una vez seleccionados los cortes, se los colocó en una policubeta de 24 pocillos, cada individuo en un pocillo, en solución salina tampón de Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M (TBS). Se descartó esa solución y se agregó una solución de NADPH 1 mg/ml, NBT 0,2 mg/ml, tritón X-100 (tx) 0,3% v/v en PB 0.1 M (450 µl por pocillo) y se incubó en estufa a 37°C por 40 minutos, hasta que se observó en lupa que hay precipitado azulado. Para finalizar la reacción se descartó la solución con una pipeta y se lavó dos veces con TBS y luego con agua bidestilada. Finalmente se montaron los tejidos en portaobjetos de

vidrio, se secaron en estufa y se montó el cubreobjeto con bálsamo Permount® mounting medium (Fisher Scientific).

3.4.6.2.2. Adquisición de las fotomicrografías y análisis morfométrico

Los preparados correspondientes a cortes transversales del hipocampo e hipotálamo fueron observados a una magnificación de 200x y 100x respectivamente, mediante un microscopio Axiophot de Zeiss, y luego fueron tomadas las fotomicrografías mediante una cámara digital Olympus Q-color 5, cada una con los mismos parámetros de iluminación y exposición. Luego se realizó el análisis morfométrico utilizando el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Springs, MD). Para comenzar, se convirtieron las imágenes a una escala de grises de 8 bits. Se calibró el nivel de blanco y negro (de 255 a 0) considerando la distribución de frecuencias de las intensidades en las fotomicrografías (Fosser y col., 2005). Luego en cada imagen se obtuvo el área, densidad óptica y la densidad óptica integrada (que integra densidad óptica y área de cada objeto). Se cuantificó el número de células en CA1, CA3 y Giro Dentado (GD) con un nivel de intensidad de marca evidentemente superior al fondo o inespecífico, las cuales fueron calificadas como positivas para NADPH diaforasa. En el caso de las determinaciones en el núcleo paraventricular del hipotálamo, se determinó la densidad óptica integrada (DOI), parámetro que resulta del producto entre el área del objeto marcado y la intensidad promedio de la marca (Canzobre & Ríos, 2011). A continuación se ejemplifica en figuras adaptadas del atlas "*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*" (Paxinos & Watson, 1997) las áreas fotografiadas.



3.4.6.3. Inmunotinciones

Con el fin de evaluar la expresión de distintas proteínas en cortes histológicos de hipocampo en ratas macho y hembra de los grupos experimentales C y EP, se realizó un protocolo de inmunotinción con anticuerpos primarios específicos.

3.4.6.3.1. Descripción de la metodología empleada

Se seleccionaron los cortes a utilizar y se colocaron en una policubeta de 24 pocillos en TBS. Se realizó un protocolo de inhibición de peroxidasas endógenas, para reducir el nivel de marca inespecífica al momento de revelado, ya que se utilizó el sistema de peroxidasa de rabanito (HRP). Este proceso consistió en agregar a los tejidos metanol al 20% v/v en TBS por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se descartó ese volumen y se lavó con TBS. A continuación se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos utilizando una solución de Suero Normal de Cabra al 5% v/v y tritón X-100 v/v al 0,5% en TBS en agitación a 4°C durante 3 horas. Luego se descartó esa solución y se agregó el anticuerpo primario policlonal (anti nNOS conejo 1:400 en Suero Normal de Oveja al 5% v/v, tritón X-100 al 0,5% v/v y azida al 0.01% m/v en TBS (Millipore) o anti GR conejo 1:200 (Santa Cruz) en igual solución) incubando por 72 horas en el caso de nNOS o 48 horas en el caso de GR. Se retiró la solución de anticuerpo y se lavó 3 veces con TBS 20 minutos por vez. A continuación se agregó el anticuerpo secundario biotinilado anti conejo 1:2000 (Chemicon) diluido en Suero Normal Bovino al 5% v/v, tritón X-100 al 0,5% v/v y azida al 0.01% m/v en TBS y se incubó 24 horas en agitación a 4°C. Finalmente se recuperó el anticuerpo secundario, se lavó 3 veces con TBS 20 minutos por vez y se añadió una solución de streptoavidina acoplada a la enzima HRP (Jackson Immunoresearch) 1:1000 en TBS, incubando por 3 horas en agitación a 4°C. Se Lavaron los cortes tres veces con TBS y una vez con una solución tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 6 por 10 minutos, se agregó una solución de 3,3 diaminobencidina 0,05% m/v (sigma, St Louis, MO), sulfato de níquel amonio al 4% m/v (Baker) en la misma solución tampón de acetato de sodio y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se agregó agua oxigenada al 0.01%, dando inicio a la reacción. La enzima HRP utiliza como sustrato al agua oxigenada, formando radicales que atacan a la diaminobencidina, formando un precipitado en el sitio donde está presente la enzima (y por lo tanto, si la unión fue específica, el antígeno de interés <nNOS o GR>),

precipitado que en presencia de sulfato de níquel toma un color azulado oscuro. Se detuvo la reacción añadiendo agua corriente, luego se lavó con TBS y finalmente con agua bidestilada, para proceder a montar los tejidos en portaobjetos de vidrio. Luego del montaje, se secaron los cortes en estufa y se montó el cubreobjeto con bálsamo Permount®.

3.4.6.3.2. Adquisición de las fotomicrografías y análisis morfométrico

Los preparados correspondientes a cortes transversales del hipocampo fueron observados a una magnificación de 200x, fotografiados y procesados de la misma manera que lo descripto para la tinción de NADPH diaforasa. En el caso del análisis de GR, se tomó como parámetro la densidad óptica integrada, obteniendo la suma total de DOI de las células positivas para GR en cada fotomicrografía. Se procedió de esta manera debido a que el elevado número de células que expresa esta proteína dificulta su individualización automatizada mediante software. Al utilizar la sumatoria de DOI del preparado en lugar del conteo total de células se independiza del hecho de que el programa haya confundido dos células positivas con una sola del doble de DOI. (Canzobre & Ríos, 2010).

3.5. Análisis estadístico

Previo a cada análisis estadístico, se comprobó el cumplimiento de los supuestos correspondientes al mismo. En caso de que el supuesto de homogeneidad de varianzas no se cumpliera, los datos fueron transformados (la transformación aplicada está detallada en la sección correspondiente a ese experimento). En el caso de que el supuesto de normalidad (la distribución de probabilidades de los datos debe aproximarse a una distribución normal, o gaussiana) no se cumpliera, se utilizó el correspondiente test no paramétrico (no asume una distribución normal). Para el caso de los experimentos que involucraron el uso de un ANOVA de dos o tres vías con medidas repetidas, si no se cumpliera el supuesto de esfericidad (la misma varianza de la diferencia para todos los pares posibles de medidas repetidas), se utilizaron los grados de libertad corregidos por el coeficiente de Huynh-Feldt, proporcionados por el programa de análisis estadístico SPSS.

Para evaluar diferencias entre dos grupos se utilizó el test t de student. Para análisis que comprendieran más de dos grupos, se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, utilizando a posteriori como test *post hoc* el test de Tukey.

Para los ensayos analizados mediante ANOVA de dos o tres vías, si la interacción entre factores resultó significativa, se realizó el correspondiente análisis de efectos simples, comparando los niveles de un factor en cada uno de los niveles del otro factor. En dicho caso, para la comparación entre los distintos tratamientos para cada tiempo, se deben recalcular los grados de libertad (GL) y cuadrados medios (CM). Para el ANOVA de medidas repetidas se definen dos errores, uno corresponde a los individuos anidados a cada tratamiento (E1), que mide la variabilidad en la respuesta promedio a lo largo del tiempo entre individuos sometidos a un mismo tratamiento, y sirve para poner a prueba el efecto del factor entre (tratamiento). El otro error (E2) mide la interacción entre medidas repetidas e individuos (en cada tratamiento), es decir si la tendencia en el tiempo es diferente entre individuos del mismo tratamiento, y sirve para poner a prueba el efecto del factor dentro (medidas repetidas e interacción entre tratamiento y medidas repetidas). El cuadrado medio dentro (CMd) se recalcula mediante la siguiente fórmula:

$$CMd = \frac{SC_{E1} + SC_{E2}}{GL_{E1} + GL_{E2}}$$

Dónde SC_{Ei} = suma de cuadrados correspondiente al error “i” y GL_{Ei} = grados de libertad correspondientes al error “i”.

los grados de libertad dentro (GLd) se calculan mediante la siguiente fórmula:

$$GLd = \frac{(SC_{E1} + SC_{E2})^2}{SC_{E1}^2/GL_{E1} + SC_{E2}^2/GL_{E2}}$$

Para la comparación entre tiempos dentro de cada tratamiento se utilizó el E2 proporcionado por el ANOVA.

Para cada análisis estadístico se consideró que las diferencias resultaron significativas si el p-valor resultó menor a 0.05.

Resultados

4.1. Estudios de comportamiento

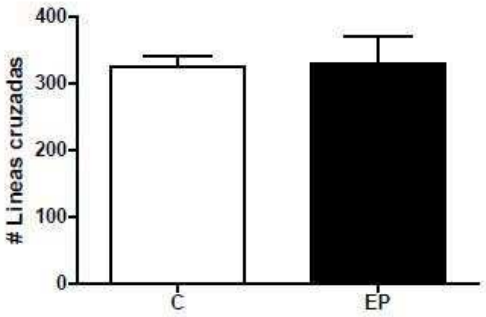
4.1.1. Exploración en un campo abierto

Se estudió la actividad exploratoria en ratas macho y hembra de los grupos experimentales control y EP en el test de campo abierto.

Parámetros vinculados a actividad exploratoria

Se determinó la actividad exploratoria (líneas cruzadas y exploraciones verticales) en machos de 90 días de edad en un test de campo abierto. Se compararon los resultados correspondientes al parámetro número de líneas cruzadas mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney, debido a que no se cumplió el supuesto de normalidad. No se encontraron diferencias entre los tratamientos (Figura 3A, U=38, no significativo <NS>). En cuanto al parámetro exploraciones verticales, tampoco se encontraron diferencias entre los animales del grupo C y el grupo EP. Para el análisis estadístico se utilizó el test t de Student (Figura 3B, $t_{14;0.05}$=1.474, NS). Los resultados para los distintos parámetros evaluados se grafican a continuación (Figura 3).

A



B

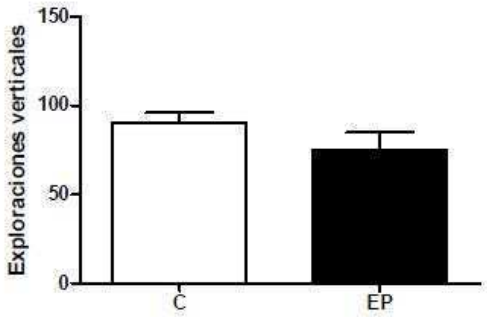


Figura 3: evaluación de la actividad exploratoria en machos
La figura muestra los resultados del test de campo abierto para los parámetros número de líneas cruzadas (A) y exploraciones verticales (B), determinados para cada individuo en una exposición de 15 minutos de duración. Se grafican las medias de cada grupo con su correspondiente error estándar (media ± EE). N=7-11 animales por grupo.

Parámetros vinculados al comportamiento tipo ansiogénico en machos

Se evaluó el número de incursiones que cada animal realizó al centro del campo abierto, la latencia a la primera incursión y el tiempo transcurrido en el centro del campo abierto. Se compararon los grupos C y EP mediante un test t de student. Para el caso de los parámetros tiempo en el centro y latencia al centro se utilizó el test de Mann Whitney (la distribución de probabilidades de la variable respuesta no ajustó a una distribución normal). No se observan diferencias entre los grupos en los parámetros evaluados (incursiones al centro: figura 4A, $t_{16;0.05}$=1.278, NS; latencia al centro: figura 4B, U=37, NS; tiempo en el centro: figura 4C, U=24.5, NS). Los resultados se grafican a continuación (figura 4).

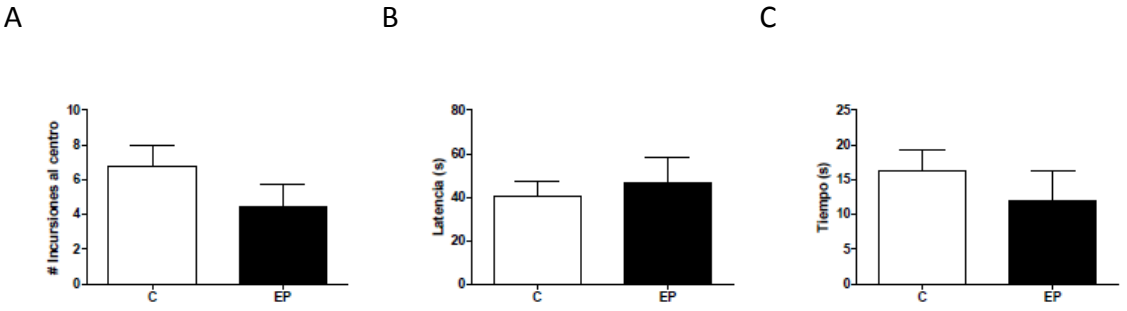


Figura 4: Evaluación del comportamiento tipo ansiogénico en machos
La figura muestra los resultados de la determinación del número de incursiones al centro (A), la latencia a la primera entrada al centro, expresada en segundos (s) (B) y el tiempo transcurrido en el centro del campo abierto (C) para los grupos control y EP. Las barras representan la media ± EE. N=7-11 animales por grupo.

Evaluación de la memoria de habituación en machos

Se estudió la expresión de una memoria de habituación en machos de los grupos C y EP, evidenciando esta memoria como una disminución de la actividad exploratoria en una segunda exposición al campo abierto 24 horas después de la primera. Se compararon los grupos C y EP mediante un ANOVA de dos vías con medidas repetidas. Al analizar el parámetro líneas cruzadas (figura 5A) se observa un efecto del factor tiempo ($F_{1,16}$=15.26; p=0.0013), indicando que los animales se habituaron al campo abierto, pero no se observa efecto del tratamiento ($F_{1.16}$=0.025; NS) ni interacción

($F_{1.16}$=0.67; NS). Por lo tanto ambos grupos experimentales se habituaron en igual grado.

En cuanto a las exploraciones verticales (figura 5B), nuevamente se observa un efecto del factor tiempo ($F_{1,14}$=71.4; p<0.0001), es decir, los animales se habituaron al campo abierto, pero no se observa efecto del tratamiento ($F_{1,14}$=2.1; NS) ni interacción ($F_{1,14}$=0.3; NS). Los resultados se grafican en la figura 5.

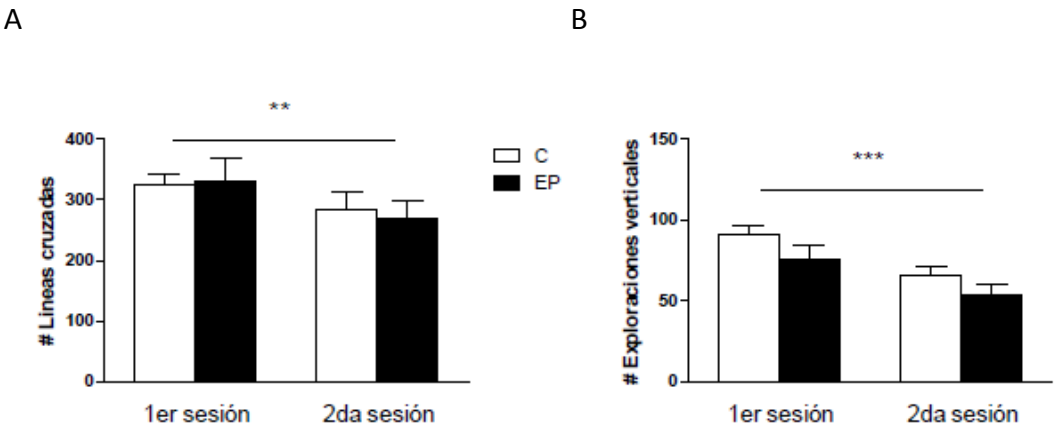


Figura 5: Evaluación de la habituación a un campo abierto
En la figura se grafican los resultados para los parámetros líneas cruzadas (A) y exploraciones verticales (B) en una primera exposición (1er sesión) y en una segunda exposición (2da sesión) al campo abierto, 24 horas después de la primera. Las barras representan la media ± EE. N=7-11 animales por grupo. **:p<0.01; ***:p<0.0001.

Parámetros vinculados a actividad exploratoria en hembras

Se estudió la actividad exploratoria en hembras de 90 días de edad control y EP en el test de campo abierto. En la figura 6 se grafica el número de líneas cruzadas (A) y el número de exploraciones verticales (B). Tanto para el parámetro número de líneas cruzadas como para el número de exploraciones verticales se realizó el test no paramétrico de Mann Whitney dado que no se cumplió el supuesto de normalidad. No se encontraron diferencias entre los tratamientos (líneas cruzadas: gráfico A, U=40, NS; exploraciones verticales: gráfico B, U=43, NS). Se grafican los resultados a continuación.

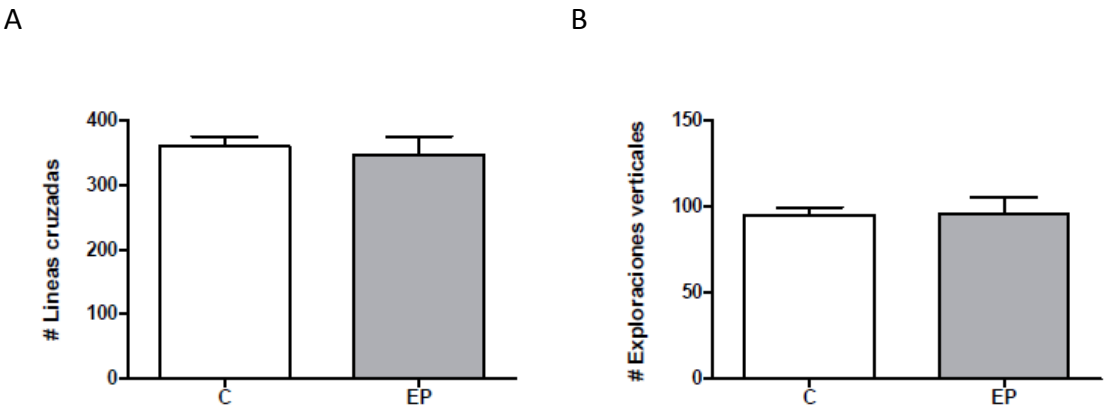


Figura 6: evaluación de la actividad exploratoria en hembras
En la figura se grafica el número de líneas cruzadas (A) y el número de exploraciones verticales (B) en el test de campo abierto, para hembras de 90 días de edad. Las barras representan la media ± EE. N=8-11 animales por grupo.

Parámetros vinculados al comportamiento tipo ansiogénico en hembras

Se analizó el comportamiento tipo ansiogénico en hembras del grupo C y EP en el campo abierto. Como en el caso de los machos, se evaluó el número de incursiones al centro, el tiempo en el centro del campo abierto y la latencia a la primera entrada al centro. En todos los casos se usó el test no paramétrico de Mann Whitney. No se encontraron diferencias entre los grupos C y EP en ninguno de los parámetros evaluados (incursiones al centro: figura 7A, U=42, NS; latencia al centro: figura 7B, U=43.5, NS; tiempo en el centro: figura 7C, U=42.5, NS). Los resultados se grafican a continuación (figura 7).

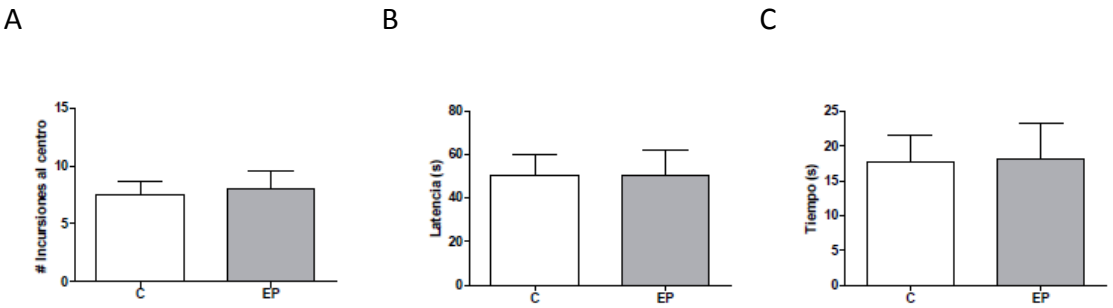


Figura 7: Evaluación del comportamiento tipo ansiogénico en hembras
Se grafica el número de incursiones al centro (A), la latencia al centro (B) y el tiempo en el centro (C) para los grupos control y EP. Las barras representan la media ± EE. N=8-11 animales por grupo.

Evaluación de la memoria de habituación en hembras

Se evaluó la memoria de habituación en hembras de los grupos control y EP. Se determinaron el número de líneas cruzadas y exploraciones verticales en dos exposiciones al campo abierto, una 24 horas después de la primera. La figura 8 muestra los resultados del test. Se encontró un efecto significativo del tiempo en los dos parámetros evaluados (figura 8A, líneas cruzadas: $F_{1,17}$=35.76; p<0.0001; figura 8B, exploraciones verticales: $F_{1,17}$=39.91; p<0.0001), pero no se observa efecto del tratamiento (figura 8A, líneas cruzadas: $F_{1,17}$=0.21; NS; figura 8B, exploraciones verticales: $F_{1,17}$=0.25; NS) ni interacción entre tratamiento y tiempo (figura 8A, líneas cruzadas: $F_{1,17}$=0.04; NS; figura 8B, exploraciones verticales: $F_{1,17}$=1.5; NS). Por lo tanto, ambos grupos mostraron una habituación al campo abierto, y en igual grado. Se grafican los resultados a continuación (Figura 8).

A B

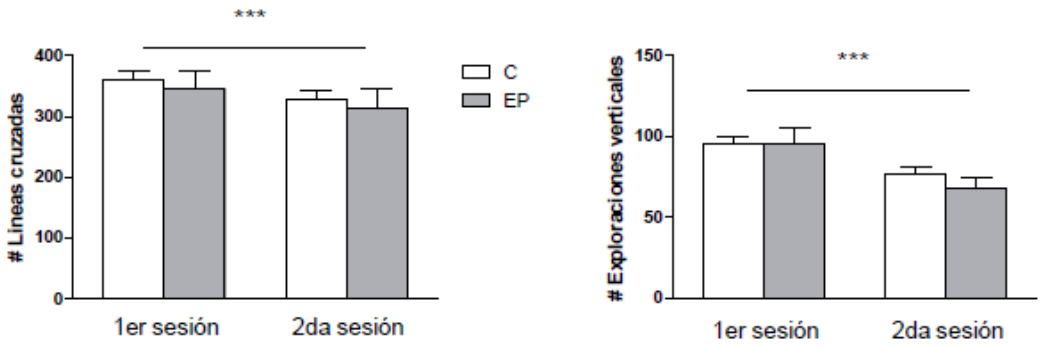


Figura 8: Evaluación de la memoria de habituación en hembras
Se grafican los parámetros número de líneas cruzadas (A) y número de exploraciones verticales (B) en una primera exposición (1er sesión) y a las 24 horas (2da sesión). Las barras representan la media ± EE. N=8-11 animales por grupo. ***:p<0.0001.

4.1.2. Exploración en un Laberinto Elevado en Cruz

Se estudió el comportamiento de tipo ansiogénico en el test de Laberinto Elevado en Cruz (LEC), tanto en machos como en hembras de los grupos control y EP. Se determinó el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en el brazo abierto y el número de entradas al mismo.

