



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biología Experimental

**Efecto del estrés prenatal en la liberación de Serotonina y Noradrenalina en el Hipocampo de la rata en la edad adulta y su influencia en el aprendizaje y la memoria espacial.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA**

**EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A**

**Bióloga Diana Méndez Guerrero**

**Co-Directoras**

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta

**Asesora**

Dra. María del Carmen Rubio Osornio

**CIUDAD DE MÉXICO**

**25 de Noviembre del 2016.**

**Comité Tutorial:**

**Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez  
(Co-Directora Interna)**

Área de Biología Conductual y Reproductiva,  
Depto. De Biología de la Reproducción,  
Laboratorio de Neuropsicoendocrinología.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.  
rems@xanum.uam.mx.

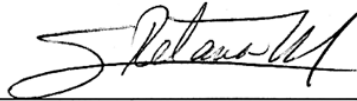
**Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta  
(Co-Directora Externa)**

Departamento De Farmacobiología,  
CINVESTAV, Unidad Sur  
lrocha@cinvestav.mx.

**Dra. María del Carmen Rubio Osornio  
(Asesora Externa)**

Departamento de Neurofisiología  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
"Manuel Velasco Suárez"  
macaru4@hotmail.com

**Comité Tutorial:**



---

**Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez (Co-Directora Interna)**  
Área de Biología Conductual y Reproductiva, Depto. De Biología de la Reproducción,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.  
rems@xanum.uam.mx.



---

**Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta (Co-Directora Externa)**  
Departamento De Farmacobiología, CINVESTAV, Unidad Sur  
lrocha@cinvestav.mx.



---

**Dra. María del Carmen Rubio Osornio (Asesora Externa)**  
Departamento de Neurofisiología Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
"Manuel Velasco Suárez"  
Macaru4@hotmail.com.

El presente trabajo se realizó en el Área de Biología Conductual y Reproductiva del Departamento de Biología de la Reproducción, en el laboratorio de Neuropsicoendocrinología en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la Co-Dirección de la Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez y la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta y fue asesorado por la Dra. María del Carmen Rubio Osornio.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Para la realización de los estudios de Maestría en Biología Experimental la alumna Diana Méndez Guerrero percibió el apoyo de la beca CONACyT, mediante el registro de No Becario: 570242/ CVU: 620749.

## Miembros del jurado


El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis titulada:

“Efecto del estrés prenatal en la liberación de Serotonina y Noradrenalina en el Hipocampo de la rata en la edad adulta y su influencia en el aprendizaje y la memoria espacial”

Presentó

Bióloga Diana Méndez Guerrero

El día 25 de Noviembre del año 2016.



PRESIDENTA

Dra. Beatriz Gómez González  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Ciudad de México



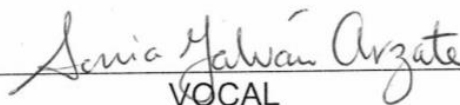
SECRETARIA

Dra. María del Carmen Rubio Osornio  
Departamento de Neurofisiología  
Instituto Nacional de Neurología y  
Neurocirugía  
“Manuel Velasco Suárez”  
Ciudad de México



VOCAL

Dr. Moisés Rubio Osornio  
Laboratorio Experimental de  
Enfermedades neurodegenerativas  
Instituto Nacional de Neurología y  
Neurocirugía  
“Manuel Velasco Suárez”  
Ciudad de México



VOCAL

Dra. Sonia Galván Arzate  
Departamento de Neuroquímica  
Instituto Nacional de Neurología y  
Neurocirugía  
“Manuel Velasco Suárez”  
Ciudad de México

*«Un ser humano es parte del todo que llamamos universo, una parte limitada en el tiempo y en el espacio. Está convencido de que el mismo, sus pensamientos y sus sentimientos, son algo independiente de los demás, una especie de ilusión óptica de su conciencia. Esa ilusión es una cárcel para nosotros, nos limita a nuestros deseos personales y a sentir afecto por los pocos que tenemos más cerca. Nuestra tarea tiene que ser liberarnos de esa cárcel, ampliando nuestro círculo de compasión, para abarcar a todos los seres vivos y a toda la naturaleza».*

**Albert Einstein**

## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis de Maestría ha requerido del esfuerzo, tiempo y dedicación de mi parte así como de la directora de tesis, pero su realización no hubiera podido ser posible sin todas aquellas personas que a continuación se citan.

A la Dra. María del Socorro Retana Márquez por permitirme formar parte de su grupo de trabajo en la realización de esta tesis y por todo el apoyo en todo momento, situación, contribución, paciencia y objetividad profesional que solo da la experiencia, para la realización del presente proyecto.

A la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta por su apoyo, tiempo y ayuda en la realización de este trabajo.

A la Dra. María del Carmen Rubio Osornio por su apoyo incondicional en todo momento, por su excelente calidad humana, y darme siempre tan lindas palabras de aliento y animarme para seguir adelante, porque cada que busqué ayuda me la brindó y por compartir sus conocimientos conmigo.

Al Dr. Moisés Rubio Osornio por su apoyo y ayuda para la realización y conclusión de esta tesis.

A la Dra. Esperanza García del INNN por permitirnos trabajar en su laboratorio para la obtención de resultados y apoyo en la técnica de HPLC.

A Felipe de Jesús Jiménez Vásquez por estar ahí siempre conmigo acompañándome en los momentos más difíciles y alentarme a seguir adelante y nunca rendirme gracias por ser mi compañero de vida y formar parte de ella, TE AMO MUCHISIMO.

A mis mejores amig@s y compañeros de la maestría Faby, Mayra y Jhovan por esos momentos inolvidables que llevare siempre en mi corazón y mente, lo quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio Ángeles, Flor, Eunice, Sergio, Fahiel, Azhalea, Mónica y Lizbeth por compartir lindos momentos en el laboratorio.



## DEDICATORIAS

Quiero dedicar esta tesis a mi familia, a mi madre Andrea Guerrero Zermeño por alentarme siempre a seguir adelante con mis sueños y llegar hasta lo más alto, por apoyarme cuando más lo necesitaba y en todos los aspectos de mi vida, a mis hermanos Iván y Peter por su cariño y ser parte fundamental para la conclusión de esta etapa de mi vida y por estar conmigo cuando los necesitaba.

A todas esas ratitas que fueron parte de este proyecto y de todos los que se llevan a cabo en investigación, sinceramente les agradezco el dar su vida para la realización de esta tesis esperando que los resultados obtenidos sirvan de apoyo para que algún día, el ser humano pueda beneficiarse de ellos, y así el sacrificio de su vida no sea en vano.

## RESUMEN

El estrés se define como un estado de homeostasis alterada, en el que el organismo responde activando una serie de respuestas adaptativas centrales y periféricas a través del llamado sistema de estrés, constituido por el locus coeruleus-sistema nervioso simpático (SNS)-médula adrenal y el eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA). El estrés se puede presentar en diferentes etapas de la vida, incluso en el periodo gestacional. El estrés prenatal (EP) modifica las respuestas del cerebro adulto, incluyendo la del eje HHA por efecto de los glucocorticoides (GC). El hipocampo está implicado en el procesamiento de la información espacial, además presenta una gran cantidad de receptores para GC. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar si el contenido y la liberación de 5-HT y NA disminuyen en el hipocampo dorsal de la descendencia adulta estresada prenatalmente y si esos cambios están asociados con alteraciones en el aprendizaje y la memoria de tipo espacial. Se utilizaron hembras gestantes de la cepa Wistar que fueron asignadas al grupo control o al de estrés por inmersión en agua del día 15 al 21 de gestación. En las crías de 2 ½ meses de edad se implantaron cánulas dirigidas al hipocampo dorsal de los machos. El contenido tisular de serotonina y noradrenalina se cuantificaron mediante HPLC-ED (cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica). En otros machos se realizaron pruebas conductuales en el Laberinto acuático de Morris (LAM) para determinar el desempeño en tareas de aprendizaje y memoria de tipo espacial. Del día 1 al 4 del LAM se evaluó el aprendizaje y en los días 7 y 13 la memoria de corto y largo plazo respectivamente. Los resultados del LAM muestran que las

latencias de escape en el grupo de EP fueron mayores a las del grupo control, lo que significa que el EP causa deficiencias en su capacidad de aprender y recordar la prueba, a diferencia del control que mostró latencias de llegada progresivamente menores cada día. En cuanto a la liberación basal de neurotransmisores se observó mayor liberación de serotonina y noradrenalina en el grupo EP en comparación con el control. Esto indica un aumento en la neurotransmisión en los animales EP en la etapa adulta. El contenido de serotonina en el hipocampo dorsal aumentó en los días 1 y 4 de la prueba de aprendizaje mientras que en los días 7 y 13 disminuyó significativamente. Esto indica que la serotonina participa en el aprendizaje. Por otra parte, la noradrenalina no se modifica en los primeros días pero en el día 13, está se incrementó en el grupo control, pero no en el EP, lo que indica que este neurotransmisor participa en los procesos de memoria a largo plazo, la cual se ve afectada por el EP. Por lo anterior, se confirma que el estrés prenatal causa deficiencias en el aprendizaje y la memoria espacial. La deficiencia en la memoria de largo plazo parece deberse a la disminución de noradrenalina, mientras que la serotonina parece no tener relación al no modificarse en los días de aprendizaje después del LAM.