Los machos del grupo EP pasaron un menor porcentaje de tiempo en el brazo abierto que los del grupo C. Los resultados del análisis estadístico muestran una disminución significativa de este parámetro en los animales del grupo EP con respecto al control (Figura 9A, test t de student, $t_{20;0.05}$=2.36; p=0.029). A su vez, se evaluó el número de entradas al brazo abierto. Debido a que no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas, se realizó una transformación logarítmica (Log10). Se encontró una disminución significativa en este parámetro en el grupo EP respecto del control (Figura 9B, test t de student, $t_{20;0.05}$=2.582; p=0.0178). Los resultados se grafican a continuación.

A B

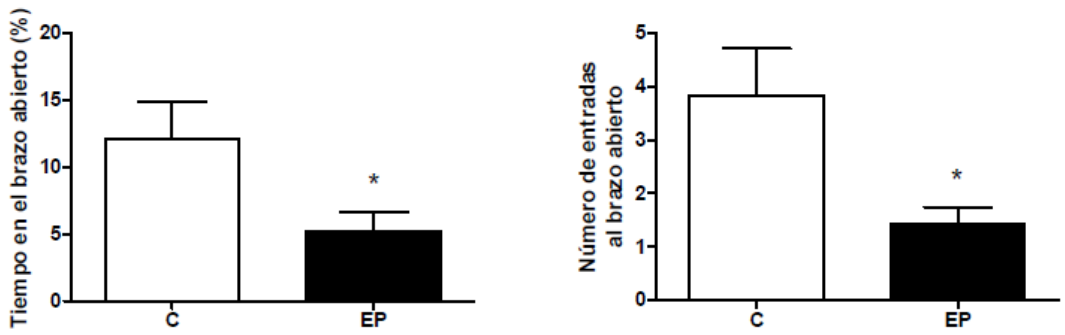


Figura 9: estudio del comportamiento tipo ansiogénico de machos en un Laberinto Elevado en Cruz

A: se grafica el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en el brazo abierto, con respecto al tiempo total del registro de actividad. B: se grafica el número de entradas al brazo abierto. Las barras representan la media ± EE. N=10-12 animales por grupo experimental. *:p<0.05.

Se evaluó el comportamiento de tipo ansiogénico en hembras de ambos grupos experimentales. Se compararon ambos grupos mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. No se observan diferencias significativas en el porcentaje de tiempo

que los animales pasaron en el brazo abierto (Figura 10A, U=69.5, NS) ni en el número de entradas al brazo abierto (Figura 10B, U=61, NS). Se grafican los resultados del test de Laberinto Elevado en Cruz a continuación.

A B

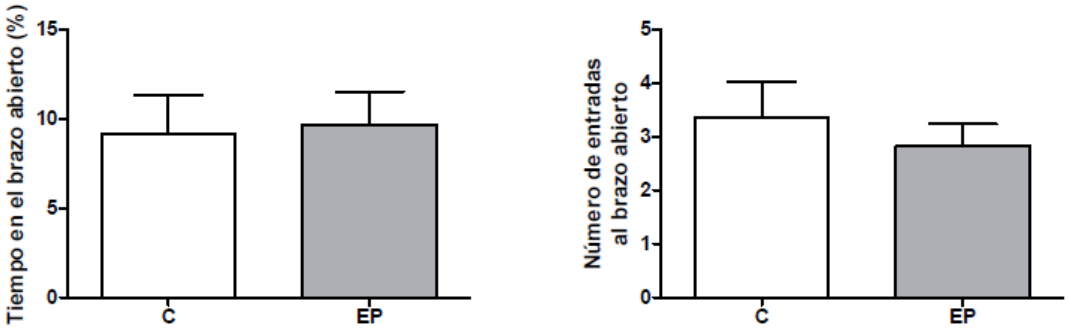


Figura 10: estudio del comportamiento tipo ansiogénico de hembras en un Laberinto Elevado en Cruz
En el panel A se grafica el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en el brazo abierto. En el panel B se grafica el número de entradas al brazo abierto. Los datos están expresados como la media ± EE. N=10-14 animales por grupo experimental.

4.1.3. Ensayo de Evitación Inhibitoria

Se estudió el aprendizaje asociativo en machos y hembras de 90 días de edad de los grupos control y EP en un ensayo de evitación inhibitoria. No se aprecian diferencias en las latencias en el ensayo de adquisición (T1) en machos ni en hembras. Además se observa que estas latencias son marcadamente inferiores a las de T2, evidenciando la expresión de la memoria asociativa.

Se evaluaron las latencias del ensayo de retención (T2) mediante un test t de Student. Los resultados muestran una disminución significativa en la latencia en el ensayo de retención en las ratas macho del grupo EP con respecto al control (Figura 11A, $t_{25;0.05}$=2.745, p=0.011).

A su vez, se evaluaron las latencias de retención en hembras mediante el test de Mann-Whitney. No se encontraron diferencias significativas en la latencia de T2 (Figura 11B, U=26.5, NS). Los resultados se grafican a continuación (figura 11).

A B

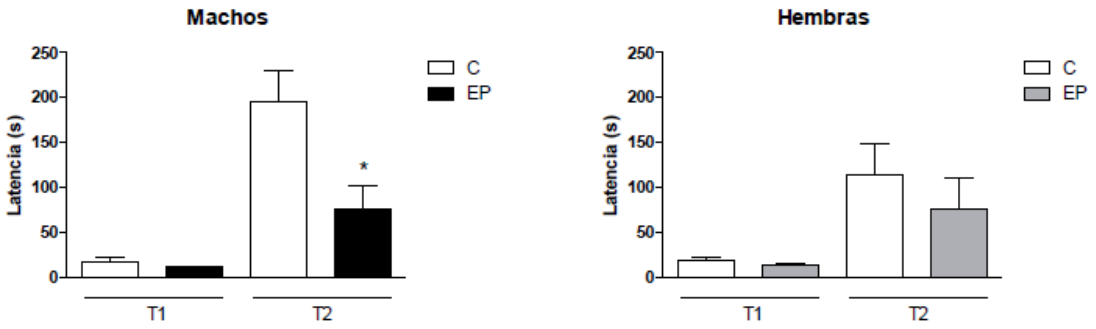


Figura 11: Evaluación de memoria asociativa en el Ensayo de Evitación Inhibitoria
En el panel A se grafican los resultados del ensayo de evitación inhibitoria en machos. T1 corresponde a la latencia en el ensayo de adquisición y T2 a la latencia en el ensayo de retención. Los resultados se expresan como la media ± EE. N=13-14 animales por grupo experimental. En el panel B se grafican los resultados de este test en hembras. N=8-9 animales por grupo experimental. *:$p<0.05$.

4.2. Determinación de la ganancia de peso

Se evaluó la ganancia de peso en machos y hembras de los grupos control y EP desde el destete (21 días de edad, semana 1 en el gráfico) hasta los 90 días de edad (semana 11). Dado que el elevado número de medidas repetidas dificulta el cumplimiento de los supuestos que habilitan el análisis estadístico correspondiente, se separó la determinación en dos períodos: el estadio juvenil, desde los 21 días (semana 1) hasta los 49 días de edad (semana 5) y el estadio adulto, desde los 56 días (semana 6) hasta los 91 días de edad.

En el caso de los machos, el análisis de medidas repetidas muestra un efecto significativo del tiempo ($F_{4,68}$=1869; $p<0.0001$) pero no del tratamiento ($F_{1,17}$=0.49; NS) ni interacción ($F_{4,68}$=0.068; NS), para la ganancia de peso entre las semanas 1 y 5. Esto indica que el incremento de peso en machos control y EP en este período fue similar (Figura 12A). Luego se analizó la ganancia de peso entre las semanas 6 y 11. Al evaluar los supuestos, se encontró que el de esfericidad no se cumplió. Por lo tanto, se corrigieron los grados de libertad utilizando el coeficiente de Huyn-Feldt, que entrega el programa de análisis estadístico SPSS. Se observó un efecto significativo de la interacción entre tiempo y tratamiento ($F_{3,48}$=3.165; $p=0.035$; nótese que los grados de libertad en el subíndice están corregidos). Por lo tanto, se procedió a evaluar los efectos simples (tiempos en cada tratamiento y tratamientos en cada tiempo). Al estudiar el efecto del tiempo en cada tratamiento, se encontraron las esperadas diferencias entre tiempos, indicativas de un significativo aumento del pesos semana a semana, tanto en C como EP. Luego se evaluó el efecto del tratamiento en cada semana. No se observaron diferencias significativas entre C y EP, aunque parecería haber una menor ganancia de peso en los machos EP a partir de la semana 8. Los resultados se grafican a continuación (Figura 12).

A B

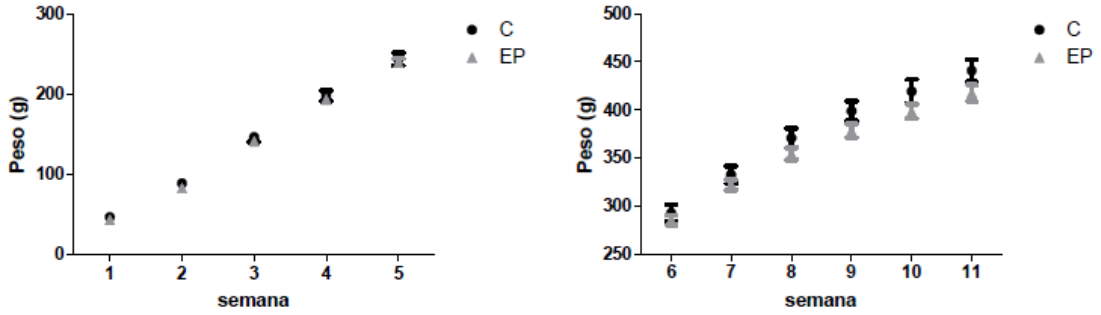


Figura 12: Determinación de la ganancia de peso en machos
Se grafica la ganancia de peso semana a semana en machos desde el destete hasta los 49 días de edad (gráfico A) y desde el día 56 hasta el 91 (gráfico B). Los resultados se expresan como la media ± EE. N=9-10 camadas por grupo experimental.

A su vez se determinó la ganancia de peso en hembras. El análisis de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tiempo ($F_{4,68}$=2172; p<0.0001) pero no del tratamiento ($F_{1,17}$=0.0029; NS) ni interacción ($F_{4,68}$=0.09; NS), para las semanas 1 a 5. Luego se realizó el análisis de las semanas 6 a 11. Nuevamente se encontró un efecto del tiempo ($F_{5,85}$=332.5; p<0.001), sin efectos del tratamiento ($F_{1,17}$=0.0028; NS) ni interacción ($F_{5,85}$=0.58; NS) entre tiempo y tratamiento. Esto indica que en el caso de las hembras, no hay diferencias en la ganancia de peso entre tratamientos en el estadio juvenil ni en el estadio adulto. Los resultados se grafican en la figura 13.

A B

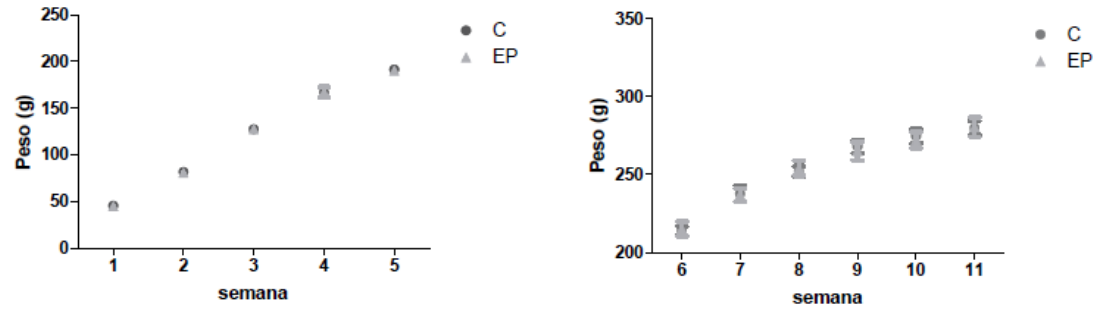


Figura 13: Determinación de la ganancia de peso en hembras
Se grafica la ganancia de peso semana a semana en hembras desde el destete hasta los 49 días de edad (gráfico A) y desde el día 56 hasta el 91 (gráfico B). Los resultados se expresan como la media ± EE. N=9-10 camadas por grupo experimental.

4.3. Efecto del estrés prenatal sobre el óxido nítrico hipocampal

4.3.1. Determinación de la actividad enzimática de la NOS.

Se evaluó la actividad enzimática de la enzima óxido nítrico sintasa en homogenatos de hipocampo mediante la determinación de la síntesis de ^{14}C-L-citrulina a partir de ^{14}C-L-arginina. El ensayo fue realizado en crías de 7 y 15 días de edad y en adultos de 90 días de edad, de ambos sexos. En la figura 14 se grafican los resultados para machos (A) y hembras (B) de 7 días de edad. Se comparó la actividad enzimática en machos mediante el test de Mann-Whitney. No se encontraron diferencias en la actividad total, en presencia de Ca^{2+} (U=15, NS), ni en la actividad en presencia de 7NI, inhibidor específico de nNOS (U=16, NS). El agregado de quelantes de calcio o de un inhibidor de todas las isoformas de NOS (L-NAME) anuló por completo la actividad, demostrando que la radiactividad detectada es efectivamente producto de la reacción de la NOS.

En la figura 14B se grafican los resultados en hembras de 7 días de edad. Los grupos fueron comparados utilizando el test t de Student. Se observa un incremento de la actividad total ($t_{12;0.05}$=2.499, p=0.028), pero no se encontraron diferencias en la actividad en presencia de 7NI ($t_{12;0.05}$=0.92, NS). Esto indicaría que el aumento en la actividad correspondería a la isoforma nNOS.

Se estudió a su vez la actividad de NOS en ratas macho y hembra de 15 días de edad. No se encontraron diferencias en la actividad total ni en machos (U=24, NS) ni en hembras ($t_{10;0.05}$=0.69, NS), ni en la actividad en presencia del inhibidor de nNOS 7NI (machos: $t_{6;0.05}$=0.75, NS; hembras: $t_{4;0.05}$=1.19, NS). Los resultados se grafican en la figura 15.

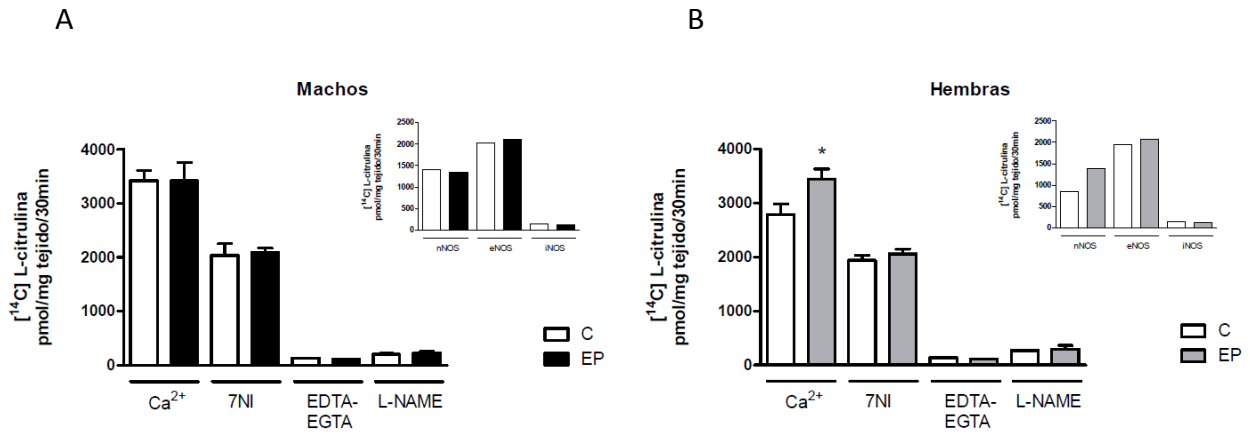


Figura 14: Determinación de la actividad enzimática de la NOS en crías de 7 días de edad
En el panel izquierdo (A) se grafica la actividad de NOS en machos evaluada como picomoles de ^{14}C-L-citrulina por miligramo de tejido generados en 30 minutos de reacción. En el inserto se grafican las actividades resultantes de cada isoforma. N=6 animales por grupo experimental. En el panel derecho (B) se grafica la actividad de NOS en hembras. En el inserto se grafican las actividades resultantes de cada isoforma. Los resultados se expresan como la media ± EE. N=7 animales por grupo experimental. *:p<0.05.

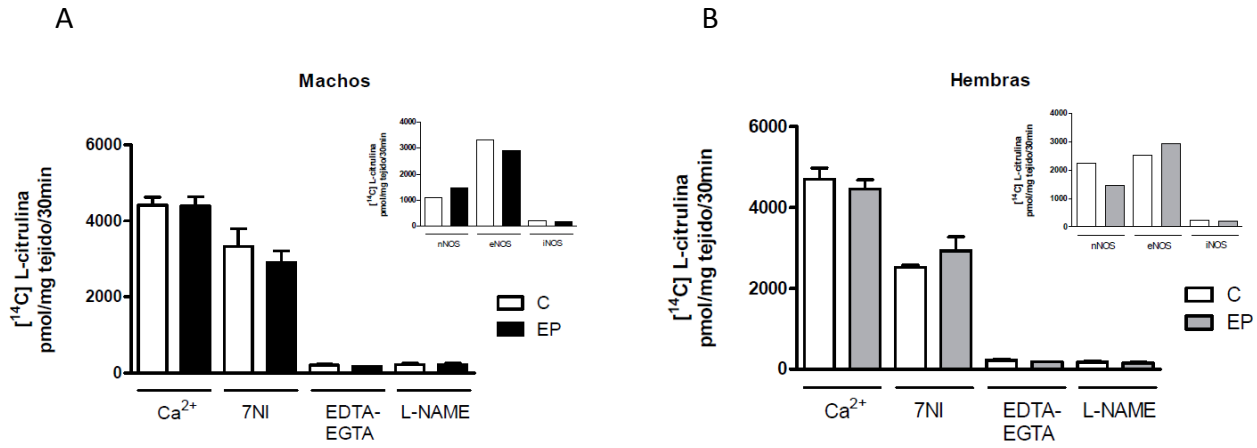


Figura 15: Determinación de la actividad enzimática de la NOS en crías de 15 días de edad
La figura muestra los resultados de la determinación de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa en ratas de 15 días de edad, machos (A) y hembras (B). En el inserto se grafican las actividades resultantes de cada isoforma. Los resultados se expresan como la media ± EE. N=6-7 animales por grupo experimental.

Se determinó la actividad de NOS en ratas adultas, de 90 días de edad. Se encontró una disminución significativa de la actividad total en machos (Figura 16A, $t_{10;\ 0.05}$=3.24, p=0.0088). En cambio, no se observan diferencias significativas en la actividad total en hembras (Figura 16B, $t_{4;\ 0.05}$=1.69, NS). El agregado de quelantes de calcio o L-NAME inhibió la actividad de NOS, revelando que la actividad detectada corresponde a las isoformas constitutivas (no habría actividad de la isoforma inducible, iNOS).

A B

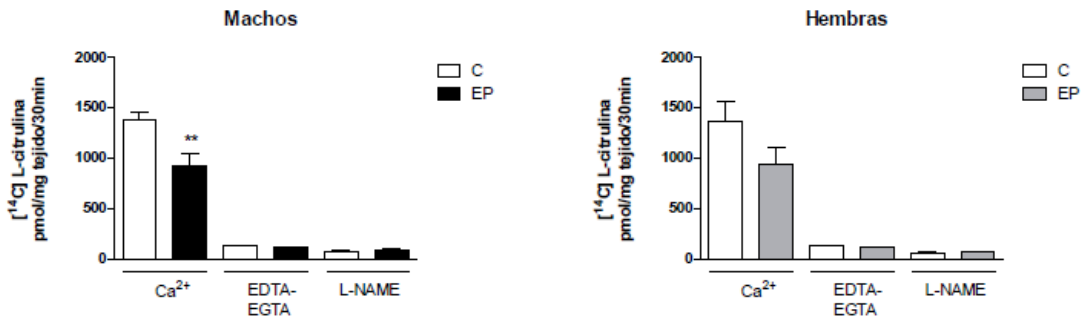


Figura 16: Determinación de la actividad enzimática de la NOS en crías de 90 días de edad
La figura muestra los resultados de la determinación de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa en hipocampo de ratas adultas, machos (A) y hembras (B). Los datos están expresados como picomoles de ^{14}C-L-citrulina por miligramo de tejido generados en 30 minutos de reacción (media ± EE). Para machos N=6 animales por grupo experimental. Para hembras N=3 animales por grupo experimental. **: p<0.01.

4.3.2. Determinación de la actividad enzimática de PKC

Se cuantificó la actividad enzimática de la proteína kinasa C en homogenatos de hipocampos de ratas de 7, 15 y 90 días de edad, de ambos sexos, de los grupos C y EP. No se observan diferencias entre ratas de ambos grupos experimentales en PN7 (macho: U=4, NS; hembra: $t_{4;\ 0.05}$=1.024, NS) en PN15 (macho: U=4, NS; hembra: $t_{4;\ 0.05}$=1.697, NS) ni en PN90 (macho: $t_{6;\ 0.05}$=1.33, NS; hembra: U=6, NS). Los resultados están graficados a continuación (figura 17). A su vez se evaluó el nivel de translocación a membrana. No se encontraron diferencias en este parámetro en machos ni en hembras en ninguna de las edades estudiada (datos no mostrados).

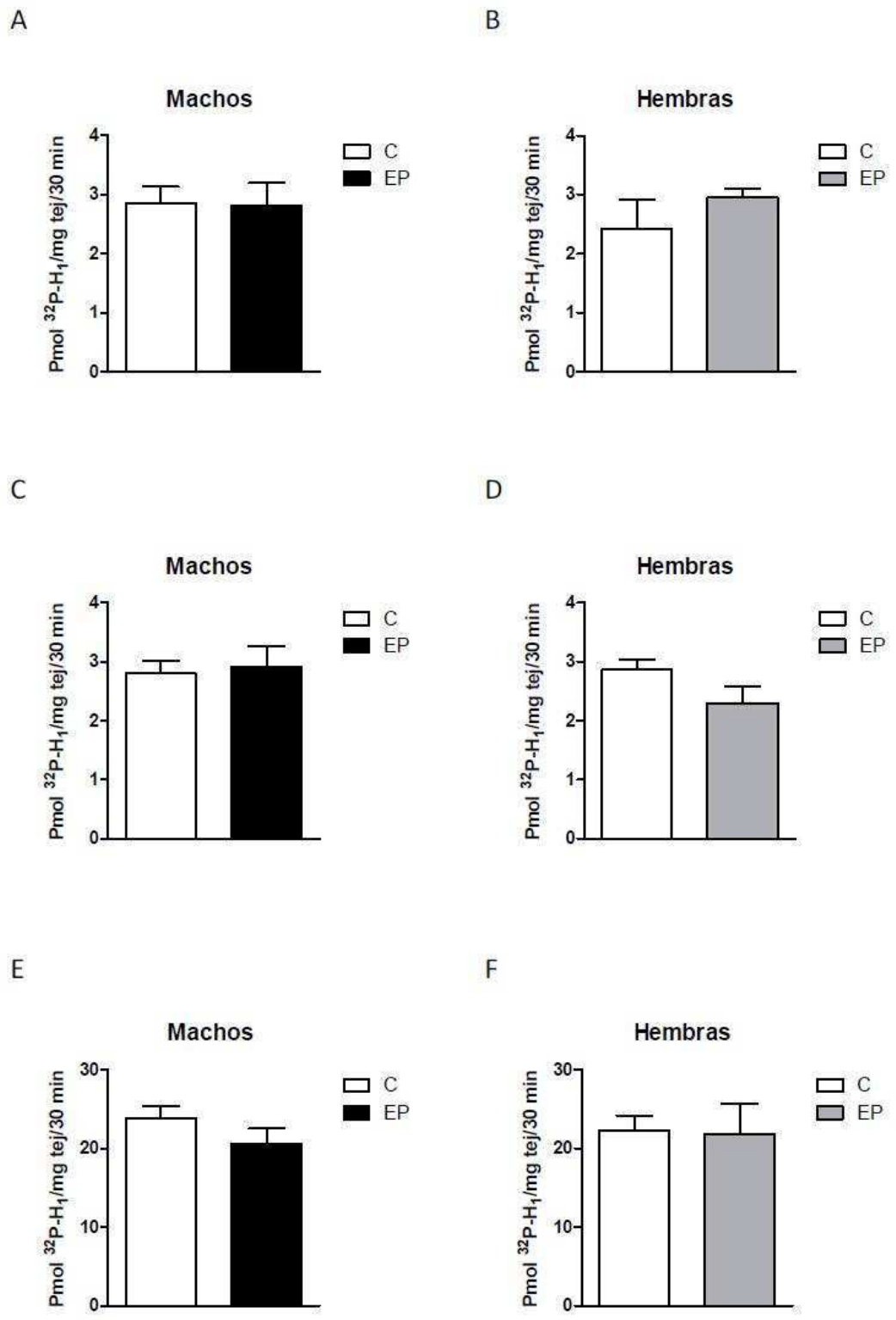


Figura 17: Determinación de la actividad enzimática de la PKC

La figura muestra los resultados de la determinación de la actividad de la enzima proteína kinasa C en hipocampo de ratas macho (A, C y E) y hembra (B, D, F) de 7 (A y B), 15 (C y D) y 90 (E y F) días de edad. Los datos están expresados como picomoles de ^{32}P-histona H_1 por miligramo de tejido generados en 30 minutos de reacción (media ± EE). N=3-4 animales por grupo experimental.

4.3.3. Determinación de proteínas por Western Blot

Se estudiaron los niveles de nNOS y GR en hipocampos de ratas Wistar macho y hembra adultos (de 90 días de edad) de los grupos control y estrés prenatal mediante la técnica de Western Blot.

4.3.3.1. Resultados de la inmunodetección de nNOS

El análisis de los resultados de la determinación de proteínas de hipocampo por Western Blot muestra una disminución significativa en los niveles de nNOS en machos del grupo EP (Figura 18A, $t_{10;\ 0.05}$=2.229, p=0.045). En cuanto a las hembras, no se encontraron diferencias entre tratamientos (Figura 18B, $t_{14;\ 0.05}$=1.382, NS).

A B

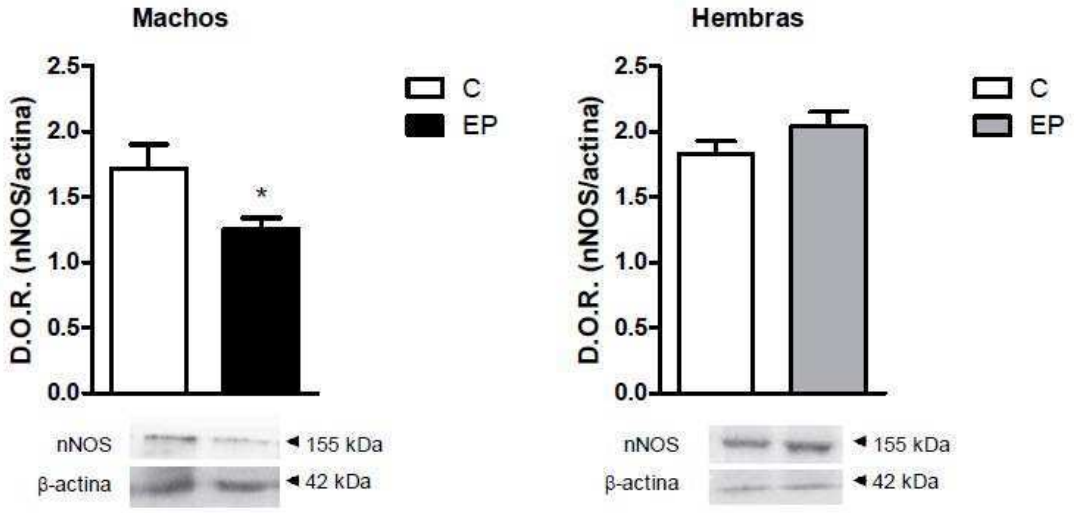


Figura 18: Determinación de los niveles de nNOS en hipocampo de ratas de 90 días de edad
La figura muestra los resultados de la determinación de los niveles de la enzima nNOS en ratas adultas, machos (A) y hembras (B). Los resultados se expresan como densidad óptica de las bandas de nNOS relativizada a la densidad óptica de la actina (media ± EE). Para machos N=6 individuos por grupo experimental. Para hembras N=8 animales por grupo experimental. *: p<0.05.

4.3.3.2. Resultados de la inmunodetección de GR

Se determinaron los niveles del receptor de glucocorticoides (GR) en hipocampo de machos y hembras de los grupos C y EP utilizando la técnica de Western Blot. En el caso de los machos, se realizó una transformación log10 de los datos dado que no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas. Se observa una disminución significativa en los niveles de GR en machos del grupo EP con respecto al control (Figura 19A, $t_{14;\ 0.05}$=2.64, p=0.019). En el caso de las hembras no se encontraron diferencias en los niveles de GR (Figura 19B, $t_{14;\ 0.05}$=1.96, NS).

A B

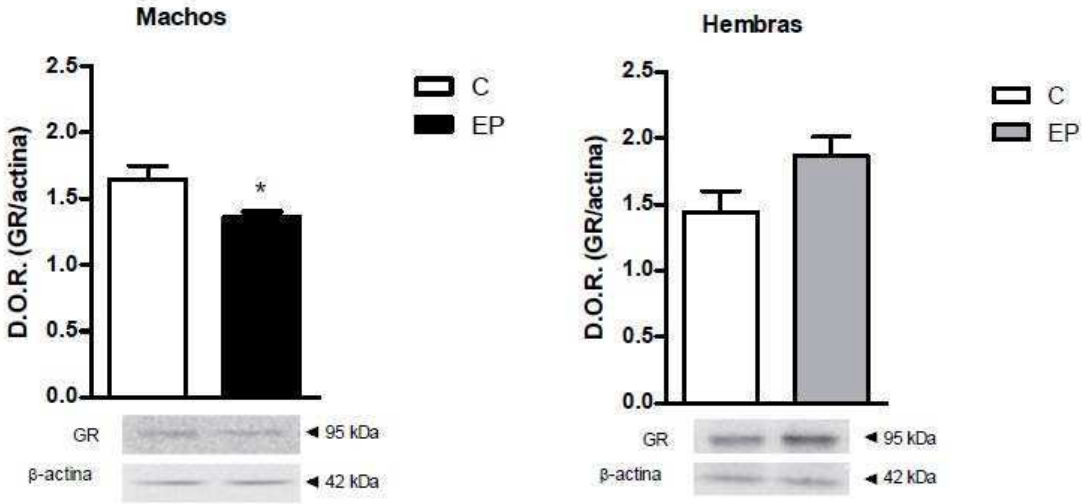


Figura 19: Determinación de los niveles de GR en hipocampo de ratas de 90 días de edad
La figura muestra los resultados de la determinación de los niveles de GR en hipocampo de ratas adultas, machos (A) y hembras (B). Los resultados se expresan como densidad óptica de las bandas de GR relativizada a la densidad óptica de la actina (media ± EE). N=8 animales por grupo experimental. *: p<0.05.

4.3.4. Histología

4.3.4.1. Resultados de la Tinción de NADPH diaforasa

Se estudió la actividad NADPH diaforasa (NADPHd) en cortes histológicos coronales de cerebro de 30 µm de grosor, obtenidos de machos y hembras de los grupos control y estrés prenatal, de 90 días de edad. Está ampliamente establecido que esta tinción refleja la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa en tejido.

Se observa una disminución significativa del número de células positivas para NADPHd en la región CA1 del hipocampo en machos ($t_{4;\ 0.05}$=3.898, p=0.018). No se encontraron cambios en la región CA3 ($t_{4;\ 0,05}$=0.5714, NS) ni en el giro dentado (GD) ($t_{4;\ 0.05}$=0.95, NS). Fotomicrografías representativas de los resultados se muestran a continuación, conjuntamente con el gráfico correspondiente (figura 20).

En relación a los resultados de la tinción NADPHd en hembras, no se hallaron diferencias significativas en el área CA1 ($t_{5;\ 0.05}$=2.032, NS), en el área CA3 ($t_{5;\ 0.05}$=0.82, NS) ni en el giro dentado ($t_{5;\ 0.05}$=1.67, NS). Los resultados se muestran en la figura 21.

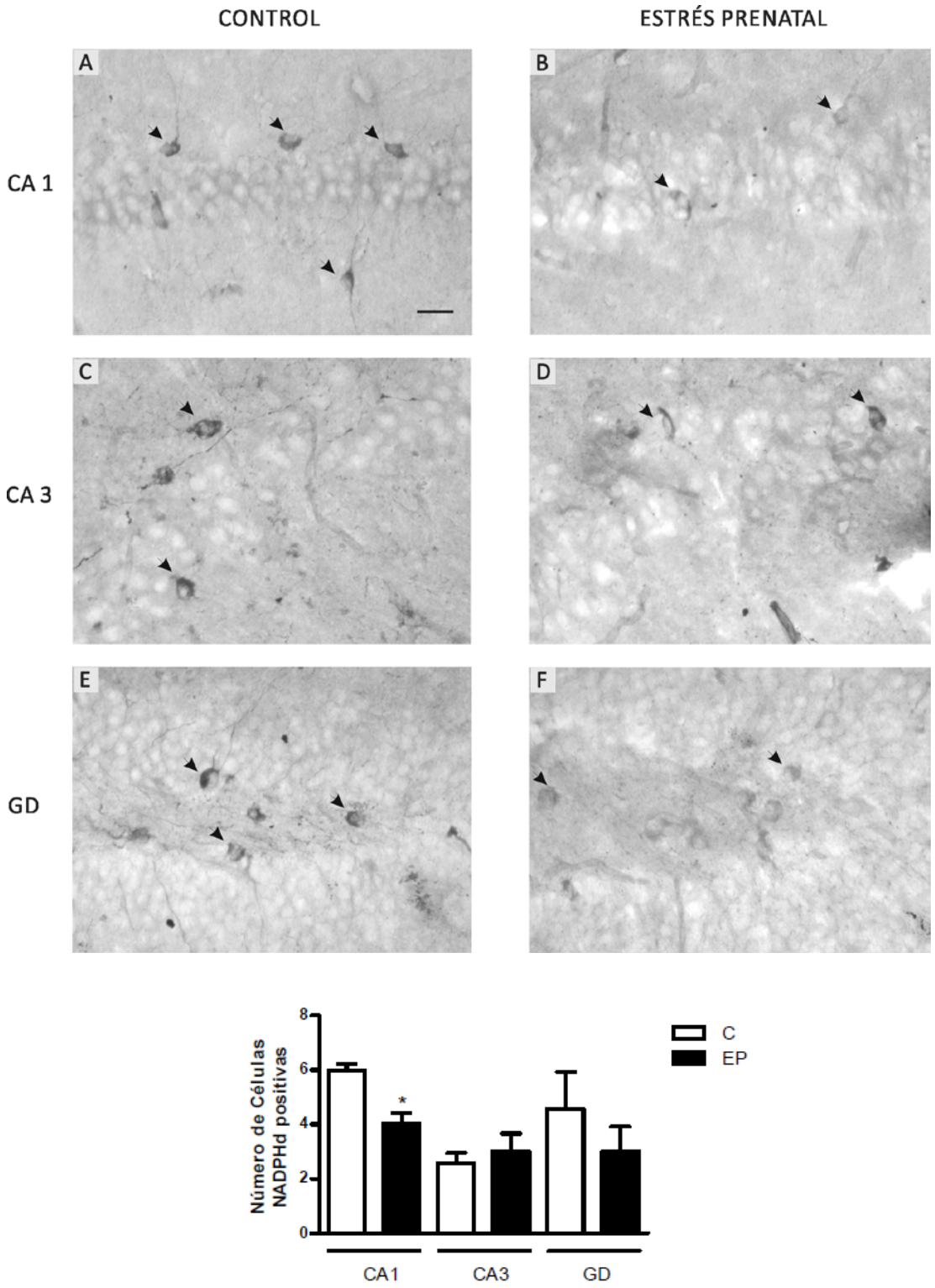


Figura 20: Determinación de la actividad NADPH diaforasa en machos de 90 días de edad
El panel superior muestra las fotomicrografías representativas de la tinción de NADPHd correspondientes a las áreas CA1, CA3 y giro dentado de hipocampo, para machos del grupo C y EP. La barra de escala corresponde a 20µm. En el panel inferior se grafican los resultados para cada área. Estos están expresados como número de células NADPHd positivas por fotomicrografía (media ± EE). N=3 animales por grupo experimental *:$p<0.05$.

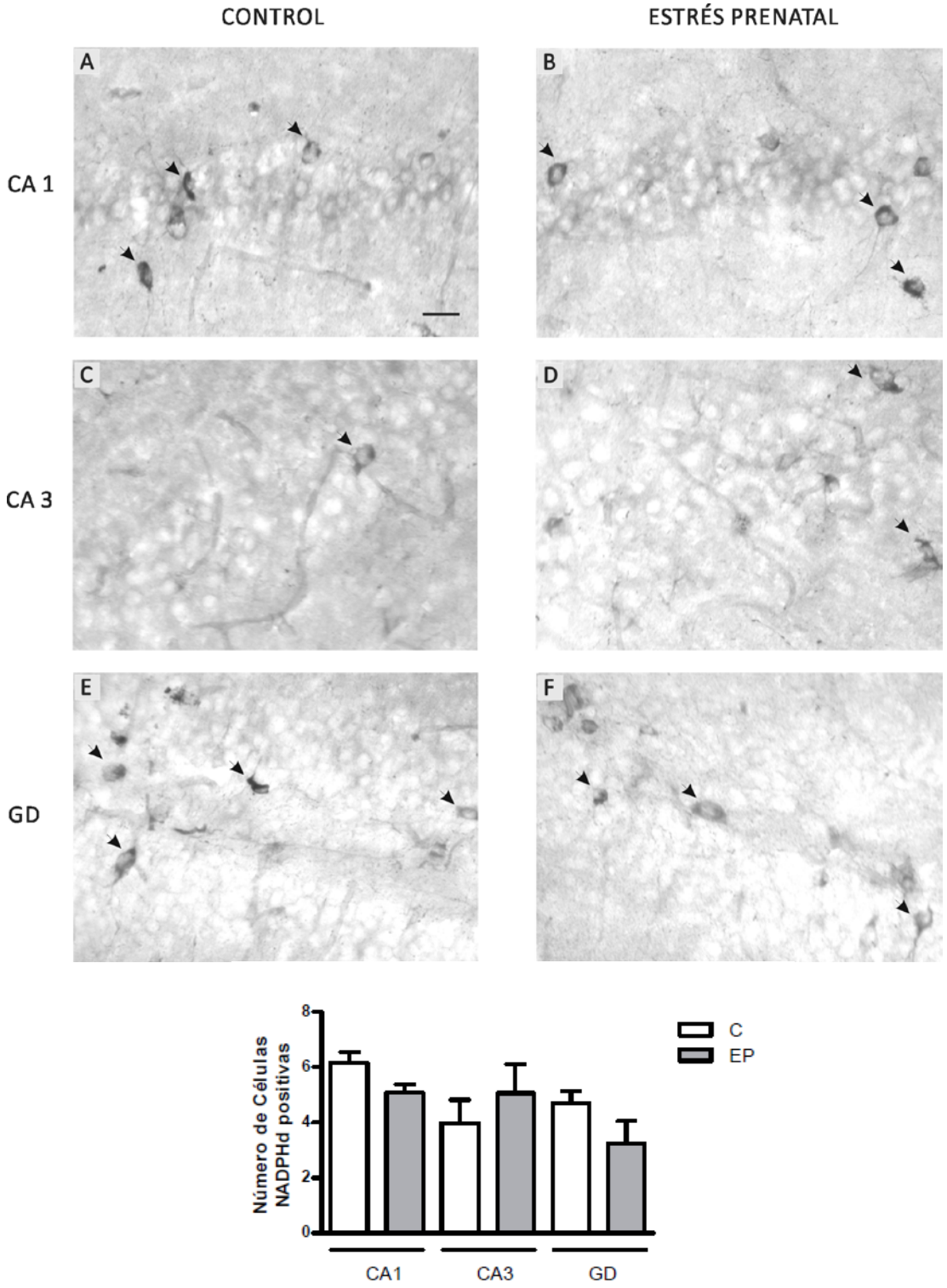


Figura 21: Determinación de la actividad NADPH diaforasa en hembras de 90 días de edad
El panel superior muestra las fotomicrografías representativas de la tinción de NADPHd correspondientes a las áreas CA1, CA3 y giro dentado de hipocampo, para hembras del grupo C (izquierda) y EP (derecha). La barra de escala corresponde a 20µm. En el panel inferior se grafican los resultados para cada área. Las barras del gráfico representan la media ± EE. N=3-4 animales por grupo experimental.

4.3.4.2. Inmunotinción de nNOS

Para profundizar en la caracterización de los cambios en el NO hipocampal inducidos por estrés prenatal, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en cortes histológicos coronales de cerebro de 30µm de grosor, de machos y hembras de los grupos C y EP.

Se encontró una disminución significativa del número de células positivas para nNOS en el área CA1 del hipocampo ($t_{6;\ 0.05}$=2.58, p=0.042). Tanto en las áreas CA3 como GD no se observaron diferencias significativas (CA3: $t_{6;\ 0.05}$=0.85, NS; GD: $t_{6;\ 0.05}$=1.1, NS). Los resultados están graficados en la figura 22.

En el caso de las hembras, no se encontraron cambios en el número de células positivas para nNOS en las áreas del hipocampo estudiadas. En el caso de las áreas CA1 y CA3 se realizó un test no paramétrico, debido a que la distribución de probabilidades de la variable respuesta no fue normal (CA1: U=5, NS; CA3: U=4.5, NS; GD: $t_{5;\ 0.05}$=0.54, NS). Los resultados de la inmunohistoquímica de nNOS para hembras están graficados en la figura 23.

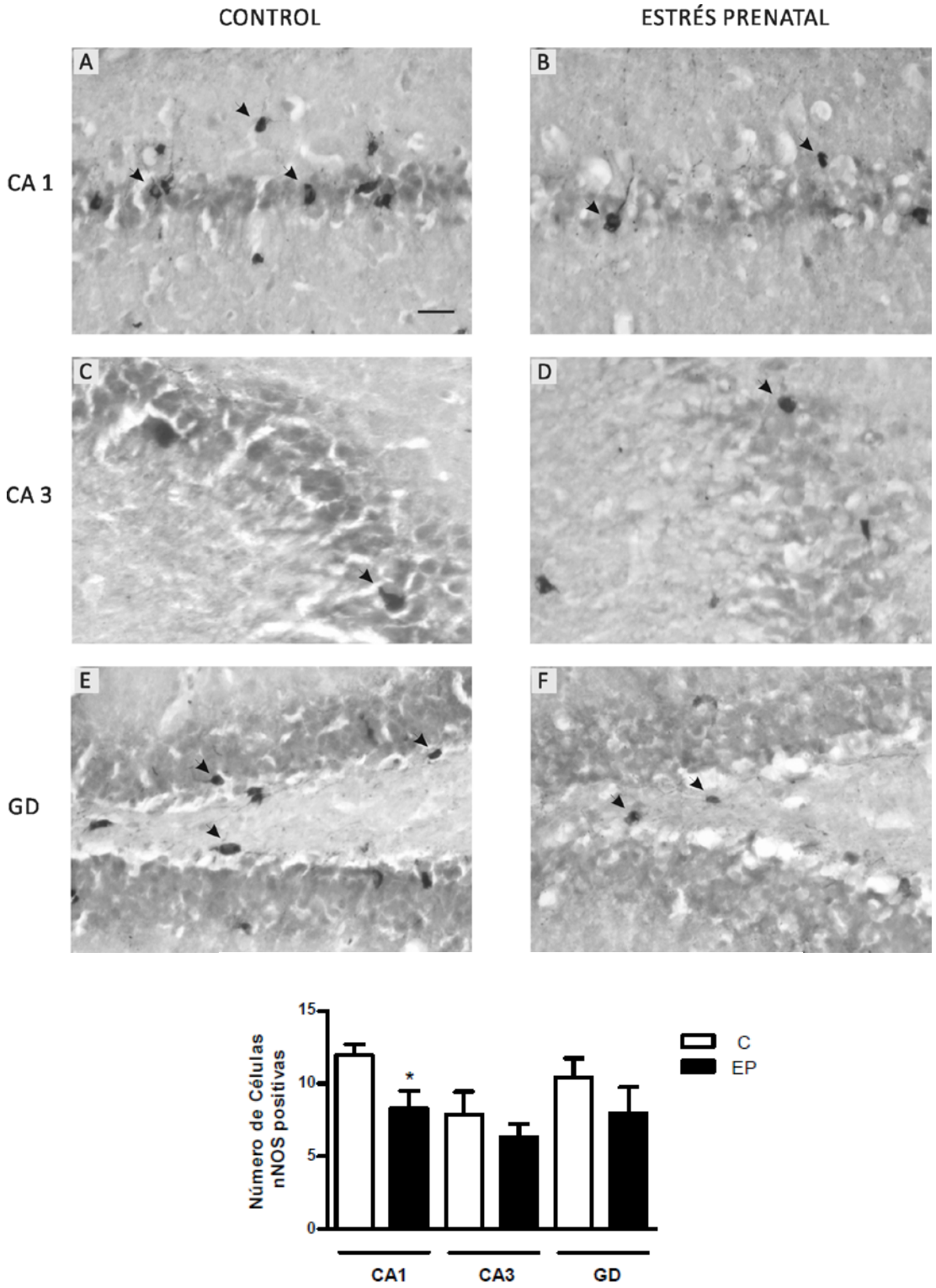


Figura 22: Evaluación de la expresión de nNOS en machos de 90 días de edad
En el panel superior se pueden apreciar fotomicrografías representativas de la tinción de nNOS correspondientes a las áreas CA1, CA3 y giro dentado de hipocampo, para machos control y EP. Las flechas indican células positivas para nNOS. Barra de escala: 20µm. En el panel inferior se grafican los resultados para las áreas detalladas. Las barras del gráfico representan el número de células positivas para nNOS (media ± EE). N=4 animales por grupo experimental. *:$p<0.05$.