## ABSTRACT

Stress is defined as a state of altered homeostasis, in which the body responds by activating a number of central and peripheral adaptive responses through the so-called stress system, consisting of the locus coeruleus-, sympathetic nervous system (SNS)-adrenal medulla and the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis. Stress can occur in different stages of life, even in the gestational period. Prenatal stress (PS) can modify the response of the adult brain, including that of HPA axis due to the effects of glucocorticoids (GC). The hippocampus is involved in the processing of spatial information and its great number of GC receptors. Therefore, the aim of this work was to assess whether the release and content of serotonin and noradrenalin decrease in dorsal hippocampus of adult offspring prenatally stressed and whether those changes are associated with alterations in learning and memory. Pregnant female Wistar rats were assigned to control group or stress by immersion in cold water groups from day 15 to 21 of the gestational period. In offspring of 2 ½ months of age, cannula were stereotactically directed toward dorsal hippocampus of males. The analysis of tissue content was carried out by HPLC-ED. In other males, behavioral tests were performed using the Morris water maze (MWM) to determine the performance on tasks of spatial learning and memory. Short- and long-term memory were evaluated on day 7 and 13, respectively. The results of MWM show longer escape latencies in PS males compared to the control, indicating deficiencies in their ability to learn and remember the test, unlike the control group, which displayed escape latencies progressively smaller each day. Concerning basal neurotransmitter

release, greater release of Serotonin and Noradrenaline was observed in PS group. This suggests an increase in neurotransmission caused by PS. Serotonin content in the dorsal hippocampus increased on days 1 and 4 of the MWM test, while the content decreases significantly on days 7 and 13. Noradrenaline content decreased only on day 13, when long term memory was assessed, indicating a participation of this neurotransmitter in long term spatial memory. Therefore, it is confirmed that prenatal stress causes deficiencies in learning and spatial memory. Deficiency in long-term memory appears to be due to decreased noradrenaline, while serotonin appears unrelated to no change in learning days after LAM.

## ABREVIACIONES

A	:Adrenalina
ADN	:Ácido desoxirribonucleico
ACTH	:Hormona adenocorticotropa/adrenocorticotropina
ARNm	:Ácido ribonucleico mensajero
AMPA	:Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	:Análisis de varianza
CRH	:Hormona liberadora de corticotropina
CaMK-II	:Proteína cinasa-II dependiente de calcio calmodulina
CA1	:Cuerno de Ammon 1
DLP	:Depresión a largo plazo
EDTA	:Ácido etilendiaminotetracético
EP	:Estrés prenatal
GABA	:Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GC	:Glucocorticoides
HHA	:Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal
HPLC	:Cromatografía líquida de alta resolución
IUSDEC	:curva invertida en forma de U de dosis-efecto
LAM	:Laberinto Acuático de Morris
LC	:Locus Coeruleus
MAPK	:Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MAO-A	:Monoamina oxidasa A
NA	:Noradrenalina
NMDA	:N-metil-D-aspartato
PLP	:Potenciación a largo plazo
pCRH	:Hormona liberadora de corticotropina placentaria

SNS	:Sistema Nervioso Simpático
SNC	:Sistema Nervioso Central
5-HIAA	:Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	:5-hidroxitriptamina
11-βHSD2	:11-β hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2

# ÍNDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	VI
DEDICATORIAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT .....	XI
ABREVIACIONES .....	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 ESTRÉS .....	1
1.2 EL MECANISMO MOLECULAR DE LOS GLUCOCORTICOIDES.....	4
1.3 RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES.....	5
1.4 GLUCOCORTICOIDES Y SUS FUNCIONES EN EL HIPOCAMPO .....	7
1.5 NEUROBIOLOGÍA DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA .....	9
1.6 POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO .....	10
1.7 DEPRESIÓN A LARGO PLAZO .....	12
1.8 GLUCOCORTICOIDES Y SU RELACIÓN CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	13
1.9 RELACIÓN DE LA NORADRENALINA CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	14
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>16</b>
2.1 ESTRÉS PRENATAL.....	16
2.2 PROGRAMACIÓN DEL CEREBRO FETAL .....	17
2.3 LOS GLUCOCORTICOIDES Y EL ESTRÉS PRENATAL.....	19
2.4 CRH PLACENTARIO .....	20
2.5 ESTRÉS MATERNO Y SUS EFECTOS EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	21
2.6 SEROTONINA, NORADRENALINA, APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>26</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>26</b>
<b>7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>26</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODO .....</b>	<b>27</b>
8.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
8.2 MODELO BIOLÓGICO .....	29
8.3 ESTRÉS POR INMERSIÓN EN AGUA FRÍA .....	29



8.4	LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS .....	29
8.5	CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.....	31
8.6	MICRODIÁLISIS .....	33
8.7	MANIPULACIÓN DEL TEJIDO .....	34
8.8	EVALUACIÓN DEL SITIO DE IMPLANTE CON LA TINCIÓN DE NISSL.....	34
8.9	DISECCIÓN DEL HIPOCAMPO .....	35
8.10	CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE 5-HT Y NA POR HPLC. ....	36
8.11	HOMOGENIZACIÓN DEL TEJIDO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO TISULAR	36
8.12	CUANTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES POR HPLC .....	37
8.13	CURVAS ESTÁNDAR, ASÍ COMO LOS COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE 5-HT, 5-HIAA Y NA QUE SE OBTUVIERON AL CUANTIFICAR EL CONTENIDO TISULAR DE HIPOCAMPO DORSAL.....	38
<b>9.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>40</b>
<b>10.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
10.1	LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS .....	41
10.1.1	<i>Memoria de corto plazo.</i> .....	42
10.2	LIBERACIÓN DE 5-HT, 5-HIAA Y NA.....	44
10.3	CONTENIDO TISULAR DE 5-HT, 5-HIAA Y NA EN HIPOCAMPO DORSAL .....	45
10.3.1.1	Serotonina.....	45
10.3.1.2	5-HIAA.....	46
10.3.1.3	NA.....	48
<b>11.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>12.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>
<b>14.</b>	<b>APÉNDICE I. EVALUACIÓN DEL SITIO DEL IMPLANTE .....</b>	<b>65</b>
14.1	HISTOLOGÍA .....	65
14.2	SITIOS DE IMPLANTE.....	66

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ESTRÉS

El estrés se define como un estado de homeostasis alterada en la que el organismo responde activando una serie de respuestas adaptativas centrales y periféricas (1), La homeostasis es el mantenimiento de un equilibrio dinámico y complejo, mediante el cual el medio interno se mantiene en condiciones estables. Sin embargo, los organismos también pueden mantener su estabilidad cambiando los niveles basales de los mecanismos homeostáticos, para poder responder a eventos tales como los cambios circadianos o estacionales. Esto se conoce como alostasis, la cual tiene como significado alcanzar la estabilidad a través del cambio (2), la alostasis por lo tanto, permite que los organismos puedan hacer frente a las condiciones cambiantes del medio donde viven. Actualmente se considera que el estrés es una condición del organismo en la que las demandas ambientales, particularmente, situaciones que son impredecibles e incontrolables, exceden la capacidad reguladora del organismo. Fisiológicamente, el estrés se caracteriza por la ausencia de una respuesta anticipatoria (impredecible), así como por una baja recuperación después de la reacción neuroendocrina (3). La respuesta de estrés es dirigida por estructuras del sistema nervioso central (SNC) y por regiones periféricas (4). Los dos componentes principales del sistema de estrés son, el Locus Coeruleus (LC)-sistema nervioso simpático (SNS)-médula adrenal (LC-NE/SNS) y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) (Véase figura 1). En el hipocampo los receptores a glucocorticoides (GC) se

incrementan en respuesta al estrés, proporcionando una influencia inhibitoria sobre el eje HHA, además los GC llevan a cabo cambios conductuales tales como el incremento en la vigilia, el estado de alerta, la cognición, en la atención enfocada, euforia o disforia, incremento en la analgesia, supresión del apetito y del eje reproductivo (1, 5). El núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) es el integrador final de la respuesta de estrés crónico. Las neuronas de este núcleo producen la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que estimula la producción hipofisiaria de adrenocorticotropina (ACTH); esta hormona estimula la producción de cortisol (en humanos) o corticosterona (en ratas) por las glándulas suprarrenales. En contraposición, el cortisol inhibe su propia síntesis inhibiendo la síntesis y la liberación de ACTH y de CRH. En este sentido el cortisol es una hormona anti estrés que apaga los procesos biológicos provocados por el estrés cuando el individuo ha encontrado una buena respuesta adaptativa (6). Estas moléculas regulan la actividad basal del eje HHA y terminan la respuesta al estrés, actuando principalmente en el hipotálamo y la glándula hipofisiaria, formando de ese modo asas de retroalimentación negativa sobre la secreción de CRH y de ACTH, respectivamente (7). La activación del sistema de estrés causa cambios en el estado de alerta, la cognición, redireccionamiento del oxígeno y nutrientes hacia el SNC, incremento de la presión sanguínea, aumento en el ritmo cardiaco, incremento en la tasa respiratoria, los cuales son marcadamente consistentes y en conjunto se definen como el síndrome de estrés (1). Los GC son los productos finales del eje HHA, son hormonas esteroides con efectos pleiotrópicos en casi todos los tejidos y órganos (8).

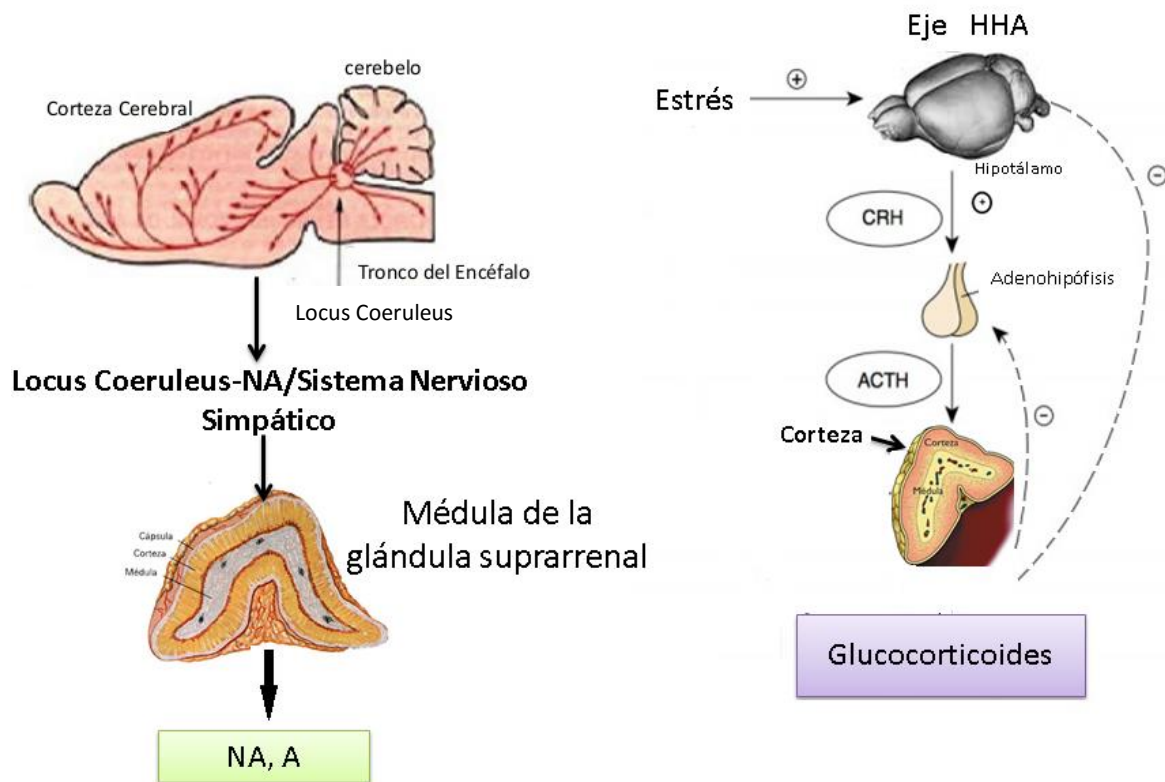


Figura 1. Respuesta de estrés. El cual es dirigido por el sistema de estrés a través de dos componentes (1) el sistema Locus Coeruleus (LC), sistema nervioso simpático (SNS), médula adrenal (LC-NE/SNS) el cual se activa en el estrés agudo y (2) el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) el cual aparece en el estrés crónico. Modificado de Charmandari, *et al.*, 2005.

El estrés se puede presentar en diferentes etapas de la vida ya sea en la edad adulta, en la juventud, en la niñez o incluso en el periodo gestacional. El estrés prenatal modifica las respuestas del cerebro adulto, incluyendo el eje HHA por efecto de los GC (9). De hecho, los GC tienen un fuerte impacto en la programación fetal siendo el cerebro especialmente sensible a este fenómeno y en particular el hipocampo debido a que posee una gran cantidad de receptores para GC.

## 1.2 EL MECANISMO MOLECULAR DE LOS GLUCOCORTICOIDES

Se sabe que los GC tienen dos vías principales para producir sus efectos: Mecanismos no genómicos a dosis altas y de manera rápida, como la alteración de membranas celulares y mecanismos genómicos los cuales son generados a dosis bajas y de manera lenta; por ejemplo: síntesis de proteínas antiinflamatorias inhibidoras de citocinas. En el espacio extracelular los GC se encuentran unidos a las proteínas ligadoras de los GC; al lograr pasar el glucocorticoide al interior de la célula en el citoplasma se une a su receptor específico para activarse posteriormente se une a proteínas de choque térmico que secuestran a el complejo receptor-glucocorticoide este sufre un cambio conformacional donde las proteínas chaperonas se disocian y el receptor es fosforilado sólo así el complejo hormona-receptor se trasloca al núcleo ya en este sitio el complejo forma dímeros y se une a secuencias nucleotídicas específicas del ADN (10), denominadas elementos de respuesta a GC, de esta manera los GC actúan sobre el gen promotor e inducen la síntesis de ARNm, el cual, es transportado al citoplasma donde se lleva a cabo la traducción de la secuencia de sus nucleótidos por los ribosomas para la síntesis de proteínas que posteriormente generaran una respuesta fisiológica (11) (Véase figura 2).

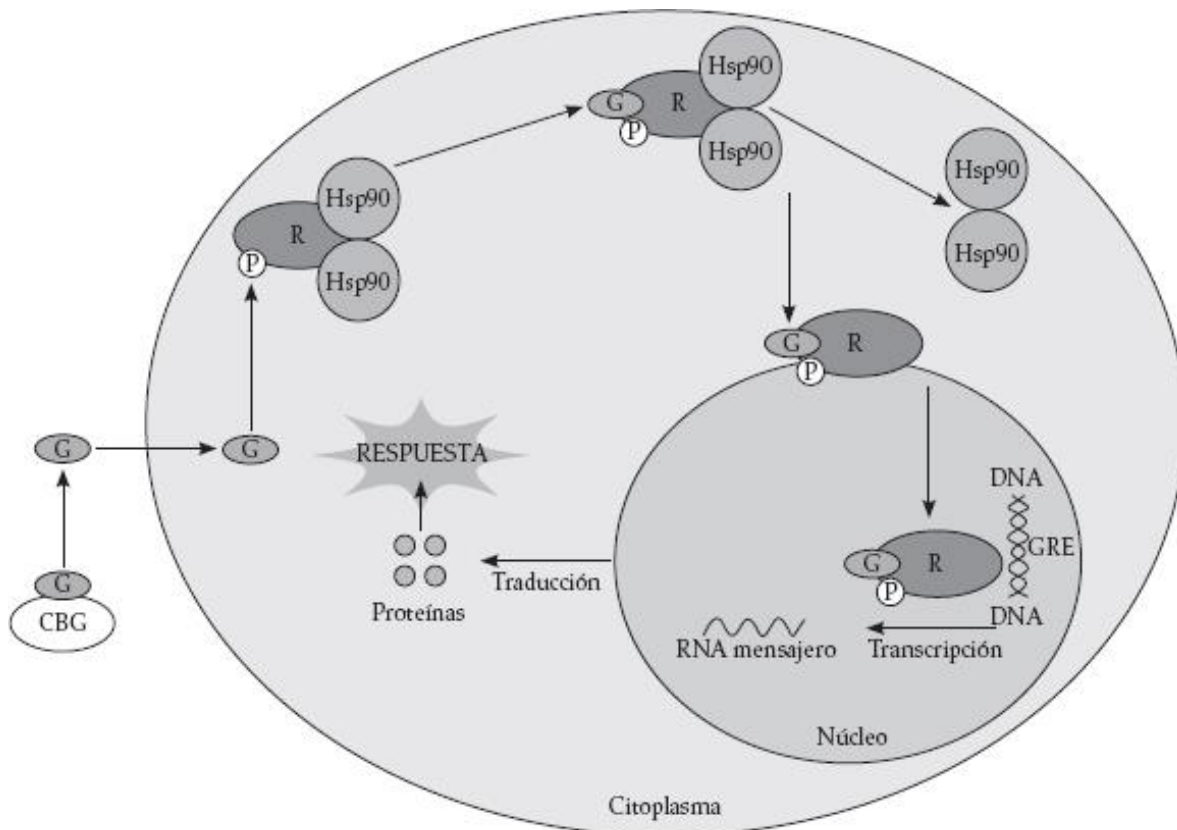


Figura 2. Mecanismo molecular de acción de los GC. En el espacio extracelular los GC se encuentran unidos a las proteínas ligadoras de GC al lograr pasar estos al citoplasma se unen a su receptor específico para activarse, posteriormente se une a proteínas de choque térmico y forman el complejo receptor-GC este sufre un cambio conformacional de las proteínas chaperonas que se disocian y el receptor es fosforilado solo así el complejo se trasloca al núcleo formando dímeros que se unen a secuencias específicas de ADN denominadas elementos de respuesta a GC para su traducción de proteínas que generarán una respuesta. Modificado a partir de Gómez, *et al.*, 2007; Rojas, *et al.*, 2011.

### 1.3 RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES

Los GC actúan a nivel de diferentes estructuras y órganos en el cuerpo para mantener la homeostasis, también participan en el cerebro para modificar el comportamiento y el aprendizaje, debido al efecto neurotóxico de la exposición prolongada a los GC, la cual está regulada por el eje adrenal.

Además de la retroalimentación negativa de los GC la cual se lleva a cabo mediante la unión a los receptores de mineralocorticoides y glucocorticoides en el sistema límbico con las hormonas del estrés; así mismo, también a nivel de hipotálamo e hipófisis, lo cual ayuda a regular el eje adrenal provocando que se sinteticen y secreten más GC y por ende que no lleguen al torrente sanguíneo en grandes cantidades (12).