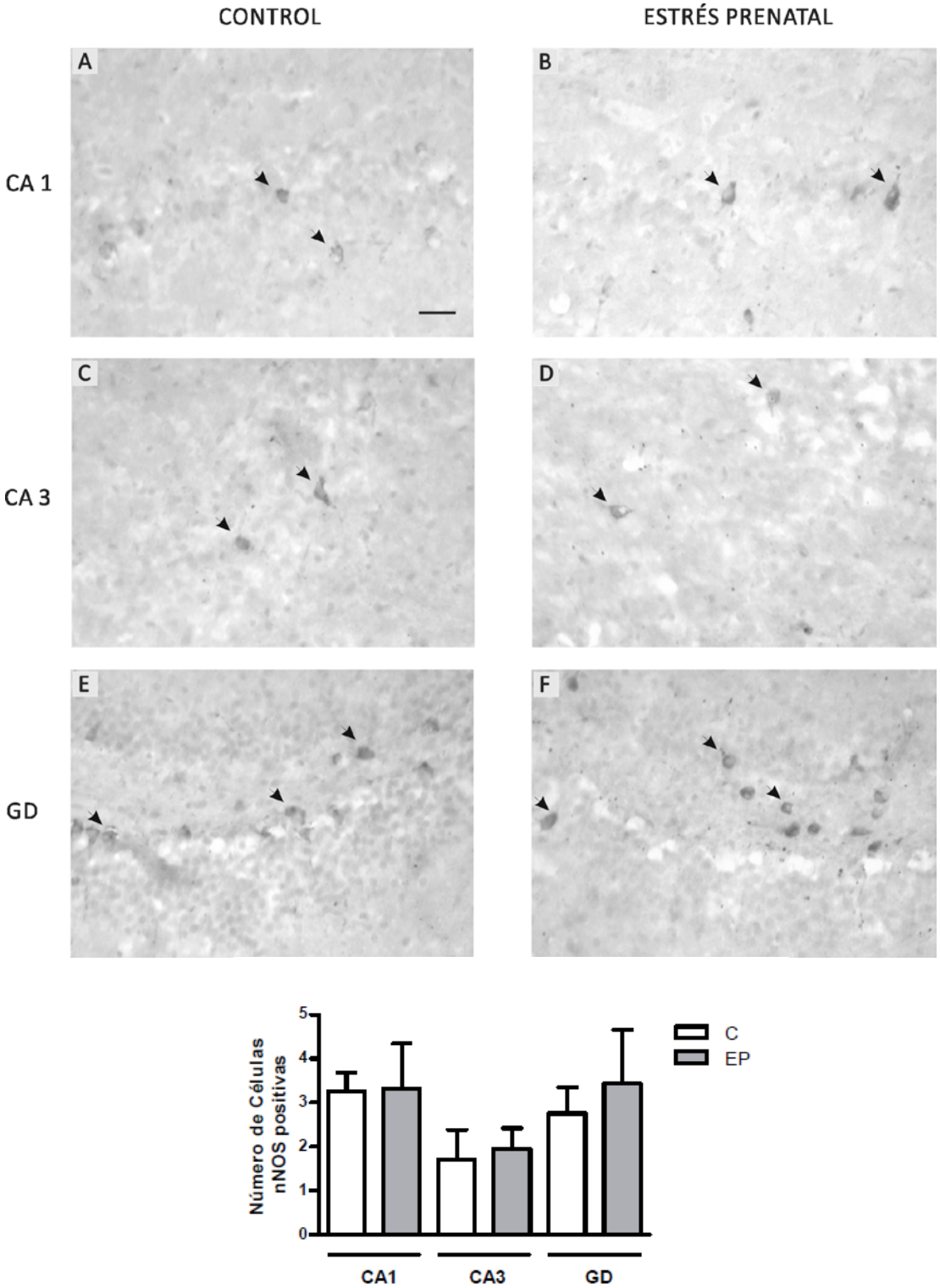


Figura 23: Evaluación de la expresión de nNOS en hembras de 90 días de edad
En el panel superior se exhiben fotomicrografías representativas de la tinción de nNOS correspondientes a las áreas CA1, CA3 y giro dentado de hipocampo, para hembras del grupo control (izquierda) y EP (derecha). Las puntas de flecha indican células positivas para nNOS. La barra de escala corresponde a 20µm. En el panel inferior se grafican los resultados para cada área. Las barras del gráfico representan el número de células positivas para nNOS (media ± EE). N=3-4 animales por grupo experimental.

4.3.4.3. Inmunotinción de GR

Se evaluó la expresión del receptor de glucocorticoides (GR) en cortes histológicos coronales de cerebro de ratas adultas macho y hembra, de los grupos control y estrés prenatal. El análisis de la inmunomarcación para GR en machos revela que el estrés prenatal indujo una reducción en los niveles del receptor en el área CA1 del hipocampo, con respecto al control ($t_{8;\ 0.05}$=2.503, p=0.037). No se encontraron diferencias significativas en el giro dentado ($t_{8;\ 0.05}$=1.24, NS). Los niveles de expresión en CA3 son reducidos, lo cual es consistente con los datos presentes en la bibliografía. Imágenes representativas de las inmunotinciones y el correspondiente gráfico se presentan en la figura 24.

Luego se llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica para GR en cortes histológicos de cerebro de hembras adultas. No se encontraron cambios inducidos por el estrés prenatal en ninguna de las áreas del hipocampo estudiadas (CA1: $t_{7;\ 0.05}$=1.58, NS; GD: $t_{7;\ 0.05}$=0.8, NS). Los resultados se grafican en la figura 25.

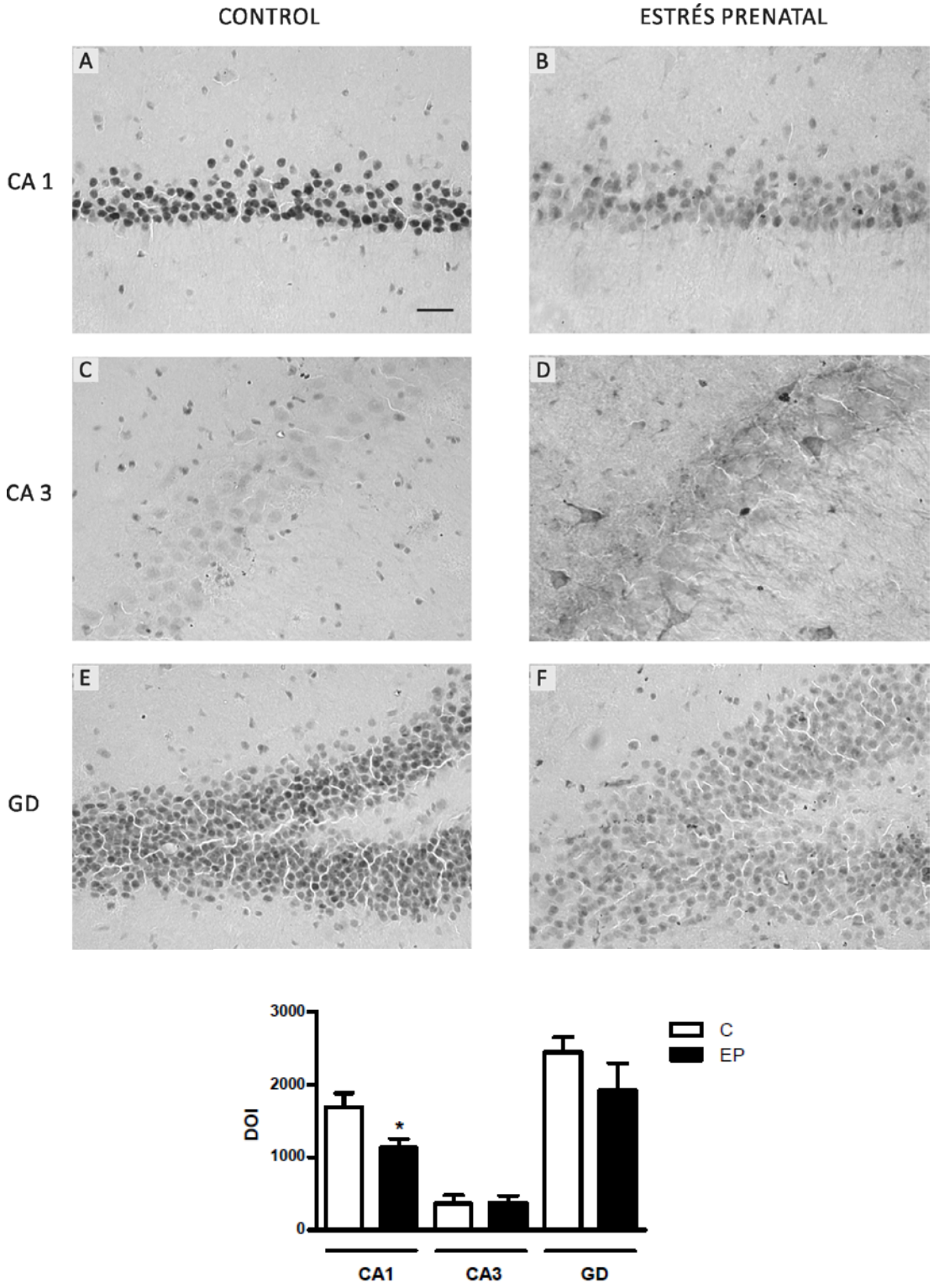


Figura 24: Estudio de la expresión de GR en machos de 90 días de edad
En el panel superior se presentan fotomicrografías correspondientes a la tinción de GR en hipocampo (áreas CA1, CA3 y giro dentado) para machos C y EP. La barra de escala corresponde a 20µm. En el panel inferior se grafican los resultados para cada región. Las barras del gráfico representan la densidad óptica integrada (media ± EE). N=5 animales por grupo experimental. *:$p<0.05$.

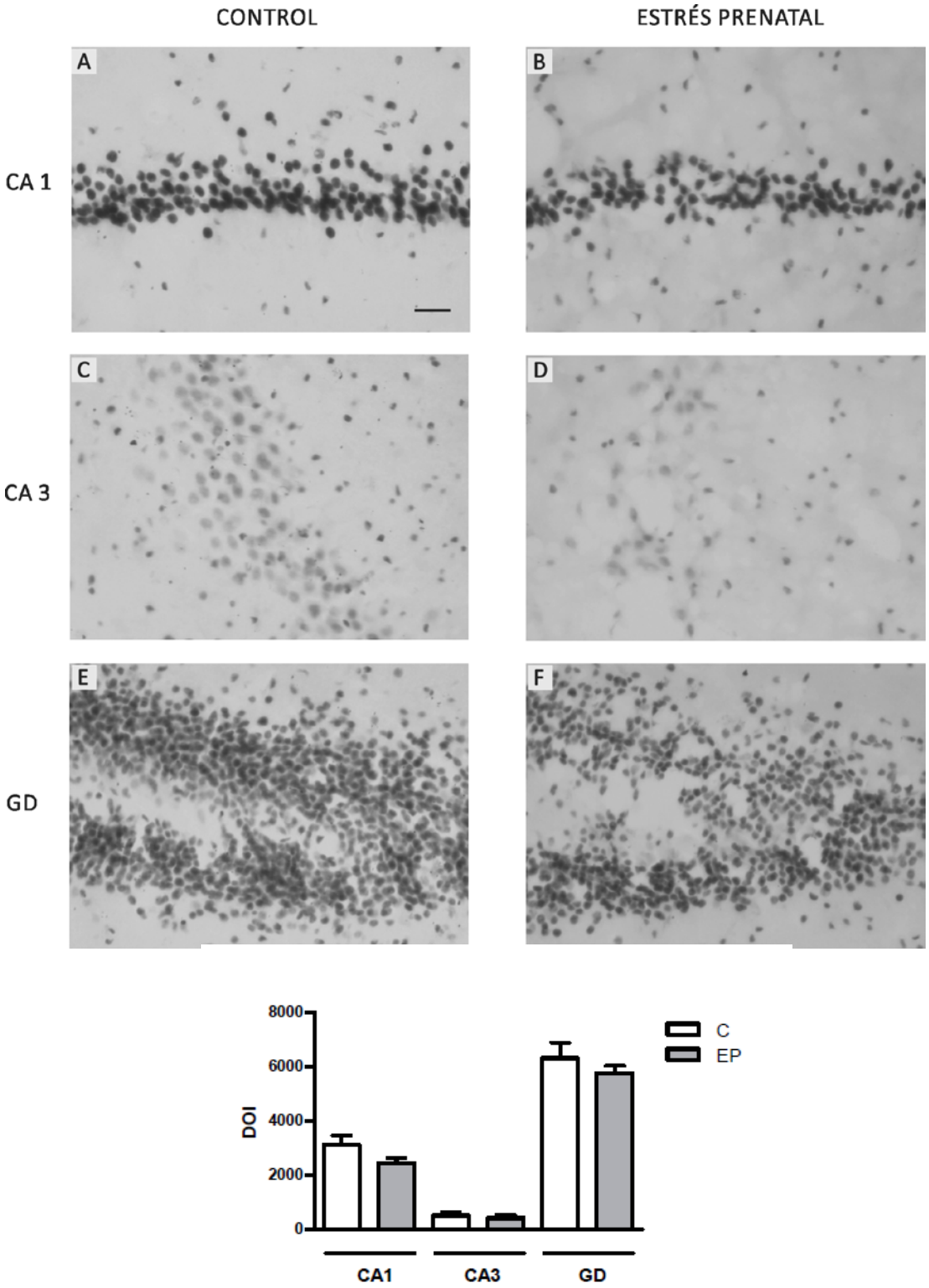


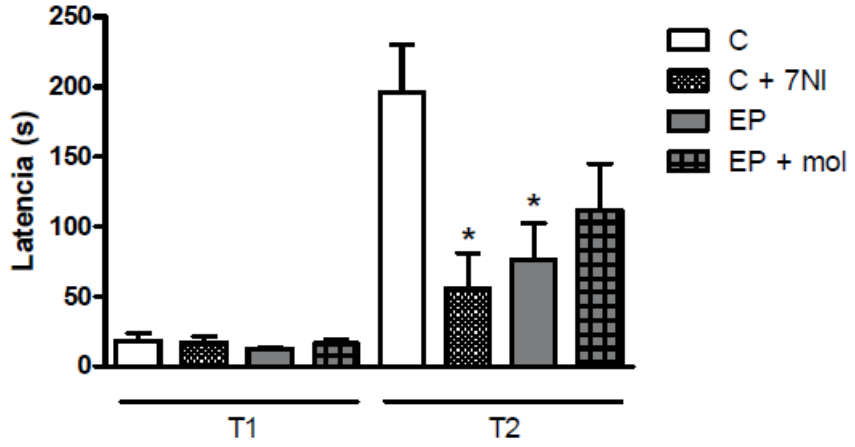
Figura 25: Estudio de la expresión de GR en hembras de 90 días de edad
En el panel superior se presentan fotomicrografías correspondientes a la tinción de GR en hipocampo de hembras (áreas CA1, CA3 y giro dentado). Barra de escala: 20µm. En el panel inferior se grafican los resultados para cada área. Las barras del gráfico representan la densidad óptica integrada (media ± EE). N=4-5 animales por grupo.

4.4. Estudio del rol del óxido nítrico en el aprendizaje

Con el objetivo de determinar si las alteraciones que se encontraron en la expresión y actividad de la enzima óxido nítrico sintasa en ratas macho de 90 días de edad están relacionadas con cambios en el aprendizaje asociativo, se utilizó una estrategia farmacológica para evaluar la función de este neurotransmisor. Para ello se administró a machos control una única dosis de 7NI (50mg/kg) y a machos EP una única dosis de molsidomine, un dador de NO (mol, 4mg/kg), 30 minutos antes de la sesión de adquisición. Se determinaron las latencias en el ensayo de adquisición y de retención. Se analizaron los resultados mediante un ANOVA ($F_{3,47}$=4.07, p=0.012). Se utilizó el test post-hoc de Tukey. Se observa una disminución significativa de la latencia en el grupo C + 7NI con respecto al control, lo que indica que el inhibidor de nNOS afectó el aprendizaje. A su vez, se encontró una disminución significativa de la latencia del grupo EP con respecto al control. El tratamiento con molsidomine (EP + mol) revirtió parcialmente el efecto del estrés prenatal, dado que no se encontraron diferencias con respecto al control. Tampoco se encontraron diferencias entre el grupo C + 7NI y el EP. Por lo tanto, el inhibidor de nNOS afecta el aprendizaje asociativo, y la administración de un dador de NO revierte parcialmente los cambios inducidos por estrés prenatal. Los resultados se grafican en la figura 26A.

Para caracterizar los resultados de este test mediante otra aproximación analítica, se clasificó a cada individuo según si la latencia de retención era mayor a 150 segundos o menor (recordando que el tiempo máximo de cuantificación es de 300 segundos). Se obtuvo de esta manera una variable categórica, que se evaluó mediante un test de χ^2. Se encontró que los grupos estudiados son estadísticamente diferentes (χ^2=10.98, p=0.012). Los resultados están graficados en la figura 26B.

A



B

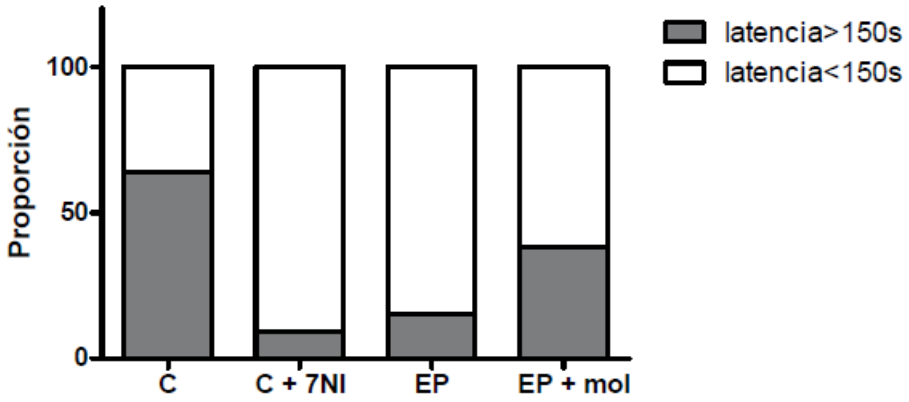


Figura 26: Evaluación del rol del NO en la memoria asociativa
En el panel A se grafican los resultados del ensayo de evitación inhibitoria en machos. T1 corresponde a la latencia en el ensayo de adquisición y T2 a la latencia en el ensayo de retención. Los resultados se expresan como la media ± EE. En el panel B se grafica la proporción de animales de cada grupo experimental con latencias superiores e inferiores a 150s. N=11-14 animales por grupo experimental. *: $p<0.05$.

4.5. Estudio del efecto del estrés prenatal sobre el eje HPA

4.5.1. Determinación de los niveles de corticosterona

Se midieron los niveles de corticosterona basales en crías de 7 días de edad. Se utilizaron dos crías por camada: una recibió una dosis de 7NI (50mg/kg), un inhibidor de nNOS, administrado por vía oral, y la otra recibió una dosis de vehículo. Los tratamientos farmacológicos se administraron 2 horas antes de la eutanasia y obtención de sangre. Los ensayos fueron realizados en machos y hembras y analizados mediante un modelo de parcela dividida (el análisis estadístico de este modelo es equivalente al análisis del ANOVA de dos vías con medidas repetidas). El análisis en machos mostró una interacción entre tratamiento prenatal y el fármaco administrado ($F_{1,6}$=19.45; p=0.0045). Por lo tanto se evaluaron los efectos simples. Se analizó el efecto del tratamiento prenatal dentro de cada tratamiento farmacológico. No se encontraron diferencias entre machos C y EP tratados con vehículo ni entre C y EP tratados con 7NI. Luego se estudió el efecto del tratamiento farmacológico dentro de cada grupo experimental. Se encontró una disminución significativa en los niveles de corticosterona inducida por el tratamiento con 7NI en el grupo control. En el grupo EP, no se encontraron diferencias entre el tratamiento con 7NI y el tratamiento con vehículo. Los resultados se grafican en la figura 27A.

En el caso de las hembras, el ANOVA no mostró efecto significativo del tratamiento prenatal ($F_{1,7}$=1.11; NS), del tratamiento farmacológico ($F_{1,7}$=0.48; NS) ni interacción entre el tratamiento prenatal y el tratamiento farmacológico ($F_{1,7}$=1.89; NS). Cabe destacar que la variabilidad entre camadas de un mismo tratamiento fue elevada, a su vez, la tendencia entre tratamientos farmacológicos no fue consistente entre camadas. Los resultados se grafican en la figura 27B.

A B

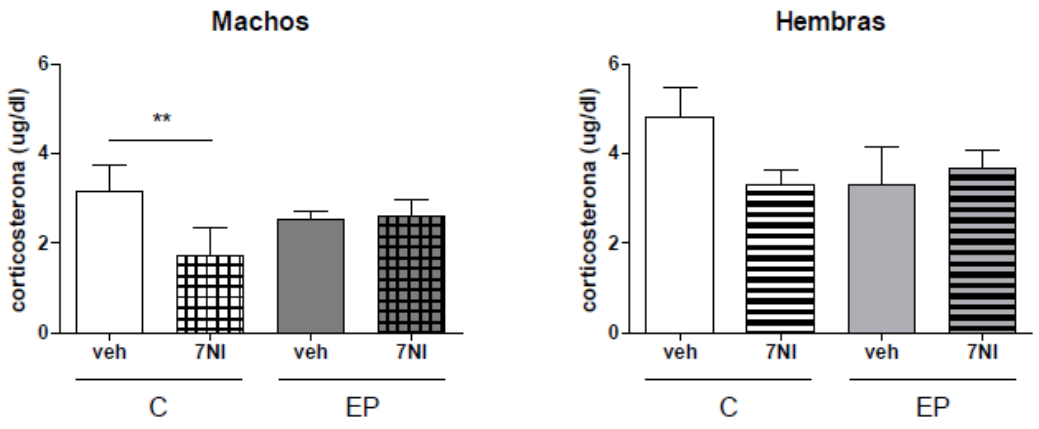


Figura 27: Evaluación de los niveles de corticosterona en crías de 7 días de edad
Los gráficos representan los resultados de la determinación de los niveles basales de corticosterona en machos (A) y hembras (B), estudiando además el efecto de un inhibidor de nNOS (7NI, 50 mg/kg) en los mismos. Los resultados se expresan como ug/dl de corticosterona (media ± EE). N=4-5 individuos por grupo experimental. **:p<0.01.

Se sometió a ratas macho y hembra adultas (90 días de edad) de ambos grupos experimentales a un modelo de estrés agudo por restricción del movimiento, nuevamente en cilindros de plástico, por una duración de 30 minutos. Se tomaron muestras de sangre a tiempo inicial (T0), a los 30 minutos de estrés (T30) y luego de 30 minutos en los que el animal estuvo en la jaula de descanso (T60). Se evaluó además el rol del óxido nítrico en esta respuesta, utilizando para ello distintos fármacos, un dador de óxido nítrico (molsidomine, 4mg/kg) o un inhibidor de nNOS (7NI, 50mg/kg), administrados de manera intraperitoneal inmediatamente antes de tomar la muestra de sangre de T0. Los niveles de corticosterona fueron determinados por radioinmunoensayo.

El ANOVA de 3 vías con medidas repetidas mostró un efecto significativo de la interacción entre fármaco y tiempo ($F_{4,50}$=6.06; p=0.0004) en machos. Por lo tanto, se procedió a evaluar los efectos simples. Se comparó el efecto del tratamiento en cada tiempo, utilizando el test post hoc de Tukey. A T0 (niveles basales de corticosterona) no se observaron diferencias entre los tratamientos. A T30 (pico del estrés agudo) tampoco se encontraron diferencias. Finalmente, a T60 se encontró un incremento

significativo en el tratamiento C + 7NI con respecto al C. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre el tratamiento EP y EP + 7NI. A su vez, no hubo diferencias entre C y C + mol, ni entre EP y EP + mol. El tratamiento C + mol y C + 7NI mostraron niveles de corticosterona significativamente diferentes, lo cual fue observado también en la comparación entre el EP + 7NI y el EP + mol.

A continuación se evaluó el efecto del tiempo dentro de cada tratamiento utilizando el test post hoc de Tukey. Para el grupo C, se observó un incremento significativo de los niveles de corticosterona luego de 30 minutos de estrés, que se revierte luego de 30 minutos de descanso a niveles que no son estadísticamente diferentes del basal (T0). El C + 7NI incrementa los niveles en T30 con respecto a T0, y estos se mantienen elevados en T60 (no hay reversión). En el tratamiento C + mol, se encontró un incremento significativo de los niveles de corticosterona en T30, que se revierten casi totalmente a niveles basales en T60. En cuanto al grupo EP, se observó un incremento significativo de corticosterona en T30 con respecto a T0, que aunque disminuye levemente en T60, es significativamente diferente a los valores de T0 (y no hay diferencias entre T30 y T60). El grupo EP + 7NI incrementa los valores de corticosterona luego de 30 minutos de estrés, y estos se mantienen elevados en T60. Finalmente, el grupo EP + mol no muestra una respuesta significativa al estrés, debido a un incremento en los niveles basales y a una disminución de los niveles del pico de estrés, que aunque no son estadísticamente diferentes de los valores del tratamiento con vehículo, implican una atenuación de la respuesta al estrés.

Resumiendo, se encontró que el 7NI inhibe completamente la reversión del pico de corticosterona, que el molsidomine facilita la reversión de la respuesta al estrés a niveles basales en el control. Se observó que el estrés prenatal induce una alteración en la reversión de la respuesta al estrés, y finalmente que el molsidomine atenúa significativamente la respuesta al estrés en el grupo EP. Los resultados se grafican a continuación (figura 28).

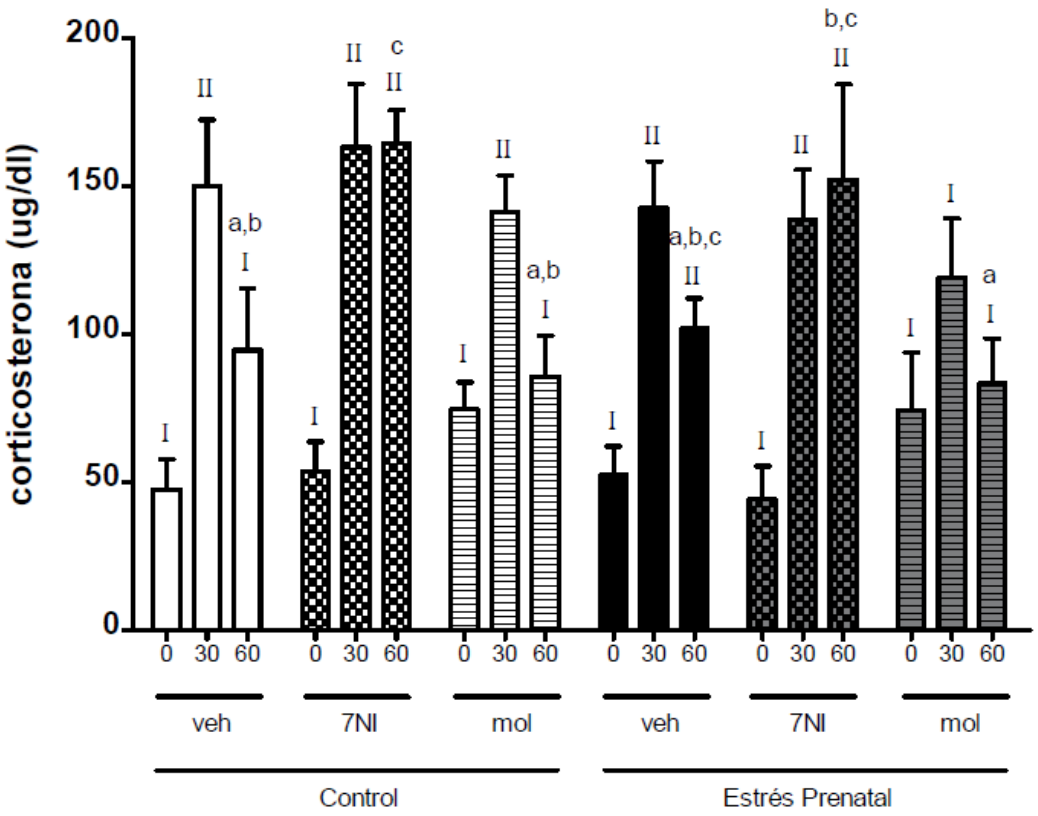


Figura 28: Respuesta del eje HPA al estrés agudo en machos adultos
El gráfico representa los resultados de la evaluación de la respuesta del eje HPA a una sesión de estrés agudo de 30 minutos, estudiando además la modulación de esa respuesta por parte de un dador de óxido nítrico (molsidomine, 4 mg/kg) o un inhibidor de nNOS (7NI, 50 mg/kg). Los resultados se expresan como ug/dl de corticosterona (media ± EE). N=4-6 individuos por grupo experimental. Números romanos distintos indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre tiempos dentro de un mismo tratamiento. Letras distintas (a,b,c) indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos para el mismo tiempo (T0, T30 o T60).

Se estudió la respuesta al estrés agudo y su modulación por la vía del óxido nítrico en hembras. El ANOVA de tres vías con medidas repetidas mostró un efecto significativo de la interacción entre tiempo y fármaco ($F_{4,64}$=4.39; p=0.003). Por lo tanto se procedió a evaluar los efectos simples. Se evaluaron las diferencias entre tratamientos dentro de cada tiempo, utilizando el test post hoc de Tukey. No se observan diferencias entre tratamientos a T0 (niveles basales de corticosterona). En T30 no se encontraron diferencias relevantes entre tratamientos (pico de estrés agudo). Finalmente, en T60 se observan diferencias entre el grupo EP y el EP + 7NI, y entre el C + 7NI y C + mol.

A continuación, se evaluó el efecto del tiempo dentro de cada tratamiento. En el grupo C se encontró un incremento significativo de los niveles de corticosterona en T30 respecto de T0, que se mantuvieron elevados en T60 (no se observa reversión en el tiempo estudiado). Tanto el C + 7NI como el EP + 7NI mostraron un incremento en T30, que se mantuvo elevado en T60. Los grupos C + mol y EP + mol mostraron una respuesta atenuada al estrés, que resultó no significativa: no hubo incremento significativo en T30 con respecto a T0 ni diferencias con T60. Finalmente, el grupo EP mostró un incremento significativo de los niveles de corticosterona en T30, que revirtieron totalmente a niveles basales en T60.

En resumen, se observa que el C no revierte la respuesta al estrés en el tiempo evaluado, el 7NI inhibe la reversión de la respuesta tanto en controles como en hembras estresadas prenatalmente, las hembras EP muestran una rápida reversión de la respuesta al estrés, y tanto el grupo C + mol como EP + mol muestran una respuesta atenuada al estrés agudo, no observándose diferencias entre el pico y el nivel basal de corticosterona. Los resultados se muestran en la figura 29.

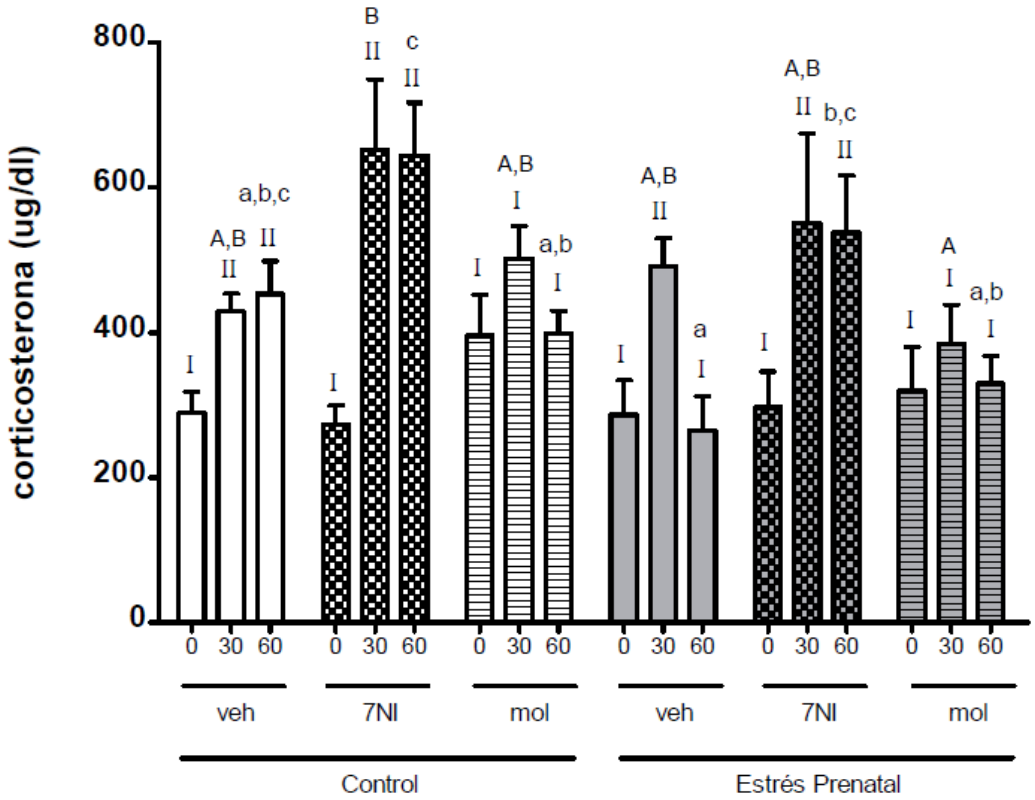


Figura 29: Respuesta del eje HPA al estrés agudo en hembras adultas
El gráfico representa los resultados de la evaluación de la respuesta del eje HPA en ratas hembra a una sesión de estrés agudo de 30 minutos. Los resultados están expresados como ug/dl de corticosterona (media ± EE). N=5-9 individuos por grupo experimental. Números romanos distintos indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre tiempos dentro de un mismo tratamiento. Letras mayúsculas distintas (A,B) indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos en T30. Letras minúsculas distintas (a,b,c) indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos en T60.

4.5.2. Determinación de proteínas por Western Blot

Se evaluaron los niveles de nNOS en hipotálamos de machos y hembras C y EP adultos. No se encontraron diferencias entre machos C y EP (Figura 30A)($t_{6;\ 0.05}$=0.94, NS). A su vez, se observa un incremento significativo ($t_{6;\ 0.05}$=2.746, p=0.034) en los niveles de nNOS en hipotálamos de hembras EP (Figura 30B).

A B

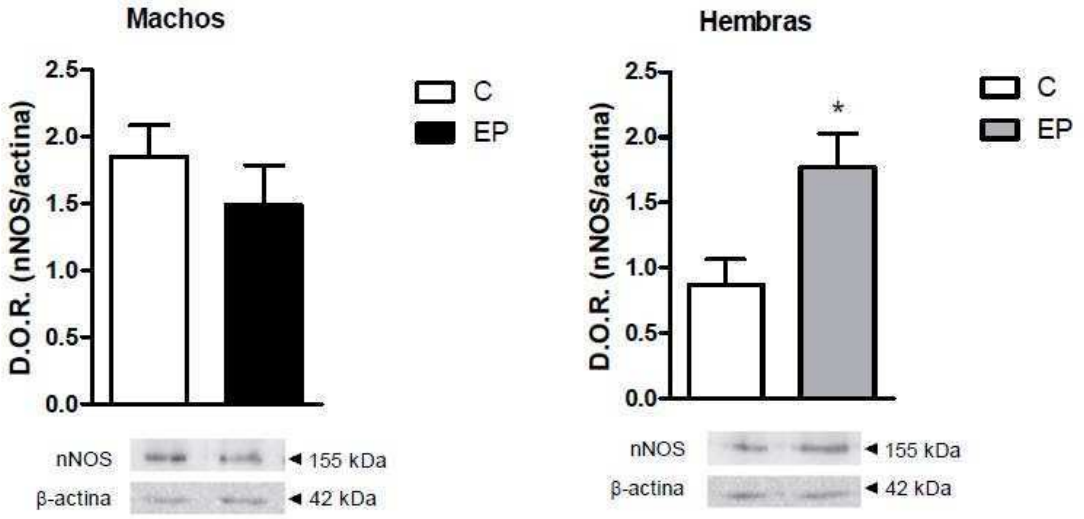


Figura 30: Determinación de los niveles de nNOS en hipotálamo de ratas de 90 días de edad
La figura muestra los resultados de la determinación de los niveles de la enzima nNOS en hipotálamos de ratas adultas, machos (A) y hembras (B). Los resultados se expresan como densidad óptica de las bandas de nNOS relativizada a la densidad óptica de la actina (media ± EE). N=4 animales por grupo experimental. *: p<0.05.

A continuación, se estudió la expresión proteica de GR en hipotálamo. No se encontraron diferencias en los niveles de este receptor en machos (Figura 31A, $t_{6;\ 0.05}$=0.66, NS) ni en hembras (Figura 31B, $t_{6;\ 0.05}$=0.62, NS).

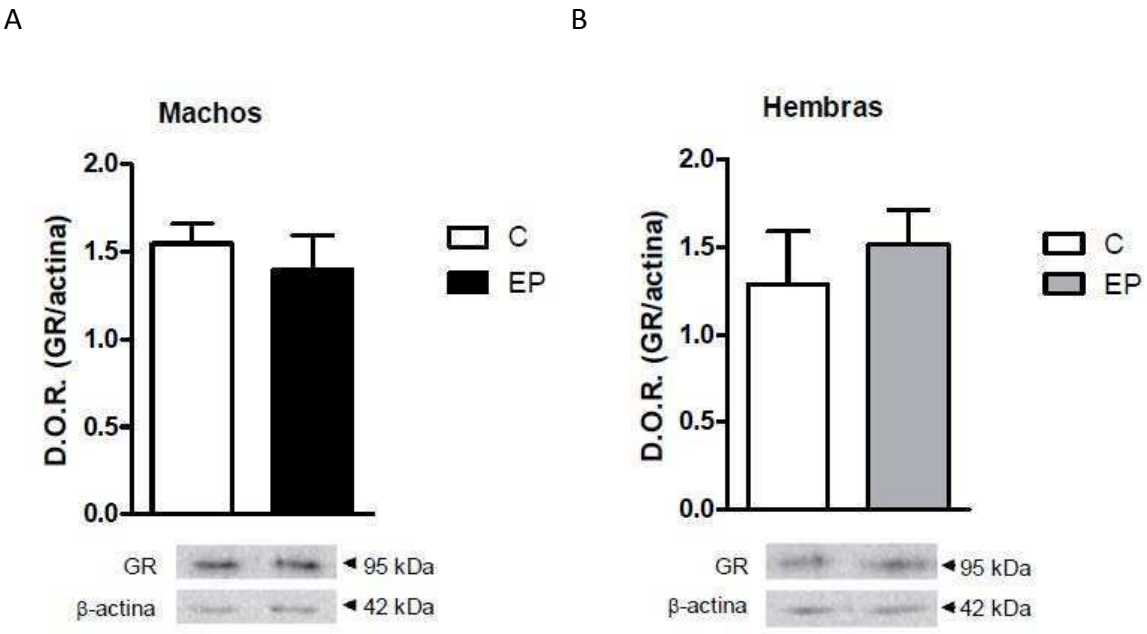


Figura 31: Determinación de los niveles de GR en hipotálamo de ratas de 90 días de edad
La figura muestra los resultados de la determinación de los niveles de GR en hipotálamo de ratas macho (A) y hembra (B) de los grupos control y estrés prenatal. Los resultados se expresan como densidad óptica de las bandas de GR relativizada a la densidad óptica de la actina (media ± EE). N=4 animales por grupo experimental.

4.5.3. Histología

4.5.3.1. Resultados de la Tinción de NADPH diaforasa

Dado que se habían observado cambios en la expresión proteica de nNOS en homogenatos de hipotálamo, se realizaron tinciones de NADPH diaforasa en cortes histológicos que comprendían al núcleo paraventricular del hipotálamo, para evaluar de manera cualitativa que esos cambios se observan también en este núcleo, vinculado a la respuesta fisiológica al estrés. Se encontró una leve disminución en la densidad óptica en machos del grupo estrés prenatal con respecto a los machos del grupo control. En el caso de las hembras se aprecia un incremento en la densidad óptica en las ratas del grupo EP. En ambos casos se refleja lo observado en la determinación de proteínas por Western Blot. Fotomicrografías representativas se grafican a continuación (Figuras 32 y 33).

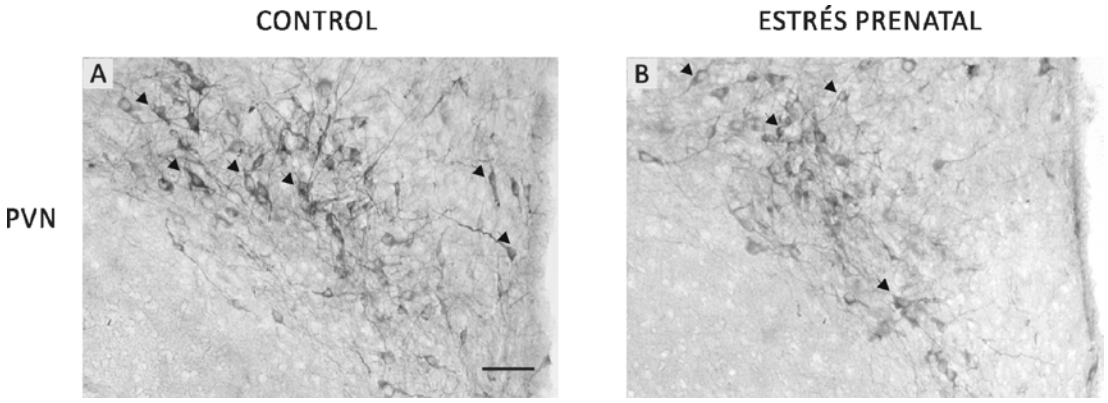


Figura 32: Evaluación de la actividad NADPH diaforasa en el núcleo paraventricular del hipotálamo en machos de 90 días de edad

El panel muestra las fotomicrografías representativas de la tinción de NADPHd correspondientes al núcleo paraventricular del hipotálamo, para machos del grupo control (izquierda) y estresados durante la gestación (derecha). Se observa una disminución en la marca NADPHd positiva. La barra de escala corresponde a 50µm.

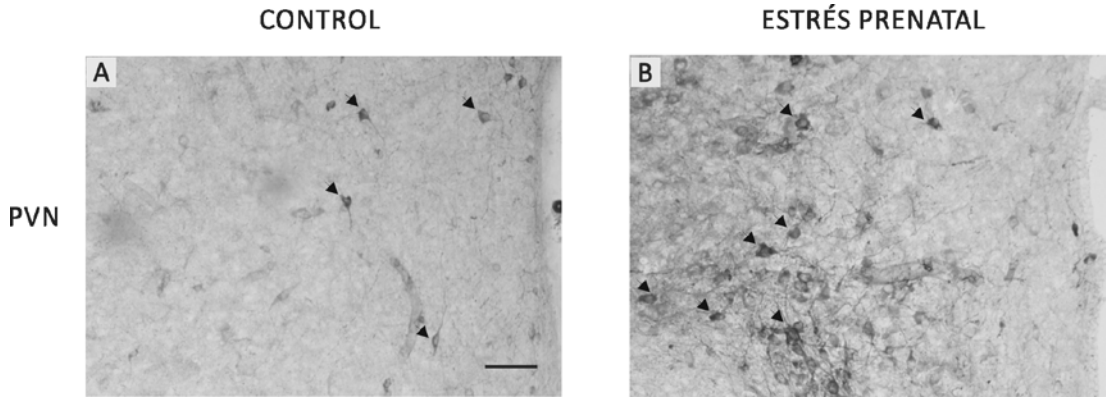


Figura 33: Evaluación de la actividad NADPH diaforasa en el núcleo paraventricular del hipotálamo en hembras de 90 días de edad
El panel superior muestra las fotomicrografías representativas de la tinción de NADPHd correspondientes al núcleo paraventricular del hipotálamo, para hembras del grupo C (izquierda) y EP (derecha). Se encontró un incremento en la marca NADPH positiva en hembras del grupo EP. La barra de escala corresponde a 50µm.

Finalmente, se realizaron tinciones de NADPH diaforasa en cortes que comprenden el núcleo supraóptico del hipotálamo. Las imágenes de machos muestran una aparente disminución en la marca en los individuos del grupo EP (Figura 34). En el caso de las hembras, las imágenes muestran un incremento en la marca inducido por el estrés prenatal (Figura 35).

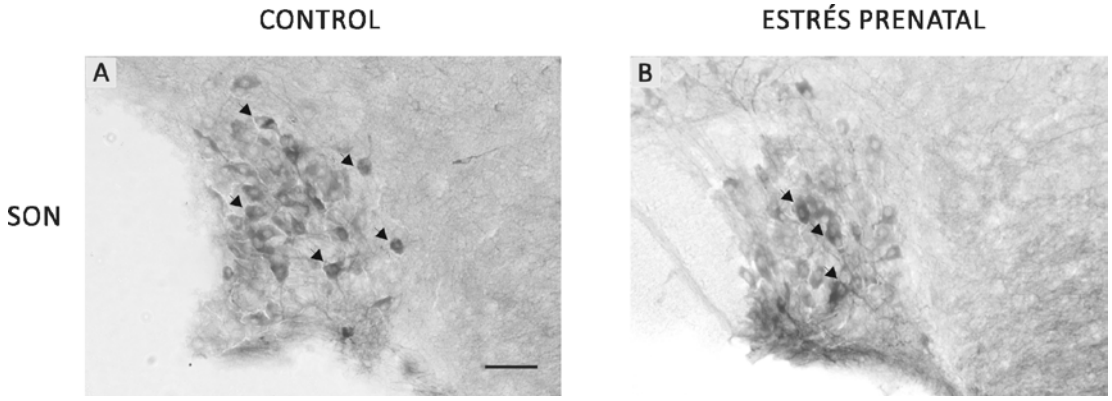


Figura 34: Evaluación de la actividad NADPH diaforasa en el núcleo supraóptico del hipotálamo en machos adultos
El panel muestra las fotomicrografías representativas de la tinción de NADPHd correspondientes al núcleo supraóptico del hipotálamo, para machos del grupo C (izquierda) y EP (derecha). La barra de escala corresponde a 50µm.

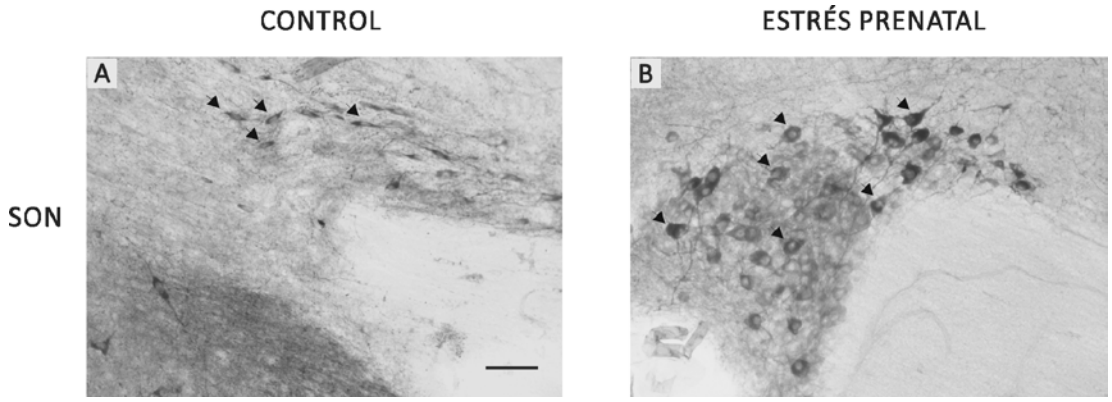


Figura 35: Evaluación de la actividad NADPH diaforasa en el núcleo supraóptico del hipotálamo en hembras adultas

El panel muestra las fotomicrografías representativas de la tinción de NADPHd correspondientes al núcleo supraóptico del hipotálamo, para hembras control (izquierda) y estresadas prenatalmente (derecha). La barra de escala corresponde a 50µm.