Los receptores a GC están localizados en todo el cerebro, incluyendo las neuronas CRH del hipotálamo. Existen dos tipos de receptores tipo I y II. El tipo I o Receptor para Mineralocorticoides, se encuentra en estructuras límbicas, como el hipocampo y el septum. Estos receptores participan en la modulación de la respuesta a estímulos emocionales y medioambientales, con cambios consecuentes en la conducta y la actividad del eje HHA (13). Tienen gran afinidad por los GC (el cortisol y la corticosterona). En el sistema límbico, estos receptores tienen alta especificidad para la corticosterona como agonista, mientras que la aldosterona parece ser un antagonista competitivo. Se encuentran en órganos circunventriculares y funcionan como receptores a mineralocorticoides que responden a la aldosterona y regulan la homeostasis del sodio, control cardiovascular y el apetito de sal (14). Con la edad el hipocampo pierde 50% de los sitios de unión tipo I (15). ACTH revierte esta disminución (16). El tipo II o receptor a GC está presente en altas concentraciones en el hipotálamo, particularmente en neuronas de CRH. También se encuentran en áreas donde hay proopiomelanocortina (POMC), como el hipocampo, septum lateral, amígdala y el núcleo del tracto solitario (9). Durante la respuesta de estrés, el receptor tipo II cambia considerablemente (17). Los GC ejercen una

retroalimentación negativa para terminar la liberación de ACTH en respuesta al estrés y tiene efecto a largo plazo sobre la conducta, probablemente esto se lleva a cabo por la participación de los receptores tipo II (1). La reducción de los receptores tipo II es asociado con la disminución en la retroalimentación negativa de los GC, lo cual puede ocasionar un aumento persistente de GC después de la respuesta de estrés. Una persistente elevación de GC circulantes causa degeneración y muerte de las células (9).

#### **1.4 GLUCOCORTICOIDES Y SUS FUNCIONES EN EL HIPOCAMPO**

El hipocampo está situado en la parte medial del lóbulo temporal, constituye una estructura cerebral que juega un papel crucial en la memoria (declarativa en los seres humanos y la memoria espacial en los roedores) (18), así como en la regulación neuroendocrina de las hormonas del estrés (19). La memoria declarativa es el almacenamiento cerebral de hechos y eventos, se expresa conscientemente y es fácil de comunicar verbalmente o por escrito (20). El hipocampo contiene una gran cantidad de receptores para GC, lo que permite la retroalimentación negativa sobre el eje HHA (21), la exposición al estrés en los roedores o la administración de corticosterona (en dosis comparables a las que están presentes en la respuesta de estrés) causa déficit en la memoria espacial acompañado de modificaciones en la estructura neuronal del hipocampo como es la disminución de las ramificaciones dendríticas (22, 23). Las acciones de los GC son más diversas y no siempre facilitan el aprendizaje y la memoria. Los GC pueden afectar a una amplia gama de procesos en el hipocampo en función de las cantidades en las que se presente, y el tiempo



que se someta. El tiempo de exposición es fundamental respecto a si los GC mejoraran o inhibirán la formación de la memoria. Los estudios en animales y humanos han demostrado que la exposición a los GC durante el aprendizaje facilitan la memoria, mientras que la exposición después del aprendizaje o en la etapa de la recuperación tiene el efecto contrario (24).

El estrés crónico puede comprometer la adquisición y la consolidación de la memoria y el estrés agudo leve puede mejorar estos procesos. El efecto del estrés agudo sobre el favorecimiento de los procesos de memoria sigue un comportamiento muy particular de una U invertida de una curva dosis-respuesta (25) similar a la que se observa con modelos experimentales que modulan la memoria por ejemplo la administración de glucosa (26). Las actividades metabólicas de las moléculas liberadas por el eje HHA en la respuesta al estrés son bien caracterizadas periféricamente, en cuanto a cómo actúan para movilizar las reservas de energía, y se sabe menos acerca de sus efectos sobre el metabolismo energético en el cerebro (14). Curiosamente, la NA y los GC tienen efectos opuestos en el cerebro y la movilización de la glucosa tras el estrés, donde la NA aumenta rápidamente este mecanismo de glucosa (27, 28) mientras que los GC producen una disminución retardada en el metabolismo de la misma (29). Se sugiere que la NA probablemente mejora la utilización de la glucosa en el hipocampo mientras que los GC contrarrestan los efectos de la NA por la disminución de la captación de la glucosa en el hipocampo(29).

Muchos moduladores cognitivos (glucosa o insulina), a nivel fisiológico y a niveles moderadamente incrementados de GC son la clave para el aprendizaje y la memoria dependiente del hipocampo (30). Por su parte, la NA parece ser regulador de otros sistemas de neurotransmisión, tales como el sistema glutamatérgico, implicado también en los procesos de memoria.

## **1.5 NEUROBIOLOGÍA DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA**

El aprendizaje constituye un mecanismo fundamental de adaptación del medio ambiente y es la adquisición de conocimientos del medio que nos rodea mientras que la memoria se emplea comúnmente en dos sentidos, el de registro mental de nuestras experiencias y el del acto de recuperar el registro en cuestión, o sea, la memoria se nos ofrece la recuperación de momentos específicos. En consecuencia el aprendizaje y la memoria son dos procesos íntimamente relacionados ya que se considera que el aprendizaje es la adquisición de información y la memoria es el registro o depósito de lo adquirido (31).

El aprendizaje y la memoria son formas de adaptación de los seres vivos a las condiciones cambiantes del medio ambiente. El aprendizaje se define como la experiencia que produce cambios en el sistema nervioso y que pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento de los organismos (20). Actualmente diferentes trabajos sobre la iniciación y el mantenimiento de la plasticidad sináptica en el hipocampo muestran que tanto el aprendizaje como la potenciación a largo plazo inducida artificialmente producen cambios morfológicos en las espinas

dendríticas, que podrían construir la base estructural de la memoria. Se ha demostrado que, en milisegundos, la activación de las sinapsis pertinentes da lugar a una liberación de glutamato que activa receptores AMPA y, en milisegundos, la despolarización postsináptica local consecuente libera los iones  $Mg^{2+}$  para desbloquear a los receptores de NMDA, permitiendo entonces un gran influjo postsináptico de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de esos receptores y de otros ligados a receptores de glutamato dependientes de voltaje (32). Ello a su vez origina la activación de cinasas que inducen cambios en el citoesqueleto de la neurona en el lapso de minutos y activan factores de transcripción y síntesis de proteínas para el receptor AMPA, las cuales se insertan en la membrana y contribuyen a la estabilización de los cambios en el citoesqueleto de la neurona postsináptica (33).

## **1.6 POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO**

La potenciación a largo plazo (PLP) o Long-term potentiation (LTP) por sus siglas en inglés, consiste en un incremento sostenido en la eficacia de la transmisión sináptica después de estimular una vía aferente con estímulos de alta frecuencia de repetición (EAFR), esto es, todo el proceso de transmisión ocurre más rápidamente y en mayor magnitud (34). La LTP fue descrita en el hipocampo, estructura relacionada con la memoria y el aprendizaje. El hipocampo y la amígdala participan simultáneamente en los estados iniciales de la formación y evocación de la memoria (17). Las neuronas en las estructuras antes mencionadas son capaces de establecer un tipo distinto de sinapsis que necesita la expresión de un tipo especial de receptores de membrana. Ante un estímulo continuo, las neuronas que poseen receptores NMDA (N-metil-D-

aspartato) para el neurotransmisor glutamato se hacen más sensibles a los estímulos recibidos, sintetizando proteínas que aumentan el tamaño y la durabilidad de los botones sinápticos. A este fenómeno se le llama LTP y es una de las bases moleculares de la memoria. La manera de cómo este mecanismo se lleva a cabo es el siguiente: en el estado de reposo las neuronas del hipocampo tienen dos tipos de receptores que unen glutamato AMPA (Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) y NMDA. Los receptores AMPA se abren inmediatamente al reconocer y unirse al glutamato permitiendo la entrada de  $\text{Na}^+$  que produce la despolarización de la célula postsináptica. El otro tipo de receptor, el NMDA, que se encuentra bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$  en estado de reposo, sólo se abre si el estímulo es prolongado e intenso. Ante un estímulo prolongado se libera el  $\text{Mg}^{2+}$  y se produce la apertura de estos receptores NMDA y entra  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la neurona postsináptica. Es fundamental que se den las dos condiciones para la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$ , la unión de glutamato al receptor NMDA y el desbloqueo del canal por un estímulo prolongado. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la neurona provoca la activación de la enzima CaMK-II (proteína cinasa-II dependiente de calcio y calmodulina) y PKC promueven la fosforilación de MAPK a través de señalización de proteínas RAS durante la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, la cascada de señalización está bloqueada por la activación de PKA y SYNGAP, y la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptica; también, se puede inducir la fosforilación de CREB a través de CaMKIV y MAPK. Las proteínas fosforiladas antes mencionadas entre las que se encuentran los receptores de membrana de tipo AMPA también se unen a glutamato. Los receptores AMPA permiten

el paso de iones  $\text{Na}^+$  produciendo una despolarización parcial que hace a la neurona postsináptica más sensible a nuevos estímulos nerviosos (Véase figura 3)(17, 35).