Discusión

El estrés durante el desarrollo prenatal induce cambios en la descendencia a nivel de diversos sistemas, tales como el sistema neuroendócrino, el sistema inmune y en diversas estructuras del sistema nervioso central, que resultan en alteraciones en el comportamiento (Cao-lei y col., 2014; Dancause y col., 2011; Weinstock, 2007). Numerosos estudios realizados en modelos animales de estrés prenatal apoyan los cambios observados en humanos, por lo tanto han resultado útiles para profundizar en el conocimiento de los efectos del estrés prenatal y los mecanismos celulares y moleculares subyacentes, para así poder diseñar terapias efectivas para prevenir y revertir sus consecuencias. Es preciso destacar la importancia de la elección del modelo experimental a utilizar, teniendo en cuenta el orden, familia, especie y las diferencias en las distintas cepas. En su trabajo *"The Darwinian concept of stress: benefits of alostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease"* ("El concepto Darwiniano del estrés: beneficios de la alostasis y costos de la carga alostática y su relación costo-beneficio en salud y enfermedad"), Korte y col. abordan la evaluación de la respuesta al estrés tomando en cuenta las variaciones individuales en el comportamiento. Basándose en la teoría de juegos aplicada por Maynard Smith al comportamiento animal, toman el juego *halcón-paloma* para diferenciar dos estrategias distintas de respuesta a desafíos ambientales (englobando ataque de predadores, competencia con con-específicos por los recursos). Resumiendo la descripción de cada estrategia, los halcones muestran, ante la presencia de un competidor o predador, una respuesta de "pelea o huida" (*"fight or flight"*, del inglés original) una mayor actividad del sistema simpático-adrenal, una activación del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG) que se refleja en un incremento en la testosterona circulante en plasma. En cambio, las palomas presentan una respuesta de congelamiento-ocultamiento (*"freeze-hide"*) caracterizada por la activación del eje HPA, incrementándose los niveles circulantes de corticosterona. A su vez, muestran una mayor actividad del sistema parasimpático.

Se considera relevante destacar este tipo de respuestas comportamentales y fisiológicas, porque, al momento de seleccionar el modelo experimental y evaluar los efectos del tratamiento experimental, la respuesta estará condicionada por el modelo experimental elegido. En el caso particular de esta tesis, la elección como modelo de la rata Wistar, una cepa que ha sido seleccionada generación tras generación por su

docilidad que facilita su manipulación en la investigación, condiciona el tipo de respuesta que se espera observar frente al modelo de estrés que se ha aplicado.

A continuación se discuten los resultados correspondientes a cada capítulo en el marco del conocimiento actual de cada área abordada.

5.1. Estudios de comportamiento

Como se ha detallado en la sección Introducción, se ha descripto un amplio repertorio de cambios conductuales desencadenados por el estrés prenatal. Entre estos se destacan cambios en el comportamiento de tipo ansiogénico (Morley-Fletcher y col., 2011), en el comportamiento social (Lee y col., 2007) y en procesos de aprendizaje y memoria (Lemaire y col., 2000; Lui y col., 2011; Wu y col., 2007; Markham y col., 2010), entre otros. En consistencia con estos y muchos otros resultados publicados, en este trabajo se han encontrado cambios en el comportamiento de las crías adultas estresadas prenatalmente. En particular, se ha observado un incremento en el comportamiento de tipo ansiogénico en machos, evaluado en el laberinto elevado en cruz. Estos animales pasaron una menor cantidad de tiempo en el brazo abierto, expuesto, del laberinto, y realizaron un menor número de entradas a los mismos que las ratas macho del grupo control, exhibiendo por lo tanto un incremento en el comportamiento de tipo ansiogénico (Pellow y col., 1985). A su vez, se observó que los machos mostraron un peor desempeño en una tarea de aprendizaje asociativo, que requiere la adquisición de memoria explícita, dependiente del hipocampo, como es el test de evitación inhibitoria. Estos presentaron una menor latencia que los controles para cruzar hacia el compartimiento donde 24 horas antes habían recibido una descarga eléctrica. Sin embargo, no se encontraron diferencias en parámetros relacionados con el comportamiento exploratorio evaluados con el test de campo abierto. Machos del grupo control y del grupo EP mostraron similar actividad locomotora y exploración vertical. Aún más, ambos grupos experimentales presentaron una análoga habituación al ambiente cuando fueron re-expuestos 24 horas después, de manera que el tratamiento no produjo cambios en un tipo de aprendizaje no asociativo. Se ha demostrado previamente que procesos de memoria asociativa y no asociativa dependiente de hipocampo comparten algunos procesos celulares, como la participación de los receptores NMDA del área CA1 de hipocampo, mientras que difieren en otros. Particularmente, la habituación espacial no requeriría de cambios en la actividad de PKA a largo plazo, de la vía de señalización de proteínas kinasa activadas por mitógeno (MAPK), ni de síntesis *de novo* de proteínas (Vianna y

col., 2000). Estas diferencias en los procesos celulares implicados podrían explicar por qué no se han observado cambios en el caso no asociativo y sí en el experimento asociativo, si alguna de estas vías de señalización estuviera diferencialmente afectada por el estrés prenatal. En cuanto al análisis de los parámetros del test de campo abierto relacionados con el comportamiento de tipo ansiogénico, no se detectaron diferencias significativas, aunque se aprecia una disminución del tiempo que los machos EP pasaron en el centro y en el número de entradas al mismo. El uso de un test más sensible para evaluar comportamiento de tipo ansiogénico, el laberinto elevado en cruz, permitió resaltar las diferencias entre controles y EP.

La evaluación conductual de las hembras de 90 días de edad reveló resultados diferentes del caso de los machos, pero esperables según la bibliografía (Van den Hove y col., 2013). No se observaron diferencias en la actividad exploratoria (actividad locomotora y exploración vertical) ni en el comportamiento de tipo ansiogénico, evaluados en el test de campo abierto y el laberinto elevado en cruz. Ambos grupos experimentales mostraron similar memoria de habituación, no asociativa, y un equivalente nivel de aprendizaje asociativo en el test de evitación inhibitoria, evaluado en su latencia a cruzar al compartimiento oscuro. El efecto dimórfico del estrés prenatal en el comportamiento de tipo ansiogénico fue previamente documentado. Sin embargo existe cierta variabilidad en las publicaciones: la mayoría ha encontrado un incremento en el comportamiento de tipo ansiogénico en machos, pero en hembras los resultados son dispares. Xu y col. 2014 y Zagron & Weinstock 2006 han publicado un incremento en el comportamiento de tipo ansiogénico en hembras, mientras que Van den Hove y col. 2013 y Sun y col. 2013 no reportaron cambios en este género, similar a lo informado en este trabajo de tesis. Estas discrepancias se pueden deber a variaciones en el modelo de estrés aplicado y a la edad a la que se evaluó a las crías. En particular, en el trabajo de Xu y col se estresó a las madres desde el dia prenatal 8 al 21, y se evaluó a las crías en PN30 (este grupo utilizó ratas de la cepa Sprague Dawley). En el caso de Zagron & Weinstock 2006, se aplicó el estrés prenatal en ratas Wistar desde el día 14 a 21, en una exposición por día de 30 minutos y se evaluó el comportamiento a los 35 días de edad. En cambio en los trabajos de Van den Hove y col., 2013 y Sun y col., 2013 se aplicó el estrés prenatal desde el día 14 a 21, 3 veces por día, 45 minutos por vez, al igual que en este trabajo, y se evaluó a las

crías en la adultez, a los 120 o 90 días de edad respectivamente. En estos casos se utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawley. Por lo tanto, es posible que las diferencias en los resultados reportados se deban a la edad en que se evaluó a las crías (juveniles o adultos) y/o la longitud temporal del modelo de estrés aplicado.

Resultados dimórficos se han observado a su vez en modelos de aprendizaje. Se han publicado defectos en memoria espacial en machos pero no en hembras (Nishio y col., 2001; Zagron & Weinstock, 2006) Incluso se ha publicado una mejora en el aprendizaje espacial en hembras estresadas prenatalmente, con respecto al control (Zuena y col., 2008). En este último trabajo se encontró una disminución en la neurogénesis hipocampal adulta en machos EP pero no en hembras. Por lo tanto, se puede concluir, en base a los resultados de este trabajo y en concordancia con lo previamente publicado, que el efecto del estrés prenatal sobre el comportamiento depende del género, mostrando los machos una mayor vulnerabilidad, mientras que las hembras presentan resiliencia al estrés prenatal.

5.2. Determinación de la ganancia de peso

Se evaluó la ganancia de peso de las crías desde el destete (21 dias de edad) hasta los 90 días, pesando a los animales una vez por semana. No se encontraron diferencias entre las hembras de ambos grupos experimentales a lo largo del período evaluado. En el caso de los machos, a partir de la semana 8 de determinación del peso (es decir, desde PN70) parece empezar a disminuir la ganancia de peso en el grupo EP con respecto al control, lo cual explicaría que en el análisis estadístico la interacción entre semana y tratamiento fue significativa. Sin embargo el test post hoc no reveló diferencias significativas, probablemente porque su potencia sea menor que la del ANOVA de medidas repetidas. Es preciso considerar que como no se cumplió el supuesto de esfericidad, los grados de libertad del error fueron corregidos por el coeficiente de Huyn-Feldt, lo que resulta en una disminución de su valor, y por lo tanto de la potencia del test estadístico. Estos resultados no difieren de los publicados por Bowman y col., 2004. Estos autores, que utilizaron el mismo modelo de estrés pero en ratas Sprague Dawley, no encontraron diferencias en el peso de machos ni de hembras entre los 20 y los 80 días de edad.

5.3. Efecto del estrés prenatal sobre el óxido nítrico hipocampal

En vista de los cambios conductuales observados en este modelo experimental, a continuación se evaluó si el mismo indujo cambios sobre el óxido nítrico (NO) en hipocampo, una estructura cerebral clave en procesos de aprendizaje y en exploración espacial, y en la modulación del eje HPA. Los ensayos de actividad enzimática de la NOS, la enzima que sintetiza NO, a edades tempranas (PN7 y PN15) no mostraron diferencias en machos. En el caso de las hembras, se pudo detectar un leve incremento de la actividad total en PN7 (sin cambios en PN15). Este cambio dependería especificamente de un aumento de nNOS, dado que la actividad en presencia de un inhibidor de nNOS no mostró cambios. En los adultos, a PN90, se encontró una disminución de la actividad total de NOS en machos pero no en hembras. Dado que la PKC puede afectar la actividad de NOS, se determinó su actividad tanto a edades tempranas como en los adultos, no encontrando diferencias entre C y EP en ningún caso. Por lo tanto los cambios de la actividad de NOS observados no se deberían a una modulación por PKC.

El análisis por Western Blot de extractos proteicos de hipocampo en animales adultos mostró una disminución de los niveles de nNOS en machos pero no en hembras, corroborando lo observado en el ensayo de actividad enzimática, e indicando que las diferencias en esta se deberían a una disminución de nNOS en los machos EP. Dado que el hipocampo es una estructura heterogénea, con áreas celulares bien diferenciadas y una clara diferenciación funcional en el eje dorso-ventral (van Strien y col., 2009; Fanselow & Dong, 2010), se evaluaron los niveles de nNOS mediante técnicas de inmunohistoquímica. A su vez, se utilizó la tinción de NADPH diaforasa, que es indicadora la actividad total de NOS en tejido (Hope y col., 1991). Ambas tinciones mostraron una disminución del número de células marcadas específicamente en el área CA1 de hipocampo, sólo en machos EP. En el Giro Dentado se aprecia una disminución, que no resultó significativa, mientras que en el área CA3 no se aprecian cambios. Por lo tanto, hasta este punto se puede afirmar que los cambios en la actividad de NOS en hipocampo de machos adultos se deberían a una disminución en

los niveles proteicos de la enzima en el área CA1. Es destacable que las hembras, que no mostraron cambios en su comportamiento producto del estrés prenatal, no presentaron cambios significativos en la actividad enzimática ni en los niveles de NOS.

En este trabajo se ha desarrollado ampliamente la diversidad de funciones de los glucocorticoides. Recientemente se ha publicado que el receptor GR está involucrado en procesos de aprendizaje, particularmente en el test de evitación inhibitoria (Chen y col., 2013). Estos autores determinaron que un antagonista de GR administrado en el hipocampo dorsal induce un defecto en la memoria asociativa. Ese tratamiento afectó particularmente la fosforilación de CREB, CAMKIIα, Akt, PLCγ, el receptor de BDNF TrkB y los niveles de la subunidad GluR1 del receptor AMPA (Chen y col., 2013). Estos autores demostraron que la infusión de BDNF recombinante rescata el fenotipo de los animales que recibieron el inhibidor de GR.

En vista de la participación de GR en procesos de aprendizaje, se estudiaron los niveles del receptor de glucocorticoides en hipocampo de machos y hembras adultos de ambos tratamientos. El análisis de los resultados del Western Blot demostró una disminución en los niveles de GR en machos del grupo EP con respecto a su control. En el caso de las hembras, se aprecia un aumento, no significativo. El estudio de este receptor mediante técnicas inmunohistoquímicas demostró que la disminución de GR esta circunscripta al área CA1 del hipocampo, aunque una leve disminución se puede detectar en el GD. En el caso de las hembras, nuevamente no se detectaron cambios.

5.4. Estudio del rol del óxido nítrico en el aprendizaje

Como se ha descripto en la introducción, numerosos trabajos han reportado sobre el rol del óxido nítrico en procesos de aprendizaje dependientes de hipocampo. Con el fin de demostrar si los cambios en la producción de NO en hipocampo están relacionados con el peor desempeño de los machos del grupo EP en el test de evitación inhibitoria, se utilizó una estrategia farmacológica. El tratamiento con un inhibidor de nNOS (7NI) en machos controles condujo a una disminución marcada en la latencia a cruzar al compartimiento oscuro, significativamente diferente de los controles que recibieron vehículo en lugar del inhibidor, e indiferenciable de las latencias que presentaron las ratas del grupo EP. Esto demuestra una vez más la importancia de nNOS en este paradigma de aprendizaje asociativo. La administración de un dador de NO a los machos del grupo EP condujo a una reversión parcial de los niveles de la latencia, de manera que estos no fueron estadísticamente diferentes del control que recibió vehículo. Sin embargo, hay que mencionar que estos valores no difirieron significativamente de los de los machos EP que recibieron vehículo. Esto podría deberse a que la dosis utilizada no fue suficiente, de manera que los niveles biodisponibles del compuesto en hipocampo no alcanzaron a restaurar la normal fisiología celular de los procesos implicados. Por otro lado, procesos complejos como el aprendizaje no pueden ser reducidos a una única vía de señalización, y es factible que otros mediadores necesarios para el mismo hayan sido afectados por el estrés durante la gestación.

En relación a los cambios en GR y nNOS, es interesante destacar que se ha publicado que la inhibición de nNOS mediante 7NI inhibe el incremento de BDNF inducido por una tarea de aprendizaje espacial (Mizuno y col., 2000). A su vez, se ha determinado que el condicionamiento aversivo conlleva un incremento de corticosterona que se observa rápidamente, y la reexposición al contexto 24 horas después induce un nuevo incremento de corticosterona. Estos autores han observado que en ratones en los que se ha anulado la expresión de nNOS estos incrementos de corticosterona no se producen (y tampoco se observa la respuesta conductual al contexto)(Kelley y col., 2011). De esta manera, es posible que nNOS y GR participen de la misma vía de

señalización que es gatillada en el aprendizaje dependiente de hipocampo y conduce al incremento de BDNF necesario para la formación de memoria.

5.5. Estudio del efecto del estrés prenatal sobre el eje HPA

El óxido nítrico está involucrado en la regulación de la respuesta al estrés. Particularmente, está establecido que tanto los núcleos supraóptico y paraventricular expresan altos niveles de nNOS (Vincent & Kimura, 1992; Grassi y col., 2013). Con el fin de determinar su participación en este modelo de estrés prenatal, se determinaron los niveles de nNOS en homogenatos de hipotálamo mediante la técnica de Western Blot. Se observó una leve disminución de los niveles de nNOS en machos adultos estresados prenatalmente, que no resultó significativa. En el caso de los hembras, se detectó un incremento significativo de los niveles de nNOS en el hipotálamo con respecto al control. Para investigar si estos cambios podrían observarse en las áreas que están involucradas específicamente en la respuesta al estrés, se evaluó cualitativamente la actividad de nNOS mediante la tinción de NADPH diaforasa en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo en cortes histológicos. En el caso de los machos del grupo EP la intensidad de la marcación fue menor, mientras que en las hembras se aprecia un incremento en la misma.

Para estudiar el rol del NO en un contexto fisiológico, se evaluaron los niveles de corticosterona y su posible modulación por NO en crías de 7 días de edad (PN7) y en adultos. Se observó que en las crías de PN7 el 7NI induce una leve disminución en los niveles basales de corticosterona en los machos control pero no en los del grupo EP. En el caso de las hembras, no se detectaron cambios en ninguno de los casos, lo cual podría deberse a la alta variabilidad observada en los resultados. Luego se evaluó en los adultos la modulación de la respuesta al estrés agudo mediada por nNOS. El estrés agudo indujo un incremento de los niveles de corticosterona en plasma en machos, que descendió más rápidamente en los controles que en EP luego del estrés. Se demostró además que la inhibición de nNOS conduce a un aumento sostenido de corticosterona en respuesta al estrés. Es interesante destacar que los niveles de corticosterona en el grupo EP + 7NI 30 minutos luego del estrés no fueron estadísticamente diferentes de los del EP. Esto podría apuntar a que una disminución de nNOS en el EP está involucrada en esta desregulación del eje HPA. La infusión de un

dador de NO (molsidomine) en el grupo control facilitó la disminución de los niveles de corticosterona de manera que luego del estrés estos regresaron a valores similares a los basales. En el grupo EP, el molsidomine atenuó la respuesta al estrés de manera que no se observaron diferencias significativas ni en el pico luego de 30 minutos de exposición ni luego de los 30 minutos posteriores. Observando estos resultados parece apreciarse una acción dual del molsidomine administrado por vía intraperitoneal en la respuesta al estrés:

-un leve incremento en los niveles basales de corticosterona

-una facilitación en el retorno a niveles basales luego del estrés

El incremento en los niveles basales observado fue un evento considerablemente rápido, dado que el agente fue inyectado e inmediatamente después fue tomada la muestra de sangre. Por lo tanto se podría hipotetizar que esta acción no es a nivel central sino periférica. Respecto a esto, Mohn y col., 2005, determinaron que el NO participa en la rápida liberación de corticosterona en las glándulas adrenales.

La atenuación en la respuesta al estrés observada en los machos EP tratados con molsidomine podría deberse a un efecto compensatorio frente a los reducidos niveles de NO endógenos. Se puede hipotetizar que en respuesta a esto se haya incrementado la capacidad de respuesta del sistema al NO, posiblemente a través de un incremento en los niveles de la guanilato ciclasa soluble. De esta manera, al restaurar los niveles de NO por la vía farmacológica se produciría una respuesta anormal, desapareciendo el pico característico de corticosterona. Sin embargo, esto debe ser comprobado experimentalmente.

Hay diversas publicaciones que evaluan el rol del NO a nivel central en la liberación de corticosterona, sin embargo no hay un claro consenso acerca de su acción, probablemente debido a la diversidad de aproximaciones experimentales que se han utilizado. Se ha publicado que la inhibición de nNOS incrementa los niveles de ARN mensajero de CRH en el PVN y de POMC en la glándula pituitaria (Givalois y col., 2002). El NO además atenúa la respuesta del eje HPA al estrés anafiláctico y la inhibición de NOS estímula el incremento de los niveles de corticosterona en plasma (Monasterio & Morales, 2011). A su vez, se ha demostrado que la exposición a estrés fótico incrementa los niveles circulantes de ACTH y corticosterona y la infusión de L-NAME potencia ese efecto, mientras que un dador de NO lo atenúa (Weidenfeld y col., 1999).

En contraste, en ratas anestesiadas la infusión de un dador de NO sobre el PVN incrementó los niveles de corticosterona en plasma (Okada y col., 2002) y en ratas despiertas estimuló la liberación de ACTH (Seo & Rivier, 2001). Bugajski y col. demostraron que la inhibicion de NOS con L-NAME potencia el efecto de un agonista colinérgico en la liberación de ACTH y corticosterona, sin embargo estos mismos autores encontraron luego que tanto 7NI como L-NAME contrarrestan la estimulación del Eje HPA ejercida por un agonista adrenérgico (Bugajski y col., 2006; Gadek-michalska & Bugajski, 2008). Las diferencias en los resultados publicados podrían deberse a que algunos autores evaluaron el rol del NO en el contexto de la respuesta a un estresor, mientras que otros lo estudiaron en estado basal, en animales anestesiados o en respuesta a moduladores farmacológicos del sistema colinérgico o adrenérgico. En este trabajo, donde se evaluó la función del NO en la respuesta fisiológica al estrés agudo, los resultados indican su participación en la inhibición del eje HPA luego de la exposición a estrés. En relación a esta posible función inhibitoria del NO, Stern (2004) relevó trabajos relacionados con la modulación de la actividad neuronal en el PVN mediada por NO. En esa revisión, este autor da cuenta de trabajos donde se demostró que el NO inhibe la actividad eléctrica de neuronas magnocelulares y en neuronas preautonómas, a través de la potenciación de la señalización GABAérgica.

Es preciso destacar la participación del NO en la modulación del eje HPA en múltiples niveles. Además de las acciones hipotalámicas ya mencionadas el NO puede modular los niveles circulantes de glucocorticoides actuando a nivel de las glándulas adrenales. Se ha descripto que el NO disminuye la liberación de corticosterona en células de la zona fasciculata adrenal en ratas, atenuando a su vez la respuesta a ACTH. El efecto ocurriría a través de una inhibición en la síntesis de pregnenolona y progesterona a partir de colesterol, lo cual indicaría una inhibición de la enzima citocromo P450 scc (Cymeryng y col., 1998). A su vez el NO disminuye la expresión de StAR, fundamental para la síntesis de GC ya que está involucrada en el transporte del colesterol (Cymeryng y col., 2002). Por otro lado ya se ha mencionado que Mohn y col. describieron un efecto estimulador del NO en la liberación de corticosterona. En principio estos resultados no serían contradictorios ya que los tiempos de incubación evaluados son marcadamente diferentes, en este último caso se usaron incubaciones

de 15 minutos mientras que en los casos anteriores las incubaciones fueron de 60 minutos. Esto es consistente con los resultados descriptos en este trabajo de tesis, dado que se observa un leve incremento en la liberación de corticosterona en animales tratados con un dador de NO (lo cual es un efecto rápido, verificable apenas un minuto luego de recibir la droga) y a su vez se observa una facilitación en la reversión a niveles basales, evaluada a 60 minutos de que el animal recibiera la droga (y luego de 30 minutos de recuperación luego del estrés agudo).

El análisis de la modulación de la respuesta al estrés agudo por parte del NO en hembras control y estresadas prenatalmente dio resultados diferentes de lo observado en machos. En las hembras control el estrés agudo incrementó los niveles de corticosterona, pero estos se mantuvieron elevados 30 minutos después de cesar el estrés. En cambio, en las hembras del grupo EP la reversión fue total, mostrando valores indiferenciables de los basales. La inhibición de nNOS mediante 7NI inhibió la reversión tanto en controles como en EP, mientras que la infusión de molsidomine, dador de NO, atenúo la respuesta en ambos grupos experimentales, de manera que no se observa un pico significativamente diferente del basal. Por lo tanto, las hembras del grupo control necesitan mayor tiempo que las EP para retornar los niveles de corticosterona a estado basal. Esto puede estar relacionado con el incremento en los niveles de nNOS observados en el hipotálamo de las hembras adultas estresadas prenatalmente. En comparación con los resultados observados en machos, es interesante destacar que los niveles basales de corticosterona en hembras fueron en promedio hasta 6 veces más altos que los de los machos.

Estudios previos en ratones han determinado que los niveles de nNOS en hipocampo de hembras son menores que en el hipocampo de machos. Estos autores demostraron que la diferencia se debe a los menores niveles de estradiol en el hipocampo de hembras con respecto a machos, encontrando que esta hormona estimula la expresión de nNOS (Hu y col., 2012). A su vez, se ha determinado que la expresión de nNOS en hipocampo varía según el estadio del ciclo estral de la hembra, mostrando un pico en el proestro (que se corresponde con el pico de estradiol) (Hu y col., 2012; Gotti y col., 2009). Esta dependencia de nNOS con respecto al estradiol ha sido reportada también en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo en ratas (Grassi y col., 2013). Comparando los resultados de inmunohistoquímica de nNOS, en este trabajo se

comprueba el menor número de células marcadas en hipocampo en las hembras con respecto a los machos. Dada la participación del NO en la modulación de la respuesta al estrés agudo, es posible que los menores niveles de nNOS en hembras con respecto a machos estén relacionados con el mayor tiempo que les lleva a las hembras control retornar los niveles de corticosterona a estado basal. Es destacable que tanto las hembras control como del grupo EP mostraron una respuesta atenuada al estrés debido a la infusión del dador de NO, similar a lo observado en machos del grupo EP. Teniendo en cuenta las evidencias ya mencionadas de que las hembras expresan menores niveles de nNOS, el incremento en la sensibilidad al NO puede formar parte de un mecanismo compensatorio.

5.6. Conclusiones generales

En este trabajo se ha observado que el estrés prenatal induce cambios a largo plazo en las crías, observándose en los machos una mayor vulnerabilidad y en las hembras una mayor resiliencia a los efectos del tratamiento.

En relación al comportamiento se ha observado:

-Similar comportamiento exploratorio y memoria de habituación en machos y hembras de ambos tratamientos.

-Un incremento en el comportamiento de tipo ansiogénico en machos EP, sin cambios en las hembras.

-Un peor desempeño de los machos en una tarea de aprendizaje asociativo, dependiente de hipocampo, sin cambios observados en las hembras.

- No se encontraron diferencias respecto a la ganancia de peso desde el destete a la adultez ni en machos ni en hembras.

En hipocampo se observó:

-Un incremento en la actividad de NOS en hembras de PN7.

-Una disminución en la actividad de NOS en machos adultos del grupo EP, sin cambios significativos en las hembras.

-Una disminución en los niveles de nNOS y GR en homogenatos de hipocampo en machos, sin cambios en las hembras.

-Una disminución en el número de células positivas para nNOS y GR y para la tinción NADPH diaforasa en el área CA1 del hipocampo en machos EP, sin cambios en las hembras.

-No se observaron cambios en la actividad de PKC a edades tempranas ni en el adulto.

En vista de los cambios en el óxido nítrico en el hipocampo, se evaluó su rol en el aprendizaje asociativo en machos. La modulación farmacológica mostró los siguientes resultados:

-un peor desempeño en machos control tratados con un inhibidor de nNOS, similar al de los machos EP.

-una reversión parcial del efecto del estrés prenatal en el desempeño en esta tarea en los machos EP tratados con un dador de NO.

El estrés prenatal indujo cambios en el eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal. Se observó:

-un defecto en la modulación de los niveles de corticosterona por 7NI en machos de PN7, sin cambios en las hembras.

-una lenta recuperación de la corticosterona a niveles basales luego del estrés agudo en machos EP y una rápida recuperación en las hembras EP, conjuntamente con una atenuación en la respuesta al estrés en machos EP, hembras control y hembras EP tratadas con un dador de NO.

A continuación se propone un esquema representativo de la participación del NO en este modelo de estrés prenatal:

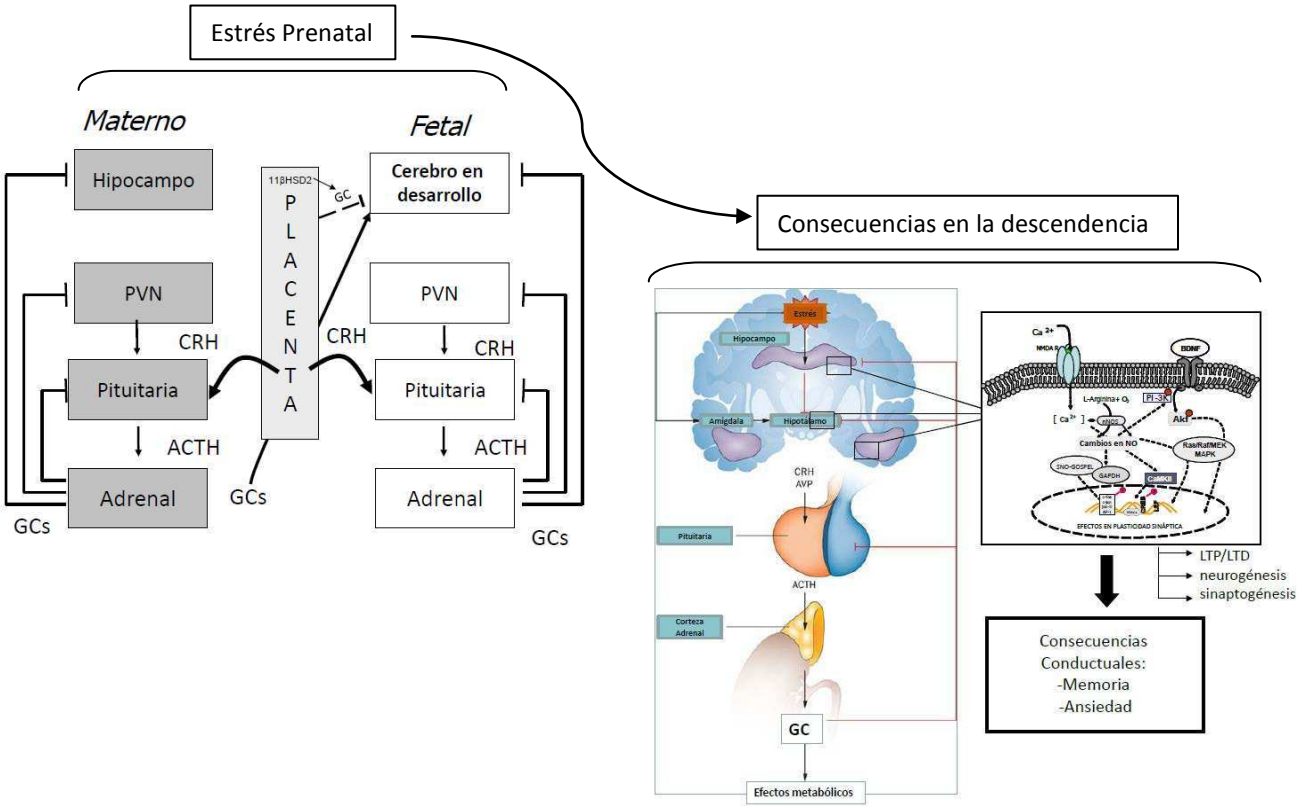


Figura 36: Participación del óxido nítrico en las alteraciones comportamentales y neuroendócrinas inducidas por estrés prenatal

El panel izquierdo muestra la interrelación entre el eje HPA materno y fetal. Un incremento sostenido de los glucocorticoides inducido por estrés prenatal afecta al cerebro en desarrollo induciendo cambios que perduran en la adultez, afectando la respuesta al estrés. El panel derecho muestra una de las posibles vías moleculares implicadas en los efectos del estrés prenatal a largo plazo. Los cambios en los niveles de óxido nítrico en el sistema límbico y en el hipotálamo afectarían procesos de plasticidad que se evidencian en cambios en el comportamiento.

La exposición de mujeres embarazadas a situaciones estresantes de manera crónica tiene efectos que pueden observarse en la descendencia, afectando su normal desarrollo cognitivo. El diseño de modelos experimentales para el estudio del estrés prenatal ha permitido traer luz sobre algunos de los procesos involucrados. Los resultados presentados en este trabajo contribuyen al conocimiento del rol del óxido nítrico en este modelo de estrés prenatal, resaltando la importancia de un normal funcionamiento de la señalización nitrérgica en múltiples sistemas fisiológicos. El reconocimiento del riesgo al que está expuesto el feto cuando la madre atraviesa situaciones de estrés conjuntamente con el esclarecimiento de los mecanismos celulares y moleculares implicados permitirá el desarrollo de estrategias que permitan prevenir y/o remediar las posibles alteraciones causadas por el estrés prenatal.

Bibliografía

Alderton, W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. 2001. “Nitric Oxide Synthases: Structure, Function and Inhibition.” *Biochemical Journal* 357:593–615.

Almonte A.G., Quadri L.H., Sultan F.A., Watson J.A., Mount D.J., Rumbaugh G., Sweatt, J.D. 2014. “Protease-Activated Receptor-1 Modulates Hippocampal Memory Formation and Synaptic Plasticity.” *Journal of neurochemistry* 124(1):109–22.

Arabia A.M., Catapano L., Storini C., Perego C., De Luigi A., Head G.A., De Simoni M.G. 2002. “Impaired Central Stress-Induced Release of Noradrenaline in Rats with Heart Failure: A Microdialysis Study.” *Neuroscience* 114(3):591–99.

Asser L., Hescot S., Viegchareun S., Delemer B., Trabado S., Lombès M. 2014. “Autocrine Positive Regulatory Feedback of Glucocorticoid Secretion: Glucocorticoid Receptor Directly Impacts H295R Human Adrenocortical Cell Function.” *Molecular and cellular endocrinology* 395(1-2):1–9.

Avishai-Eliner S., Brunson K.L., Sandman C.A., Baram T.Z. 2002. “Stressed-Out, or in (utero)?” *Trends in neurosciences* 25(10):518–24.

Ayala, J.E., Chen Y., Banko J.L., Sheffler D.J., Williams R., Telk A.N., Watson N.L., Xiang Z., Zhang Y., Jones P.J., Lindsley C.W., Olive M.F., Conn P.J. 2010. “mGluR5 Positive Allosteric Modulators Facilitate Both Hippocampal LTP and LTD and Enhance Spatial Learning.” *Neuropsychopharmacology* 34(9):2057–71.

Barker, D.J.P. 1995. “The Fetal Origins of Adult Disease.” *Proceedings of The Royal Society. Biological Sciences* 262:37–43.

Bliss, T. & Lømo T. 1973. “Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Anaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path.” *The Journal of physiology* 232:331–56.

Bon, C.L.M. & Garthwaite J. 2001. “Nitric Oxide-Induced Potentiation of CA1 Hippocampal Synaptic Transmission during Baseline Stimulation Is Strictly Frequency-Dependent.” *Neuropharmacology* 40(4):501–7.

Bowman R.E., Maclusky N.J., Sarmiento Y., Frankfurt M., Gordon M., Luine V.N. 2004. “Sexually Dimorphic Effects of Prenatal Stress on Cognition, Hormonal Responses, and Central Neurotransmitters.” *Endocrinology* 145(8):3778–87.

Bredt D.S., Ferris C.D., Snyder S.H. 1992. “Nitric Oxide Synthase Regulatory Sites.” *The Journal of biological chemistry* 267(16):10976–81.

Bredt D.S. & Snyder S.H. 1989. “Nitric Oxide Mediates Glutamate-Linked Enhancement of cGMP Levels in the Cerebellum.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(22):9030–33.

Brown E.S., Rush A.J., McEwen B.S. 1999. “Hippocampal Remodeling and Damage by Corticosteroids: Implications for Mood Disorders.” *Neuropsychopharmacology* 21(4):474–84.

Bugajski A.J., Gadek-michalska A., Bugajski J. 2006. "The Involvement of Nitric Oxide and Prostaglandins in the Cholinergic Stimulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response During Crowding Stress." *Journal of Physiology and Pharmacology* 57(3):463–77.

Burke S.J., Updegraff B.L., Bellich R.M., Goff M.R., Lu D., Minkin Jr. S.C., Karlstad M.D., Collier J.J. 2013. "Regulation of iNOS Gene Transcription by IL-1β and IFN-γ Requires a Coactivator Exchange Mechanism." *Molecular endocrinology* 27(10):1724–42.

Bush M.A. & Pollack G.M. 2000. "Pharmacokinetics and Protein Binding of the Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor 7-Nitroindazole." *Biopharmaceutics & drug disposition* 21:221-228.

Canzobre M.C. & Ríos H. 2010. "Pulpar Tooth Injury Induces Plastic Changes in S100B Positive Astroglial Cells in the Trigeminal Subnucleus Caudalis." *Neuroscience letters* 470(1):71–75.

Canzobre M.C. & Ríos H. 2011. "Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate/neuronal Nitric Oxide Synthase-Positive Neurons in the Trigeminal Subnucleus Caudalis Involved in Tooth Pulp Nociception." *Journal of neuroscience research* 89(9):1478–88.

Cao X, Laplante D.P., Brunet A., Ciampi A., King S. 2011. "Brief Report Prenatal Maternal Stress Affects Motor Function in 5½-Year-Old Children: Project Ice Storm." *Developmental Psychobiology* 56:117–25.

Cao-Lei L., Massart R., Suderman M.J., Machnes Z., Elgbeili G., Laplante D.P. Szyf M. 2014. "DNA Methylation Signatures Triggered by Prenatal Maternal Stress Exposure to a Natural Disaster: Project Ice Storm." *PloS one* 9(9):e107653.

Carletti F., Ferraro G., Rizzo V., D´Agostino S., Lonobile G., Sardo P. 2009. "Nitric Oxide- and cGMP-Active Compounds Affect the Discharge of Substantia Nigra Pars Reticulata Neurons: In Vivo Evidences in the Rat." *Journal of neural transmission* 116(5):539–49.

Chen D.Y., Bambah-Mukku D., Pollonini G., Alberini C.M. 2013. "Glucocorticoid Receptors Recruit the CaMKIIα, BDNF–CREB Pathways to Mediate Memory Consolidation." *Nature Neuroscience* 15(12):1707–14.

Coert B.A., Anderson R.E., Meyer F.B. 2003. "Is neuroprotective efficacy of nNOS inhibitor 7-NI dependent on ischemic intracellular pH?" *American journal of phisiology. Heart and circulatory phisiology* 284:151-159.

Cymeryng C.B., Dada L.A., Podestá E.J. 1998. "Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis." *Journal of Endocrinology* 158:197-203.

Cymeryng C.B., Lotito S.P., Colonna C., Finkielstein C., Pomeraniec Y., Grión N., Gadda L., Maloberti P., Podestá E.J. 2002. "Expression of Nitric Oxide Synthases in Rat Adrenal Zona Fasciculata Cells." *Endocrinology* 143(4):1235-42.

Dallman M.F, Pecoraro N., Akana S.F., la Fleur S.E., Gomez F., Houshyar H., Bell M.E., Bhatnagar S., Laugero K.D., Manalo S. 2003. "Chronic Stress and Obesity: A New View of 'Comfort Food'." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(20):11696–701.

Dancause K.N., Laplante D.P., Oremus C., Fraser S., Brunet A., King S. 2011. "Disaster-Related Prenatal Maternal Stress Influences Birth Outcomes: Project Ice Storm." *Early Human Development* 87(12):813–20.

Dancause K.N., Veru F., Andersen R.E., Laplante D.P., King S. 2013. "Prenatal Stress due to a Natural Disaster Predicts Insulin Secretion in Adolescence." *Early human development* 89(9):773–76.

Darwin C. 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, Or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.* editado por John Murray III. London: John Murray.

Deng, W., Aimone J.B., Gage F.H. 2010. "*New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?*" *Nature Reviews Neuroscience 11:339-350*

Dhabhar F.S. & McEwen B.S. 1997. "Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in Vivo: A Potential Role for Leukocyte Trafficking." *Brain, behavior, and immunity* 11(4):286–306.

Diz-Chaves Y., Astiz M., Bellini M.J., and Garcia-Segura L.M. 2013. "Prenatal Stress Increases the Expression of Proinflammatory Cytokines and Exacerbates the Inflammatory Response to LPS in the Hippocampal Formation of Adult Male Mice." *Brain, behavior, and immunity* 28:196–206.

Dudzinski D.M., Igarashi J., Greif D., Michel T. 2006. "The Regulation and Pharmacology of Endothelial Nitric Oxide Synthase." *Annual review of pharmacology and toxicology* 46:235–76.

Dupret D., Revest J-M., Koehl M., Ichas F., De Giorgi F., Costet P., Abrous D.N., Piazza P.V. 2008. "Spatial Relational Memory Requires Hippocampal Adult Neurogenesis." *PloS one* 3(4):e1959.

Fanselow M.S. & Dong H-W. 2010. "Are The Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures?" *Neuron* 65(1):1–25.

Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. 1994. "Nitric Oxide Synthase Isozymes." *Hypertension* 23:1121–31.

Fosser N.S., Brusco A., Ríos H. 2005. "Darkness Induced Neuroplastic Changes in the Serotoninergic System of the Chick Retina." *Developmental brain research* 160(2):211–18.

Gadek-michalska A. & Bugajski J. 2008. "Nitric Oxide in the Adrenergic- and CRH-Induced Activation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis." *Journal of Physiology and Pharmacology* 59(2):365–78.

Gadek-michalska A., Tadeusz J., Rachwalska P., Bugajski J. 2013. "Cytokines , Prostaglandins and Nitric Oxide in the Regulation of Stress-Response Systems." *Pharmacological Reports* 65:1655–62.

Garthwaite J. 2008. “Concepts of Neural Nitric Oxide-Mediated Transmission.” *The European journal of neuroscience* 27(11):2783–2802.

Genaro A.M. & Bosca L. 1993. “Early Signals in Alloantigen Induced B-Cell Proliferation.” *Journal of immunology* 151(4):1832–43.

Givalois L., Li S., Pelletier G. 2002. “Central Nitric Oxide Regulation of the Hypothalamic–pituitary–adrenocortical Axis in Adult Male Rats.” *Molecular Brain Research* 102:1–8.

Gotti S., Martini M., Pradotto M., Viglietti-Panzica C., Panzica G. 2009. “Rapid Changes on Nitrinergic System in Female Mouse Hippocampus during the Ovarian Cycle.” *Journal of chemical neuroanatomy* 38(2):117–23.

Grassi D., Lagunas N., Amorin M., Pinos H., Panzica G.C., Garcia-Segura L.M., Collado P. 2013. “Estrogenic Regulation of NADPH-Diaphorase in the Supraoptic and Paraventricular Nuclei under Acute Osmotic Stress.” *Neuroscience* 248:127–35.

Grippo A.J., Santos C.M., Johnson R.F., Beltz T.G., Martins J.B., Felder R.B., Johnson A.K. 2004. “Increased Susceptibility to Ventricular Arrhythmias in a Rodent Model of Experimental Depression.” *American Journal of Physiology, Heart and circulatory physiology* 1407:619–26.

Grippo A.J. & Johnson A.K. 2010. “Stress, Depression, and Cardiovascular Dysregulation: A Review of Neurobiological Mechanisms and the Integration of Research from Preclinical Disease Models.” *Stress* 12(1):1–21.

Gummow B.M., Scheys J.O., Cancelli V.R., Hammer G.D. 2014. “Reciprocal Regulation of a Glucocorticoid Receptor- Steroidogenic Factor-1 Transcription Complex on the Dax-1 Promoter by Glucocorticoids and Adrenocorticotropic Hormone in the Adrenal Cortex.” *Molecular Endocrinology* 20(11):2711–23.

Hadoke P.W.F., Iqbal J., Walker B.R. 2009. “Therapeutic Manipulation of Glucocorticoid Metabolism in Cardiovascular Disease.” *British journal of pharmacology* 156:689–712.

Harris A. & Seckl J. 2011. “Glucocorticoids , Prenatal Stress and the Programming of Disease.” *Hormones and Behavior* 59(3):279–89.

Hayley S. 2011. “Toward an Anti-Inflammatory Strategy for Depression.” *Frontiers in behavioral neuroscience* 5:1-7.

Herman J.P. 2012. “Neural Pathways of Stress Integration.” *Alcohol Research* 34(4):441–47.

Herman J.P., Flak J., Jankord R. 2008. “Chronic Stress Plasticity in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus.” *Progress in Brain Research* 170:353–64.

Hill M.N. & Tasker J.G. 2013. “Endocannabinoid Signaling, Glucocorticoid-Mediated Negative Feedback and Regulation of the HPA Axis.” *Neuroscience* 204:5–16.

Holscher C., McGlinchey L., Anwyl R., Rowan M. J. 1996. “7-Nitro Indazole, a Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor in Vivo, Impairs Spatial Learning in the Rat.” *Learning & Memory* 2(6):267–78.

Hope B.T., Michael G.J., Knigget K.M., Vincent S.R. 1991. “Neuronal NADPH Diaphorase Is a Nitric Oxide Synthase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:2811–14.

Hu Y., Wu D-L., Luo C-X., Zhu L-J., Zhang J., Wu H-Y., Zhu D-Y. 2012. “Hippocampal Nitric Oxide Contributes to Sex Difference in Affective Behaviors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(35):14224-29

Jankord R. & Herman J.P. 2009. “Limbic Regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Function During Acute and Chronic Stress.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148:64–73.

Jensen Peña C., Monk C., Champagne F.A. 2012. “Epigenetic Effects of Prenatal Stress on 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and Fetal Brain.” *PloS one* 7(6):e39791.

Joels M., Sarabdjitsingh A., Karst H. 2012. “Unraveling the Time Domains of Corticosteroid Hormone Influences on Brain Activity: Rapid, Slow, and Chronic Modes.” *Pharmacologycal Reviews* 64:901–38.

Karatsoreos I.N. & McEwen B.S. 2013. “Resilience and Vulnerability: A Neurobiological Perspective.” *F1000prime reports* 5:13.

Kelley J.B., Anderson K.L., Altmann S.L., Itzhak Y. 2011. “Long-Term Memory of Visually Cued Fear Conditioning: Roles of the Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene and Cyclic AMP Response Element-Binding Protein.” *Neuroscience* 174:91–103.

Kelley J.B., Anderson K.L., Itzhak Y. 2010. “Pharmacological Modulators of Nitric Oxide Signaling and Contextual Fear Conditioning in Mice.” *Psychopharmacology* 210(1):65–74.

Kelley J.B., Balda M.A., Anderson K.L., Itzhak Y. 2009. “Impairments in Fear Conditioning in Mice Lacking the nNOS Gene.” *Learning & Memory* (305):371–78.

Kempermann G., Kuhn G., Gage F.H. 1997. “Genetic Influence on Neurogenesis in the Dentate Gyrus of.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:10409–14.

De Kloet, E.R., Joels M., Holsboer F. 2005. “Stress and the Brain: From Adaptation to Disease.” *Nature Reviews Neuroscience* 6(6):463–75.

Kofman O. 2002. “The Role of Prenatal Stress in the Etiology of Developmental Behavioural Disorders.” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26(4):457–70.

Korte S.M., Koolhaas J.M., Wingfield J.C., McEwen B.S. 2005. “The Darwinian Concept of Stress: Benefits of Allostasis and Costs of Allostatic Load and the Trade-Offs in Health and Disease.” *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29(1):3–38.

Laemmli U.K., Beguin F., Gujer-Kellenberger G. 1970. “A Factor Preventing the Major Head Protein of Bacteriophage T4 from Random Aggregation.” *Journal of molecular biology* 47(1):69–85.