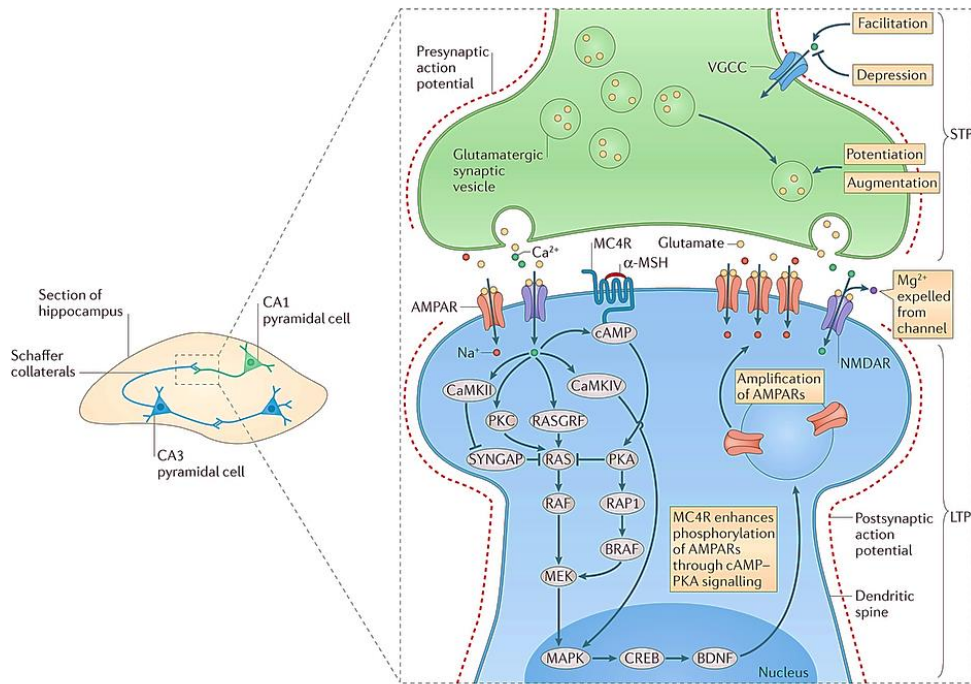


Figura 3. Mecanismo de la potenciación a largo plazo en células piramidales de CA1 hipocámpicas. El receptor NMDA que se encuentra bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$  en estado de reposo que solo se abre ante un estímulo prolongado una vez abierto el receptor NMDA entra  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la neurona postsináptica, esto provoca la activación de la enzima CAMK-II, esta cinasa fosforila a proteínas que se encuentran en los receptores de membrana tipo AMPA permitiendo la entrada de  $\text{Na}^{2+}$  produciendo la despolarización de la neurona postsináptica haciéndola más sensible a nuevos estímulos nerviosos. Tomado de Caruso V. *et al.*, 2014.

## 1.7 DEPRESIÓN A LARGO PLAZO

La depresión a largo plazo (DLP) o Long-term depression (LTD) por sus siglas en inglés, es un tipo de plasticidad neuronal en la que hay una reducción de la eficacia de la sinapsis neuronal. La LTD en el hipocampo y el cerebelo son las que más se han estudiado, pero también existen otras áreas del cerebro en las cuales se da este fenómeno (36). La DLP puede resultar de estímulos sinápticos fuertes, como ocurre

en células de Purkinje del cerebelo, o de estímulos sinápticos débiles pero persistentes como ocurre en el hipocampo. Se estima que la DLP resulta del decremento en la densidad de receptores postsinápticos, aunque también puede ser influenciada por disminución en la liberación de neurotransmisores. Tradicionalmente, la DLP en el cerebelo se ha asociado con la memoria de trabajo dependiente de la corteza, en cambio en el hipocampo, la DLP puede ser importante para deshacerse de memorias inconscientes almacenadas en el cerebro por un largo tiempo (37, 38).

## **1.8 GLUCOCORTICOIDES Y SU RELACIÓN CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.**

El cortisol es un potente modulador de la memoria lo que afecta de manera diferente los procesos de codificación, la consolidación y la recuperación de la memoria la cual no sólo se deteriora en los niveles de cortisol fuertemente elevados, sino que también los niveles mínimos de cortisol. Esto nos sugiere una función en forma de U invertida, la cual nos describe la relación entre la recuperación de la memoria y las concentraciones de cortisol, está función se ha relacionado con un desequilibrio tanto en el receptor de mineralocorticoides (MR), en los cuales, la activación reducida provoca niveles bajos de GC los cuales median los efectos perjudiciales en la recuperación de la información (39).

Se encontró que los GC tienen efectos pleiotrópicos, es decir, que afectan a diversos tipos de células entre ellas a las células piramidales de CA1 en el hipocampo (24). Se ha reportado que en rebanadas de animales expuestos a niveles altos de

corticosterona disminuye la potenciación a largo plazo y disminuye la diferenciación celular de las células piramidales de CA1 en el hipocampo (40).

### **1.9 RELACIÓN DE LA NORADRENALINA CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.**

Actualmente se ha reportado relación entre la curva invertida en forma de U de dosis-efecto (IUSDEC por sus siglas en inglés inverted U-shaped dose-effect curve) en la modulación de la excitación y la consolidación de la memoria a partir de las relaciones que tiene con el estrés, los niveles periféricos de adrenalina (A), así como los niveles cerebrales de noradrenalina (NA) además de su relación con el aprendizaje y la memoria (41). Por otra parte se ha demostrado que los niveles en plasma modulan la concentración de noradrenalina en el cerebro lo que demuestra que existe una correlación entre la concentración de aminas periféricas y centrales (42). Estudios más recientes han avanzado la comprensión de como la adrenalina y noradrenalina influye en la consolidación de la memoria.

Se ha demostrado que existe una vía neuronal periférica y central que media estos efectos; el núcleo del tracto solitario parece actuar como una conexión entre el sistema endocrino periférico y autónomo y los mecanismos neuronales que regulan los procesos de consolidación de la memoria(42).

Se reportó que la administración de adrenalina en el núcleo del tracto solitario aumenta la liberación de noradrenalina en esta estructura esto indica que la activación farmacológica de receptores adrenérgicos dentro del núcleo del tracto

solitario (NTS) potencia la liberación de noradrenalina en amígdala y esto favorece las tareas de aprendizaje y memoria espacial (43).

Estos datos apoyan la hipótesis de que la liberación de noradrenalina en la amígdala juega un papel fundamental en la mediación de los efectos sobre la activación de estructuras cerebrales relacionadas con la consolidación de la memoria. Ahora si bien lo mencionado anteriormente se reportó en amígdala debemos tener presente que además de esta estructura la inervación de LC donde se produce la noradrenalina también se encuentran en otras áreas cerebrales relacionadas con procesos cognitivos tal es el caso de hipocampo (44).

Se ha reportado que cuando un individuo despierta experiencias o recuerdos estresantes, donde sintió miedo o enojo, se libera adrenalina y GC e induce la liberación de noradrenalina de la amígdala mediante la activación de vías aferentes al núcleo del tracto solitario, los GC entran libremente al cerebro y se unen directamente a sus receptores en el tallo cerebral para potenciar la liberación de noradrenalina, está también provoca la reacción de lucha o huida, incrementando directamente la frecuencia cardíaca, desencadenando la liberación de glucosa de las reservas de energía, e incrementando el flujo sanguíneo hacia el músculo esquelético y además incrementa el suministro de oxígeno del cerebro (45).

Se cree que la liberación de NA y corticosterona puede fortalecer la memoria y el almacenamiento de información la cual surge cuando pensamos o realizamos una acción que nos dejó un aprendizaje mediante la activación de la amígdala a través de



la modulación de las diferentes regiones del cerebro implicadas en dichos procesos incluida la corteza prefrontal, el hipocampo y el núcleo caudado entre otros (45). Se ha planteado la hipótesis de que la activación de los receptores de GC en la amígdala puede facilitar la consolidación de la memoria facilitando así también la vía de señalización de la NA (46).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 ESTRÉS PRENATAL**

Estudios en animales experimentales han demostrado que la exposición fetal a una deficiencia nutricional en general, escases de nutrientes específicos o estrés en esta etapa o durante un periodo crítico puede conducir a alteraciones permanentes en el desarrollo y el mal funcionamiento de la programación temprana que está relacionada con una serie de enfermedades en la vida postnatal incluyendo enfermedades cardiovasculares, alérgicas, esquizofrenia o déficits cognitivos (47). Experimentos realizados en animales demostraron que la exposición de una hembra gestante a condiciones estresantes como ruido, inmovilización, hacinamiento entre otros, reduce el número de las camadas (reabsorción del embrión), provoca malformaciones estructurales, retraso del crecimiento, menor peso al nacimiento de las crías (48).

Otros experimentos en donde las ratas fueron expuestas a diversos estresores durante el periodo gestacional, tales como choques eléctricos en las patas, inmovilización o ruidos inesperados han demostrado que tienen efectos permanentes

en la descendencia y muestran retraso en el desarrollo motor, aumenta la ansiedad cuando son expuestos a nuevos ambientes, disminuyendo el comportamiento social, sexual y presentaron alteraciones en las funciones cognitivas como la atención y el aprendizaje (49). Los cambios generados por el estrés prenatal también pueden ser inducidos por la administración materna de corticosteroides sintéticos, este tratamiento puede causar malformaciones, efectos neurotóxicos particularmente en el hipocampo y retraso en el desarrollo motor (50, 51).