Lange M.D., Doengi M., Lesting J., Pape H.C., Jüngling K. 2012. “Heterosynaptic Long-Term Potentiation at Interneuron-Principal Neuron Synapses in the Amygdala Requires Nitric Oxide Signalling.” *The Journal of physiology* 590:131–43.

Lee P.R., Brady D.L., Shapiro R.A., Dorsa D.M., Koenig J.I. 2007. “Prenatal Stress Generates Deficits in Rat Social Behavior: Reversal by Oxytocin.” *Brain research* 1156:152–67.

Lemaire V., Koehl M., Le Moal M., Abrous D.N. 2000. “Prenatal Stress Produces Learning Deficits Associated with an Inhibition of Neurogenesis in the Hippocampus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(20):11032–37.

Lesage J., Leonhardt M., Louvart H., Maccari S. 2004. “Prenatal Stress Induces Intrauterine Growth Restriction and Programmes Glucose Intolerance and Feeding Behaviour Disturbances in the Aged Rat.” *Journal of Endocrinology* 181:291–96.

Li M., Fu Q., Li Y., Li S., Xue J., Ma S. 2014. “Emodin Opposes Chronic Unpredictable Mild Stress Induced Depressive-like Behavior in Mice by Upregulating the Levels of Hippocampal Glucocorticoid Receptor and Brain-Derived Neurotrophic Factor.” *Fitoterapia* 98:1–10.

Liu Y., Smith L.I., Huang V., Poon V., Coello A., Olah M., Spiga F., Lightman S., Aguilera G. 2013. “Transcriptional Regulation of Episodic Glucocorticoid Secretion.” *Molecular and cellular endocrinology* 371:62–70.

Lowenstein C.J. & Padalko E. 2004. “iNOS (NOS2) at a Glance.” *Journal of cell science* 117(14): 2865–67.

Lu Y., He M., Zhang Y., Xu S., Zhang L., He Y., Chen C., Liu C., Pi H., Yu Z., Zhou Z. 2014. “Differential pro-Inflammatory Responses of Astrocytes and Microglia Involve STAT3 Activation in Response to 1800 MHz Radiofrequency Fields.” *PloS one* 9(9):e108318.

Lu Y-F., Kandel E.R., Hawkins R.D. 1999. “Nitric Oxide Signaling Contributes to Late-Phase LTP and CREB Phosphorylation in the Hippocampus.” *Journal of Neuroscience* 19(23):10250–61.

Lui C.C., Wang J-Y., Tain Y-L., Chen Y-C., Chang K-A., Lai M-C., Huang L-T. 2011. “Prenatal Stress in Rat Causes Long-Term Spatial Memory Deficit and Hippocampus MRI Abnormality: Differential Effects of Postweaning Enriched Environment.” *Neurochemistry international* 58(3):434–41.

Maccari S., Darnaudéry M., Morley-Fletcher S., Zuena A.R., Cinque C., Van Reeth O. 2003. “Prenatal Stress and Long-Term Consequences: Implications of Glucocorticoid Hormones.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27:119–27.

Maccari S., Darnaudéry M., Van Reeth O. 2001. “Hormonal and Behavioural Abnormalities Induced by Stress in Utero: An Animal Model for Depression.” *Stress* 4(3):169–81.

Maccari S., Piazza P.V., Kabbaj M., Barbazanges A., Simon H., Le Moal M. 1995. “Adoption Reverses the Long-Term Impairment in Glucocorticoid Feedback Induced by Prenatal Stress.” *The Journal of Neuroscience* 15(1):110–16.

Maccari S. & Morley-Fletcher S. 2007. “Effects of Prenatal Restraint Stress on the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis and Related Behavioural and Neurobiological Alterations.” *Psychoneuroendocrinology* 32:S10–S15.

Mairesse J., Lesaje J., Breton C., Bréant B., Hahn T., Darnaudéry M., Dickson S.L., Seckl J., Blondeau B., Vieau D., Maccari S., Viltart O. 2007. "Maternal Stress Alters Endocrine Function of the Feto-Placental Unit in Rats." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 292(6):E1526–33.

Markham J.A, Taylor A.R., Taylor S.B., Bell D.B., Koenig J.I. 2010. "Characterization of the Cognitive Impairments Induced by Prenatal Exposure to Stress in the Rat." *Frontiers in behavioral neuroscience* 4:173.

Marrocco J., Mairesse J., Ngomba R.T., Silletti V., Van Camp G., Bouwalerh H., Summa M., Pittaluga A., Nicoletti F., Maccari S., Morley-Fletcher S. 2012. "Anxiety-like Behavior of Prenatally Stressed Rats Is Associated with a Selective Reduction of Glutamate Release in the Ventral Hippocampus." *The Journal of neuroscience* 32(48):17143–54.

Matrisciano F., Tueting P., Dalal I., Kadriu B., Grayson D.R., Davis J.M., Nicoletti F., Guidotti A. 2013. "Epigenetic Modifications of GABAergic Interneurons Are Associated with the Schizophrenia-like Phenotype Induced by Prenatal Stress in Mice." *Neuropharmacology* 68:184–94.

Maur D.G., Romero C.B., Burdet B., Palumbo M.L., Zorrilla-Zubilete M.A. 2012. "Prenatal Stress Induces Alterations in Cerebellar Nitric Oxide That Are Correlated with Deficits in Spatial Memory in Rat's Offspring." *Neurochemistry international* 61(8):1294–1301.

McEwen B.S. 1998. "Stress, Adaptation, and Disease. Allostasis and Allostatic Load." *Annals of the New York Academy of Sciences* 840:33–44.

McEwen B.S. 2006. "Plasticity of the Hippocampus: Adaptation to Chronic Stress and Allostatic Load." *Annals of the New York Academy of Sciences* 933(1):265–77.

McHugh T.J., Blum K.I., Tsien J.Z., Tonegawa S., Wilson M.A. 1996. "Impaired Hippocampal Representation of Space in CA1-Specific NMDAR1 Knockout Mice." *Cell* 87(7):1339–49.

Milner B., Squire L.R., Kandel E.R. 1998. "Cognitive Neuroscience and the Study of Memory." *Neuron* 20:445–68.

Mizuno M., Yamada K., Olariu A., Nawa H., Nabeshima T. 2000. "Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Spatial Memory Formation and Maintenance in a Radial Arm Maze Test in Rats." *The Journal of Neuroscience* 20(18):7116–21.

Mohn C.E., Fernandez-Solari J., De Laurentiis A., Prestifilippo J.P., de la Cal C., Funk R., Bornstein S.R., McCann S.M., Rettori V. 2005. "The Rapid Release of Corticosterone from the Adrenal Induced by ACTH Is Mediated by Nitric Oxide Acting by Prostaglandin E2." *Proceedings of the National Academy of Science* 102(17):6213–18.

Mohn C.E., Fernandez Solari J., De Laurentiis A., Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Rettori V. 2011. "Adrenal Gland Responses to Lipopolysaccharide after Stress and Ethanol Administration in Male Rats." *Stress* 14(2):216–26.

Moisan M-P. & Le Moal M. 2012. "Le Stress Dans Tous Ses États." *Médecin-Sciences* 28:612–17.

Monasterio N. & Morales T. 2011. “Nitric Oxide Has a Role in Attenuating the Neuroendocrine Response to Anaphylactoid Stress during Lactation.” *Brain research* 1402:54–66.

Morley-Fletcher S., Mairesse J., Soumier A., Banasr M., Fagioli F., Gabriel C., Mocaer E., Daszuta A., McEwen B., Nicoletti F., Maccari S. 2011. “Chronic Agomelatine Treatment Corrects Behavioral, Cellular, and Biochemical Abnormalities Induced by Prenatal Stress in Rats.” *Psychopharmacology* 217(3):301–13.

Mulder E.J.H., Robles de Medina P.G., Huizink A.C., Van den Bergh B.R.H., Buitelaar J.K., Visser G.H.A. 2002. “Prenatal Maternal Stress: Effects on Pregnancy and the (unborn) Child.” *Early Human Development* 70:3–14.

Murmu M.S., Salomon S., Biala Y., Weinstock M., Braun K., Bock J. 2006. “Changes of Spine Density and Dendritic Complexity in the Prefrontal Cortex in Offspring of Mothers Exposed to Stress during Pregnancy.” *The European journal of neuroscience* 24(5):1477–87.

Neigh G.N. & Nemeroff C.B. 2006. “Reduced Glucocorticoid Receptors: Consequence or Cause of Depression?” *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17(4):124–25.

Nikonenko I., Boda B., Steen S., Knott G., Welker E., Muller D. “PSD-95 Promotes Synaptogenesis and Multiinnervated Spine Formation through Nitric Oxide Signaling.” *The Journal of cell biology* 183:1115–27.

Nishio H., Kasuga S., Ushijima M., Harada Y. 2001. “Prenatal Stress and Postnatal Development of Neonatal Rats — Sex-Dependent Effects on Emotional Behavior and Learning Ability of Neonatal Rats.” *International Journal of Developmental Neuroscience* 19:37–45.

Nollet M., Gaillard P., Tanti A., Girault V., Belzung C., Leman S. 2012. “Neurogenesis-Independent Antidepressant-like Effects on Behavior and Stress Axis Response of a Dual Orexin Receptor Antagonist in a Rodent Model of Depression.” *Neuropsychopharmacology* 37:2210–21.

Okada S., Murakami Y., Yokotani K. 2002. “Centrally Applied Nitric Oxide Donor Elevates Plasma Corticosterone by Activation of the Hypothalamic Noradrenergic Neurons in Rats.” *Brain Research* 939(1-2):26–33.

Okamoto S-I. & Lipton S.A. 2014. “S-Nitrosylation in Neurogenesis and Neuronal Development.” *Biochimica et biophysica acta*.

Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. 1987. “Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor.” *Nature* 327:524–26.

Palumbo M.L., Trinchero M.F., Zorrilla-Zubilete M.A., Schinder A.F., Genaro A.M. 2012. “Glatiramer Acetate Reverts Stress-Induced Alterations on Adult Neurogenesis and Behavior. Involvement of Th1/Th2 Balance.” *Brain, behavior, and immunity* 26:429–38.

Pariante C.M. 2008. “The Role of Multi-Drug Resistance P-Glycoprotein in Glucocorticoid Function: Studies in Animals and Relevance in Humans.” *European journal of pharmacology* 583:263–71.

Pautz A., Art J., Hahn S., Nowag S., Voss C., Kleinert H. 2010. “Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase.” *Nitric oxide: biology and chemistry* 23:75–93.

Pawlak C.R. & Schwarting R.K.W. 2002. “Object Preference and Nicotine Consumption in Rats with High vs. Low Rearing Activity in a Novel Open Field.” *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 73:679–87.

Paxinos G. & Watson C. 1997. “The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.” Editado por Academic Press.

Pecoraro N., Dallman M.F., Warne J.P., Ginsberg A.B., Laugero K.D., la Fleur S.E., Houshyar H., Gomez F., Bhargava A., Akana S.F. 2006. “From Malthus to Motive: How the HPA Axis Engineers the Phenotype, Yoking Needs to Wants.” *Progress in neurobiology* 79:247–340.

Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. 1985. “Validation of Open : Closed Arm Entries in an Elevated plus-Maze as a Measure of Anxiety in the Rat.” *Journal of neuroscience methods* 14:149–67.

Plotsky P.M. 1987. “Facilitation of Immunoreactive Corticotropin-Releasing Factor Secretion into the Hypophysial-Portal Circulation after Activation of Catecholaminergic Pathways or Central Norepinephrine Injection.” *Endocrinology* 121:924–30.

Rettori V., Fernandez-Solari J., Mohn C., Zorrilla Zubilete M.A., de la Cal C., Prestifilippo J.P., De Laurentiis A. 2009. “Nitric Oxide at the Crossroad of Immunoneuroendocrine Interactions.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153:35–47.

Riccio A., Alvania R.S., Lonze B.E., Ramanan N., Kim T., Huang Y., Dawson T.M., Snyder S.H., Ginty D.D. 2006. “A Nitric Oxide Signaling Pathway Controls CREB-Mediated Gene Expression in Neurons.” *Molecular cell* 21:283–94.

Ridder S., Chourbaji S., Hellweg R., Urani A., Zacher C., Schmid W., Zink M., Hortnagl H. Flor H., Henn F.A. Shutz G., Gass P. 2005. “Mice with Genetically Altered Glucocorticoid Receptor Expression Show Altered Sensitivity for Stress-Induced Depressive Reactions.” *The Journal of neuroscience* 25(26):6243–50.

Rosenbaum R.S., Gilboa A., Moscovitch M. 2014. “Case Studies Continue to Illuminate the Cognitive Neuroscience of Memory.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1316:105–33.

Sakamoto M., Kakita A., Bezerra de Oliveira R., Pan H.S., Takahashi H. 2004. “Dose-Dependent Effects of Methylmercury Administered during Neonatal Brain Spurt in Rats.” *Developmental brain research* 152:171–76.

Sanchez F., Moreno M.N., Vacas P., Carretero J., Vázquez R. 1999. “Swim Stress Enhances the NADPH – Diaphorase Histochemical Staining in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus.” *Brain research* 828:159–62.

Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. 2000. “How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Supressive, Stimulatory and Preparative Actions.” *Endocrine Reviews* 21:55–89.

Sapolsky R.M., Zola-Morgan S., Squire L.R.. 1991. “Inhibition of Glucocorticoid Secretion by the Hippocampal Formation in the Primate.” *The Journal of Neuroscience* 11(12):3695–3704.

Scoville W.B. & Milner B. 1957. “Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions.” *Journal of Neurlogy , Neurosurgery and Psychiatry* 20:11–21.

Selye H. 1950. “Stress and the General Adaptation Syndrome.” *British Medical Journal* 1383–92.

Seo D.O. & Rivier C. 2001. “Microinfusion of a Nitric Oxide Donor in Discrete Brain Regions Activates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis.” *Journal of Neuroendocrinology* 13:925–33.

Seo J-S., Park J-Y., Choi J., Kim T-K., Shin J-H., Lee J-K., Han P-L. 2012. “NADPH Oxidase Mediates Depressive Behavior Induced by Chronic Stress in Mice.” *The Journal of neuroscience* 32(28):9690–99.

Silberman D.M., Ayelli-Edgar V., Zorrilla-Zubilete M., Zieher L.M., Genaro A.M. 2004. “Impaired T-Cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. ” *Brain, Behavior, and Immunity* 18:81-90.

Silberman D.M., Wald M.R., Genaro A.M. 2003. “Acute and Chronic Stress Exert Opposing Effects on Antibody Responses Associated with Changes in Stress Hormone Regulation of T-Lymphocyte Reactivity.” *Journal of Neuroimmunology* 144:53–60.

Smith C. 2012. “Using Rodent Models to Simulate Stress of Physiologically Relevant Severity: When, Why and How.” Pp. 211-30, *Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend* editado por Xiaoxiao Qian. InTech.

Snyder J.S., Glover L.R., Sanzone K.M., Kamhi J.F., Cameron H.A. 2010. “The Effects of Exercise and Stress on the Survival and Maturation of Adult-Generated Granule Cells.” *Hippocampus* 19(10):898–906.

Sominsky L. & Spencer S.J. 2014. “Eating Behavior and Stress: A Pathway to Obesity.” *Frontiers in psychology* 5:434.

Stanford S.C. 2007. “The Open Field Test: Reinventing the Wheel.” *Journal of psychopharmacology* 21(2):134–35.

Sterling P. & Eyer J. 1988. “Allostasis: A New Paradigm to Explain Arousal Pathology.” Pp. 629–50, *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, editado por Fisher S. & Reason J. John Wiley & Sons.

Stern J.E. 2004. “Nitric Oxide and Homeostatic Control: An Intercellular Signalling Molecule Contributing to Autonomic and Neuroendocrine Integration?” *Progress in biophysics and molecular biology* 84:197–215.

Stuehr D.J. 1999. “Mammalian Nitric Oxide Synthases.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411:217–30.

Stuehr D.J. & Marletta M.A. 1985. “Mammalian Nitrate Biosynthesis: Mouse Macrophages Produce Nitrite and Nitrate in Response to Escherichia Coli Lipopolysaccharide.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:7738–42.

Sun H., Jia N., Guan L., Su Q., Wang D., Li H., Zhu Z. 2013. “Involvement of NR1, NR2A Different Expression in Brain Regions in Anxiety-like Behavior of Prenatally Stressed Offspring.” *Behavioural brain research* 257:1–7.

Tan S-E. 2003. “Roles of Hippocampal Nitric Oxide and Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Inhibitory Avoidance Learning in Rats.” *Behavioural Pharmacology* 18(1):29–38.

Tricoire L. & Vitalis T. 2012. “Neuronal Nitric Oxide Synthase Expressing Neurons: A Journey from Birth to Neuronal Circuits.” *Frontiers in neural circuits* 6:1-16.

Uribe R.M., Lee S., Rivier C. 1999. “Endotoxin Stimulates Nitric Oxide Production in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus through Nitric Oxide Synthase I: Correlation with Hypothalamic- Pituitary-Adrenal Axis Activation.” *Endocrinology* 140(12):5971-5981.

Vallée M., Mayo W., Le Moal M., Maccari S. 1997. “Prenatal Stress Induces High Anxiety and Postnatal Handling Induces Low Anxiety in Adult Offspring: Correlation with Stress-Induced Corticosterone Secretion.” *The Journal of Neuroscience* 17(7):2626–36.

Vallée M., Maccari S., Dellu F., Simon H., Le Moal M., Mayo W. 1999. “Long-Term Effects of Prenatal Stress and Postnatal Handling on Age-Related Glucocorticoid Secretion and Cognitive Performance: A Longitudinal Study in the Rat.” *European Journal of Neuroscience* 11:2906–16.

Vanbesien-Mailliot C.C.A., Wolowczuk I., Mairesse J., Viltart O., Delacre M., Khalife J., Chartier-Harlin M-C., Maccari S. 2007. “Prenatal Stress Has pro-Inflammatory Consequences on the Immune System in Adult Rats.” *Psychoneuroendocrinology* 32:114–24.

Van den Hove D.L.A., Kenis G., Brass A., Opstelten R., Rutten B.P.F., Bruschettini M., Blanco C.E., Lesch K.P., Steinbusch H.W.M., Prickaerts J. 2013. “Vulnerability versus Resilience to Prenatal Stress in Male and Female Rats; Implications from Gene Expression Profiles in the Hippocampus and Frontal Cortex.” *European Neuropsychopharmacology* 23(10):1226–46.

Van Praag H., Christie B.R., Sejnowski T. J., Gage F.H. 1999. “Running Enhances Neurogenesis, Learning, and Long-Term Potentiation in Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(23):13427–31.

Van Strien N.M., Cappaert N.L.M., Witter M.P. 2009. “The Anatomy of Memory: An Interactive Overview of the Parahippocampal-Hippocampal Network.” *Nature reviews. Neuroscience* 10(4):272–82.

Vianna M.R.M., Alonso M., Viola H., Quevedo J., de Paris F., Furman M., Levi de Stein M., Medina J.H., Izquierdo I. 2000. “Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat.” *Learning & Memory* 7:333–40.

Vincent S.R. & Kimura H. 1992. “Histochemical Mapping of Nitric Oxide Synthase in the Rat Brain.” *Neuroscience* 46(4):755–84.

Walder D.J., Laplande D.P., Sousa-Pires A., Veru F., Brunet A., King S. 2014. “Prenatal Maternal Stress Predicts Autism Traits in 6 ½ Year-Old Children: Project Ice Storm.” *Psychiatry Research* 219:353–60.

Ward I.L. & Weisz J. 1984. “Differential Effects of Maternal Stress on Circulating Levels of Corticosterone , Progesterone , and Testosterone in Male and Female Rat Fetuses and Their Mothers.” *Endocrinology* 114(5):1635–44.

Weidenfeld J, Feldman S., DeKeyser F.G., Ovadia H. 1999. “Effect of Exogenous Nitric Oxide and Inhibitors of Nitric Oxide Synthase on the Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis Responses to Neural Stimuli.” *Neuroendocrinology* 70:153–59.

Weinstock M. 2007. “Gender Differences in the Effects of Prenatal Stress on Brain Development and Behaviour.” *Neurochemical research* 32:1730–40.

Weinstock M. 2008. “The Long-Term Behavioural Consequences of Prenatal Stress.” *Neuroscience and biobehavioral reviews* 32:1073–86.

Wu J., Song T-B., Li Y-J., Je K-S., Ge L., Wang L-R. 2007. “Prenatal Restraint Stress Impairs Learning and Memory and Hippocampal PKCbeta1 Expression and Translocation in Offspring Rats.” *Brain research* 1141:205–13.

Wurtman R.J. & Axelrod J. 1966. “Control of Enzymatic Synthesis of Adrenaline in the Adrenal Medulla by Adrenal Cortical Steroids.” *The Journal of biological chemistry* 241(10):2301–5.

Xu L., Sun Y., Gao L., Cai Y-Y., Shi S-X. 2014. “Prenatal Restraint Stress Is Associated with Demethylation of Corticotrophin Releasing Hormone (CRH) Promoter and Enhances CRH Transcriptional Responses to Stress in Adolescent Rats.” *Neurochemical research* 39:1193–98.

Yaka R., Salomon S., Matzner H., Weinstock M. 2007. “Effect of Varied Gestational Stress on Acquisition of Spatial Memory, Hippocampal LTP and Synaptic Proteins in Juvenile Male Rats.” *Behavioural brain research* 179:126–32.

Yamaguchi N., Ogawa S., Okada S. 2010. “Cyclooxygenase and Nitric Oxide Synthase in the Presympathetic Neurons in the Paraventricular Hypothalamic Nucleus Are Involved in Restraint Stress-Induced Sympathetic Activation in Rats.” *Neuroscience* 170:773–81.

Yang J., Hou C., Ma N., Liu J., Zhang Y., Zhou J., Xu L., Li L. 2007. “Enriched Environment Treatment Restores Impaired Hippocampal Synaptic Plasticity and Cognitive Deficits Induced by Prenatal Chronic Stress.” *Neurobiology of learning and memory* 87:257–63.

Yun H.Y., Dawson V.L., Dawson T.M. 1997. “Nitric Oxide in Health and Disease of the Nervous System.” *Molecular Psychiatry* 2(4):300–310.

Zagron G. & Weinstock M. 2006. “Maternal Adrenal Hormone Secretion Mediates Behavioural Alterations Induced by Prenatal Stress in Male and Female Rats.” *Behavioural brain research* 175:323–28.

Zinn C.G., Bevilaqua L.R., Rossato J.I., Medina J.H., Izquierdo I., Cammarota M. 2009. “On the Requirement of Nitric Oxide Signaling in the Amygdala for Consolidation of Inhibitory Avoidance Memory.” *Neurobiology of learning and memory* 91:266–72.

Zorrilla Zubilete M.A., Rios H., Silberman D.M., Guelman L.R., Ricatti M.J., Genaro A.M., Zieher L.M. 2005. “Altered Nitric Oxide Synthase and PKC Activities in Cerebellum of Gamma-Irradiated Neonatal Rats.” *Brain research* 1051:8–16.

Zuena, A.R., Mairesse J., Casolini P., Cinque C., Alemà G.S., Morley-Fletcher S., Chiodi V., Spagnoli L.G., Gradini R., Catalani A., Nicoletti F., Maccari S. 2008. “Prenatal Restraint Stress Generates Two Distinct Behavioral and Neurochemical Profiles in Male and Female Rats.” *PloS one* 3(5):e2170.

Zunszain P.A., Anacker C., Cattaneo A., Carvalho L.A., Pariante C.M. 2011. “Glucocorticoids , Cytokines and Brain Abnormalities in Depression.” *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35(3):722–29.