## **2.2 PROGRAMACIÓN DEL CEREBRO FETAL**

La hipótesis de la programación fetal, sugiere que el ambiente intrauterino durante los períodos críticos de la organogénesis y el crecimiento de tejido puede alterar permanentemente la estructura y la función del órgano. Existe cierta relación entre la placenta y la liberación excesiva de GC. Se ha sugerido que el EP induce cambios en el fenotipo de la placenta que pueden tener consecuencias más tarde durante el embarazo sobre el desarrollo del feto. En el humano, la actividad de la CRH placentaria (pCRH) es modulada por el eje HHA. Se ha demostrado que las concentraciones altas de pCRH pueden provocar parto prematuro espontáneo (52, 53). Esta hormona placentaria, también puede influir en el desarrollo fetal del hipocampo debido a que estimula a la ACTH y a su vez estimula la liberación de GC estos niveles elevados provocan que la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2), reduzca su actividad y su expresión. En contraste con la producción de CRH hipotalámica, la cual es suprimida por la liberación de cortisol durante la respuesta de estrés prenatal, la CRH placentaria (pCRH) se incrementa

por liberación de cortisol, de modo que el estrés materno conduce progresivamente a niveles más altos de CRH en el plasma fetal, afectado al hipocampo y áreas límbicas como es el septum lateral y la amígdala cerebral, estas áreas son ricas en receptores para CRH durante y al final de la gestación (54). El estrés prenatal durante la gestación no sólo causa aumento del propio cortisol circulante, sino que también reduce la expresión y actividad de la enzima  $11\beta$ -HSD2 placentaria, la cual es una enzima que metaboliza a los GC en la placenta, dejando el feto menos protegido del paso de GC (55). Al encontrarse inactiva esta enzima promueve la producción y el metabolismo de otras proteínas sensibles y hormonas tales como las prostaglandinas, progesterona, estrógenos, transportador de glucosa (GLUT-1) y lactógeno de la placenta (HPL), esto debido al EP el cual afecta la capacidad de la placenta para entregar nutrientes y oxígeno al feto mediante la alteración de la morfología y el crecimiento de la placenta (56) el flujo de sangre, un determinante crítico de la función placentaria y el crecimiento fetal también se ve afectado por factores ambientales, como el estrés. Por ejemplo, las fluctuaciones en la oxigenación son un potente inductor de estrés oxidante en la placenta, lo que conduce a la activación de las vías activadas por estrés tales como citocinas pro/anti-inflamatorias. Esto se asocia con trastornos del desarrollo neurológico debido a la inhibición de la  $11\beta$ -HSD2 durante el estrés prenatal, lo que podría contribuir al bajo peso al nacimiento, retraso del crecimiento intrauterino y trastornos del embarazo, como parto prematuro y preeclampsia (55, 57).

### 2.3 LOS GLUCOCORTICOIDES Y EL ESTRÉS PRENATAL

Los GC tienen un papel destacado en el desarrollo del sistema nervioso durante el periodo fetal; estas hormonas mantienen la actividad basal del eje adrenal y controlan la sensibilidad del sistema de respuesta de estrés (24). Debido a su carácter lipofílico, las hormonas corticosteroides pueden entrar en el cerebro y se ha demostrado que el eje HHA fetal se reprograma por los factores estresantes durante el embarazo (58). Aunque los mecanismos exactos no se entienden aun completamente, la exposición a GC en una concentración elevada durante el período fetal conduce al retraso en el desarrollo del sistema nervioso y la inhibición de la neurogénesis en el hipocampo (59), lo que podría proporcionar una explicación para los déficits cognitivos observados en la descendencia (60) (Figura 4). Los déficits cognitivos en la edad adulta que son resultado de la exposición a estrés en la etapa gestacional los cuales generan hiperactividad del eje adrenal debido a la exposición de las hormonas del estrés, además de participar en la aparición de trastornos psicológicos como la ansiedad y la depresión (21, 61). Se ha demostrado que el EP aumenta las conductas similares a la ansiedad. En algunos estudios se han evaluado los comportamientos similares a la ansiedad y la función cognitiva en las ratas estresadas prenatalmente (21, 62).

El hipocampo dorsal se ha relacionado principalmente con el aprendizaje y la memoria de tipo espacial así como la corteza cerebral (63). Ambas estructuras nerviosas son blancos vulnerables cuando el organismo se encuentra expuesto a un aumento de GC debido al estrés materno, durante el cual se activa el eje HHA en el

feto. Esto causa que la descendencia estresada prenatalmente presente una reducción en el volumen del hipocampo y asimetría de la corteza cerebral (64).

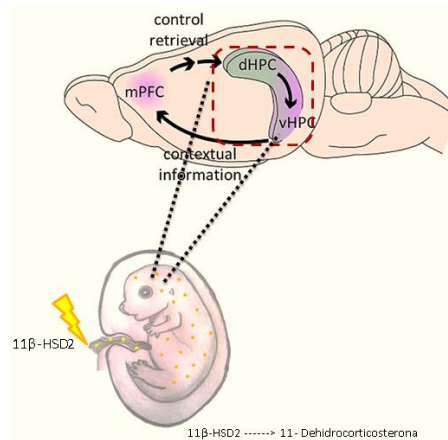


Figura 4. Se representa de manera esquemática, como es que el estrés prenatal y la alta producción de GC al atravesar la barrera placentaria y unirse a estructuras cerebrales, conllevara en la vida postnatal del recién nacido al desencadenamiento de déficits cognitivos como en las tareas de aprendizaje y memoria.

## 2.4 CRH PLACENTARIO

Se ha reportado que el eje HHA se altera drásticamente en el embarazo humano, ya que la placenta expresa receptores donde se une la CRH (65). La pCRH incrementa de manera exponencial conforme el embarazo avanza y alcanza niveles muy elevados los cuales se dirigen hacia la circulación materna este fenómeno forma parte del eje HHA y se presenta durante el estrés fisiológico, en contraste con la retroalimentación negativa del eje adrenal sobre la expresión del gen para CRH materno en el hipotálamo, la corticosterona activa la región promotora en la placenta y estimula su síntesis (66). El aumento elevado de la pCRH que es estimulada por señales provenientes de la madre debido al estrés al que se somete esto ocasiona

que se desencadene una serie de eventos los cuales resultan en la activación del miometrio y en casos extremos se presenta el parto prematuro (67).

El estrés agudo por choques eléctricos en las patas aplicados durante la gestación del día 13 al 19, género daño en la descendencia adulta en las tareas de aprendizaje y memoria, donde las latencias dentro del LAM para encontrar la plataforma eran mayores en los días 2 al 4 de entrenamiento y después del entrenamiento cuando retiraron la plataforma la rata presentó problemas para la recuperación de la memoria, teniendo relación con la disminución de la PLP y favoreciendo la DLP (68). Se sugiere que una posibilidad podrían ser cambios neuroendocrinos en la descendencia estresada prenatalmente, o probablemente también la elevación prolongada de los GC plasmáticos (69).

## **2.5 ESTRÉS MATERNO Y SUS EFECTOS EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.**

Guerrero-Aguilera *et al.*, (2016) reportaron que el estrés prenatal por inmersión en agua fría genera déficits cognitivos en la descendencia adulta cuando se someten a pruebas de aprendizaje y memoria espacial, lo cual propone que puede ser debido a la disminución de la neurogénesis en el hipocampo, demostrando que la estimulación táctil parece revertir los efectos del EP, estimulando la diferenciación neuronal en el giro dentado y disminuyendo la reactividad del eje adrenal (70).

Se ha reportado, que el estrés prenatal causa alteraciones en algunas conductas de la descendencia, tales como el aprendizaje y la memoria. Estudios en los humanos

han reportado una mayor incidencia de anomalías en el comportamiento de los niños nacidos de madres que sufrieron estrés psicológico por discordia marital, amenaza de guerra inminente o la muerte del cónyuge durante el embarazo, la descendencia presenta interacción social disminuida, respuesta locomotora disminuida y deficiencias en la realización de tareas de aprendizaje y memoria (71). El estrés prenatal altera el desarrollo neuronal por efecto de los corticosteroides, así como los procesos neuroquímicos en el cerebro. Se han reportado cambios a largo plazo en la neurotransmisión monoaminérgica por efecto del estrés prenatal (72).

El estrés repetido también conocido como crónico durante el desarrollo cerebral prenatal humano se ha asociado con la disminución en el aprendizaje, y/o trastornos mentales en la edad adulta (73). Los estudios en modelos animales de estrés prenatal apoyan estos hallazgos, y proporcionan evidencia de que el estrés prenatal causa en las crías anormalidades en el comportamiento como tendencia a la disminución de la interacción social, aumento de la emocionalidad (74), aumento de la respuesta locomotora a las situaciones novedosas, y alteraciones en la conducta sexual (75). Además, los estudios sobre la capacidad de aprendizaje de los hijos de madres estresadas revelan deficiencias en las tareas de aprendizaje y la adquisición de la memoria, utilizando las pruebas de laberinto en T (76). En roedores, el estrés prenatal se ha asociado con trastornos en el eje HHA (55).

## 2.6 SEROTONINA, NORADRENALINA, APRENDIZAJE Y MEMORIA

La serotonina es una amina que se relaciona con procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria en diferentes estructuras como el estriado, la amígdala y el hipocampo (77).

La perturbación del sistema de 5-HT tiene un papel importante en la fisiopatología de los mecanismos de aprendizaje y memoria (78), también es importante en el desarrollo normal del cerebro (79). La última parte del desarrollo fetal en la rata se caracteriza por la diferenciación rápida y el crecimiento axonal de las neuronas 5-HT (80). La 5-HT está implicada en la maduración del SNC como una señal para la diferenciación de células progenitoras en desarrollo a lo largo de las vías serotoninérgicas en todo el encéfalo (61, 79). Actualmente se sabe que los receptores de 5-HT participan en la generación de memoria en distintos estadios del aprendizaje (adquisición y/o consolidación de ésta) facilitándola o bloqueándola (81). Los receptores de 5-HT incluyen a los subtipos 5-HT1A, 5-HT4, 5-HT6 y 5-HT7 y se les ha involucrado en funciones específicas, entre ellas, la formación de la memoria y en los desórdenes cognitivos de la enfermedad de Alzheimer y de la esquizofrenia (82).

El estrés prenatal también afecta al sistema serotoninérgico (5-HT) en el hipocampo de crías de ratas (76, 83, 84) y modifica además los niveles de 5-HT se sabe que también parece modificar los niveles de norepinefrina en algunas regiones del cerebro tales como el hipocampo y la amígdala entre otras (82). Sin embargo, hasta



la fecha no se han realizado estudios en los que se evalué la participación de las monoaminas en los procesos de aprendizaje y memoria, en la descendencia estresada prenatalmente (85, 86). Considerando que la 5-HT tiene amplias proyecciones en el cerebro, puede participar como neuromodulador en los diferentes estadios del aprendizaje y la memoria; es decir, en los mecanismos neurobiológicos involucrados en los procesos de adquisición, consolidación y evocación de la memoria (82). La Noradrenalina (NA), es esencial para la modulación de la memoria, se libera en diversas partes del cerebro de las terminales nerviosas controladas por el locus coeruleus (LC), como por ejemplo, el hipocampo y las áreas superiores del cerebro también se produce dentro de su principal núcleo de síntesis (87). Sin embargo, a la fecha no existen reportes acerca de los cambios que pudieran presentarse en esta amina por efecto del estrés prenatal y si dichos cambios pudieran estar relacionados con alteraciones en el proceso de aprendizaje y memoria.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Se ha evaluado la conducta de aprendizaje y memoria en organismos adultos y algunos trabajos no ven efecto del estrés prenatal en la memoria y el aprendizaje espacial en donde el hipocampo participa, a la fecha no se han evaluado si la 5-HT y NA se modifican por efecto del estrés prenatal y como participan en el aprendizaje y la memoria asociado con el contenido tisular. En algunos estudios se ha evaluado el contenido de 5-HT y NA que se encuentra en hipocampo y no observan cambios pero aún no se ha cuantificado el contenido de estos neurotransmisores en respuesta a los eventos del aprendizaje y la memoria en animales estresados prenatalmente. En este estudio se evaluó el contenido de 5HT y NA en el hipocampo dorsal de ratas adultas estresadas prenatalmente. De esta manera se espera poder dilucidar la relación de los neurotransmisores mencionados con las alteraciones en el aprendizaje y la memoria causadas por el estrés prenatal.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿De qué manera el estrés prenatal modifica la liberación de 5-HT y NA en el hipocampo de ratas en la etapa adulta y cómo se relacionan estos cambios con las alteraciones en el aprendizaje y la memoria espacial?

## **5. HIPÓTESIS**

El estrés materno provoca alteraciones en el aprendizaje y la memoria de la descendencia modificando el contenido de 5-HT y NA, en el hipocampo dorsal de la descendencia en etapa adulta lo cual encuentra relación con las alteraciones en el aprendizaje y la memoria.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el efecto del estrés prenatal en el aprendizaje y la memoria y su relación con la 5-HT y NA en el hipocampo de la descendencia adulta.

## **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la capacidad de aprendizaje y memoria en ratas adultas estresadas prenatalmente.
- Determinar la relación del desempeño en el aprendizaje y la memoria con la liberación y el contenido tisular de NA y 5-HT en el hipocampo de ratas adultas estresadas prenatalmente.

## **8. MATERIALES Y MÉTODO**

### **8.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se utilizaron a hembras preñadas de la cepa Wistar y se eligieron aleatoriamente a los grupos control el cual se mantuvo inalterado durante el experimento y, al grupo de estrés prenatal por inmersión en agua fría del día 15 al día 21 de gestación aproximadamente en el día 22 nacieron las crías y en el día postnatal 22 se desataron y sexaron se utilizaron únicamente machos. A la edad de 2 ½ meses de edad se realizó una cirugía estereotáxica para la colocación de cánulas dirigidas a hipocampo dorsal para realizar microdiálisis y cuantificar la liberación de 5-HT, 5-HIAA y NA. Paralelamente a esto se utilizaron otros grupos de control y EP para someterlos a la prueba de LAM y sacrificarlos por decapitación en los días 1, 4, 7, 13 de la prueba y se extrajo el hipocampo dorsal para la cuantificación de contenido tisular de 5-HT, 5-HIAA y NA, el contenido fue cuantificado por HPLC-ED (Figura 5).

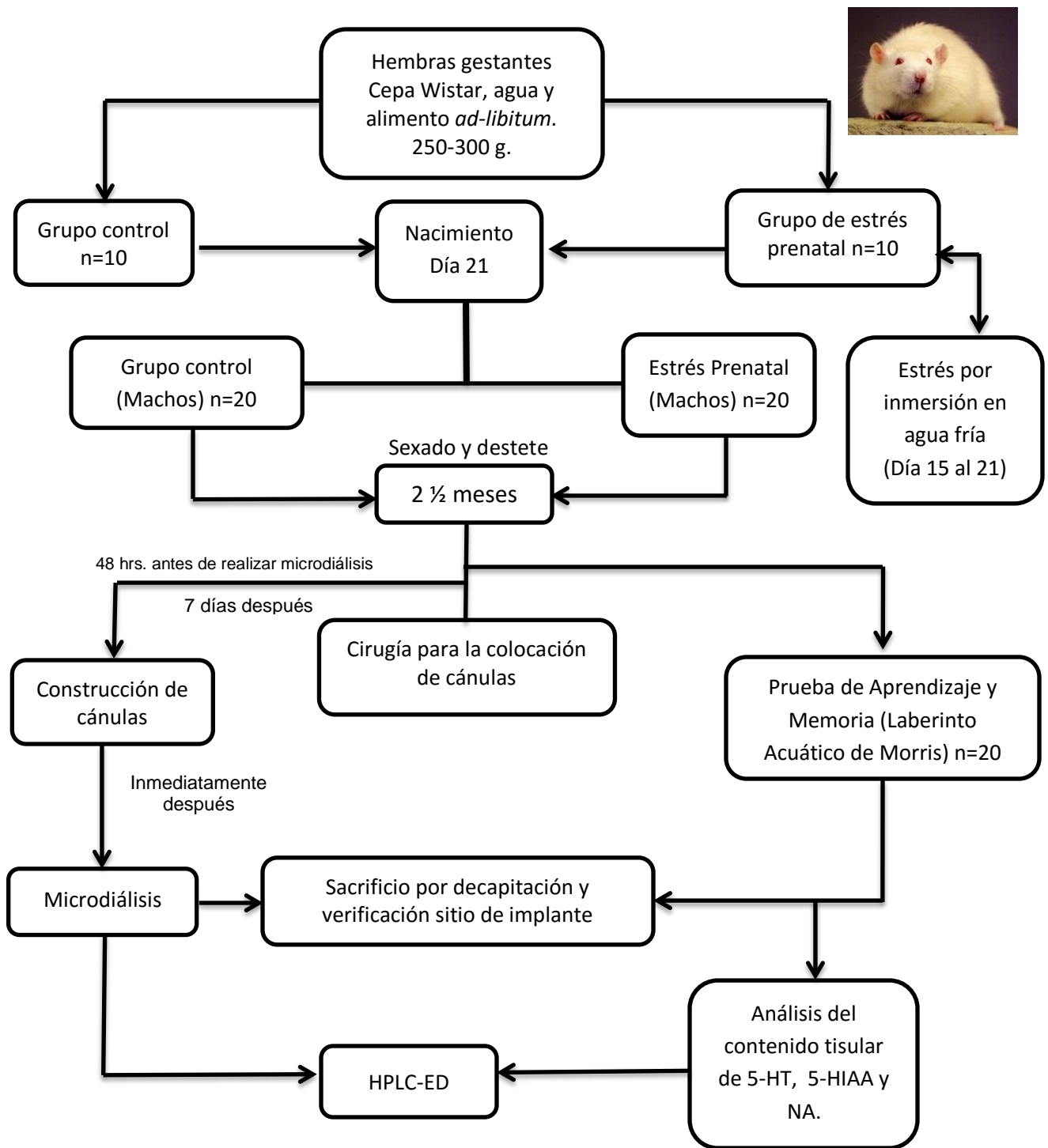


Figura 5. Diseño Experimental.

## **8.2 MODELO BIOLÓGICO**

En el presente estudio se utilizaron ratas Wistar macho de 250-300 g. de 2 meses y medio de edad, adquiridas en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa las cuales se colocaron en cajas jumbo de plexiglás transparente, y se alimentaron con comida y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-25°C) y en ciclos invertidos de 12 horas luz-oscuridad (con el comienzo de la fase de luz a las 9 pm) y fueron distribuidos en grupos control y experimentales. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062- ZOO-1999) y de acuerdo al Comité de Ética de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

## **8.3 ESTRÉS POR INMERSIÓN EN AGUA FRÍA**

Durante la última semana de gestación (del día 15 al día 21), las hembras gestantes asignadas al grupo de estrés prenatal, fueron sometidas dos veces al día a estrés por inmersión en agua fría (9:00 am y 3:00 pm) durante 7 días consecutivos. El estrés consistió en colocar individualmente a las ratas en una caja con agua a 15°C y una profundidad de 15 cm, durante 15 min (88, 89).

## **8.4 LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS**

La descendencia de 2 ½ meses de edad tanto el grupo control como de estrés prenatal fueron sometidos al LAM, las pruebas se realizaron en una piscina circular, (170 cm de diámetro y 50 cm de altura) la piscina tiene una altura del agua de 30 cm

a una temperatura de  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ . La piscina se dividió en cuatro cuadrantes imaginarios (noreste NE, noroeste NO, sureste SE, suroeste SO) iguales tomando como referencia la zona de acceso al laberinto, al liberar al sujeto para la realización de la prueba se lleva a cabo desde diferentes puntos de partida en cada repetición así como en cada día y tres figuras que se colocaron en las paredes blancas alrededor de la tina, las cuales funcionaron como pistas espaciales dentro de la piscina también se colocó una plataforma de acrílico transparente (19cm x 22cm) que se encontraba por debajo de la superficie del agua (2 cm) en uno de los cuadrantes cerca de la pared y del centro de la piscina (Véase figura 6). Los parámetros conductuales que se analizaron fueron: Latencia de escape, que hace referencia al tiempo que tardan las ratas en encontrar la plataforma sumergida durante la fase de aprendizaje y en las memorias de corto y largo plazo y en las sesiones en las que se retiró la plataforma (día 7) de la piscina se evaluó: el tiempo de permanencia en el cuadrante que es el tiempo que la rata se encuentra en el cuadrante en donde estuvo la plataforma y el número de cruces de la rata sobre la zona donde anteriormente se encontraba la plataforma durante la fase de aprendizaje (60, 90).

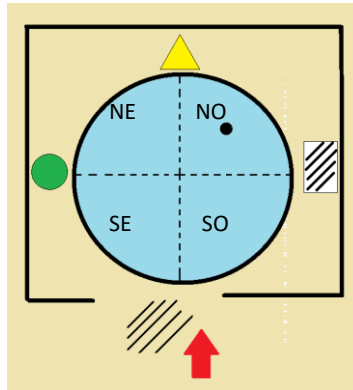


Figura 6. De manera esquemática se ejemplifican el laberinto acuático de Morris el cual está conformado de tres pistas espaciales alrededor de la tina, la división imaginaria de los cuadrantes (noroeste NE, noreste NO, suroeste SE, sureste SO) así como la posición de la plataforma en uno de los cuadrantes (NO).

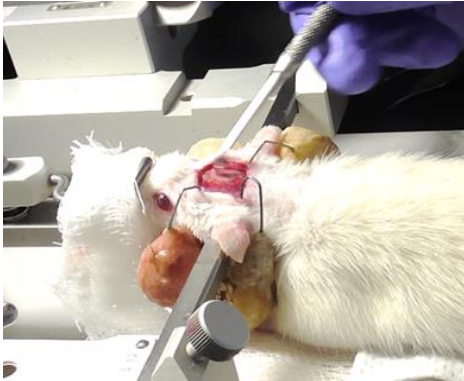
## 8.5 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

La cirugía consistió en colocar una cánula dirigida al hipocampo dorsal del cerebro de rata para la posterior recolección de microdializados. Para llevar a cabo la cirugía se eligieron ratas macho de la cepa Wistar entre 250 – 350 g. después se anestesió la rata con ketamina 80 mg/kg, i.p. y Xilacina 20 mg/kg, i.m., posteriormente se colocó en un aparato estereotáxico, se realizó una incisión anteroposterior en el cráneo de la rata para exponer el cráneo y tomar las coordenadas dirigidas a hipocampo dorsal (AP: -5.3, L: 5.2 mm, P: 3.0 mm) para hacer esto se coloca la cánula con respecto a bregma y se toman las coordenadas (91), una vez que tenemos la ubicación se procede a realizar trepanaciones para poder introducir la cánula en el hipocampo dorsal, inmediatamente después, se realizan cuatro trepanaciones más para la colocación de tornillos y así poder dar soporte a la cánula guía, esta se colocó para proporcionar dirección a la cánula de microdialisis que

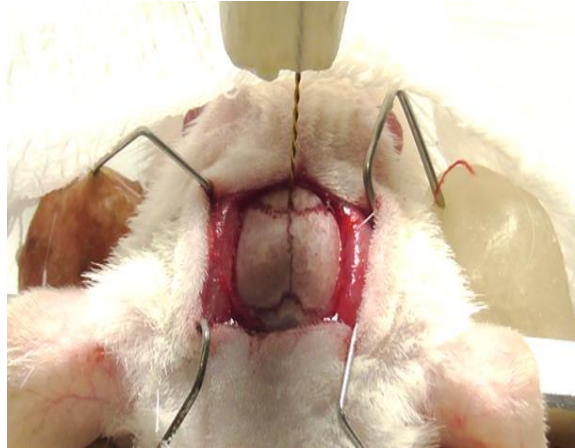


después en el momento que se realice la microdiálisis será introducida por la cánula guía y se fijara con acrílico dental para fijar bien todos los materiales (Véase figura 7).

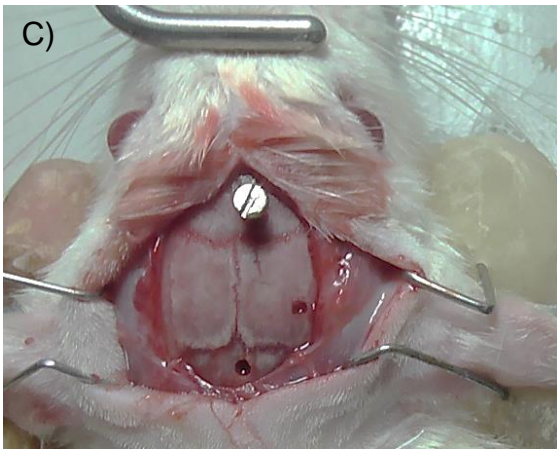
A)



B) AP: -5.3, L: 5.2 mm, P: 3.0 mm



C)



D)

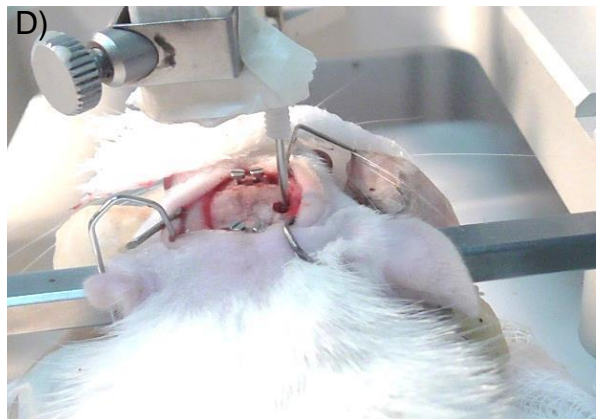




Figura 7.- Cirugía estereotáxica en el hipocampo dorsal en la rata. A) Incisión anteroposterior en el cráneo de la rata para exponer el cráneo, B) Colocación de la cánula en la intersección de bregma para tomar las coordenadas dirigidas a hipocampo dorsal (AP: -5.3, L: 5.2 mm, P: 3.0 mm), C) Se realizan 3 trepanaciones en el cráneo de la rata para colocar tornillos para fijar el implante, D) Una trepanación de un diámetro mayor se realizó para introducir la cánula al cerebro con la coordenadas previamente calculadas E) Una vez que la cánula se introdujo se fija el implante con acrílico dental.

## 8.6 MICRODIÁLISIS

Después de 7 días posteriores a la cirugía se introdujo una cánula de microdiálisis la cual sobresale 3mm por debajo de la cánula guía y se localizó en el hipocampo dorsal y se fijó al cráneo con acrílico dental. La parte activa de la cánula de microdiálisis, consistió de una membrana de poliacrilonitrilo cuyo tamaño del poro es de 40,000 D. Esta membrana permite la difusión de los compuestos a través de ella por medio de difusión pasiva, lo cual hace posible la recuperación del contenido intracelular y estimar con exactitud la liberación de neurotransmisores y sus metabolitos.

En cada animal de experimentación se realizó la infusión de solución Ringer modificada (SRM) compuesta de NaCl 147 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.3 mM, KCl 4 mM y ácido ascórbico 12.5  $\mu\text{M}$ ; pH=7.4 mediante la cánula de microdiálisis previamente

colocada, a través de una microjeringa Hamilton (1 mL) acoplada a una bomba de infusión kd Scientific, Stoelting. La perfusión se realizó a una velocidad de 0.5  $\mu$ L/min durante 2 hrs. se mantienen a los animales en la fase de estabilización, después de este periodo se inicia con protocolos experimentales en la cual los dializados se colectan cada hora posterior a esto se le administró 50 mM de alto potasio durante 10 minutos, para posteriormente ser analizados por HPLC (92).

## **8.7 MANIPULACIÓN DEL TEJIDO**

Los animales utilizados para la realización de los experimentos se sacrificaron por decapitación, se disecó el cerebro y se congeló rápidamente en hielo seco, para posteriormente almacenarse a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los cerebros se cortaron mediante el uso de un criostato marca Leica modelo CM 1510-3, para obtener secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  de grosor de cada cerebro a nivel del hipocampo dorsal. Las secciones obtenidas se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizadas posterior a esto se realizó la tinción de Nissl (descrita abajo), a las muestras se les colocó resina sintética y un cubreobjetos y se esperó hasta que secan (93).

## **8.8 EVALUACIÓN DEL SITIO DE IMPLANTE CON LA TINCIÓN DE NISSL.**

En esta técnica el colorante básico violeta de cresilo tiñe los cuerpos de Nissl que son cúmulos de material basófilo localizados en el citoplasma de las células nerviosas. El cuerpo de Nissl consiste en una agregación de cisternas membranosas aplanadas de retículo endoplásmico con ribosomas y polisomas diseminados entre las cisternas adyacentes. El ARNr es la causa de la basófila de estos gránulos (94).

Para la realización de los cortes de cerebro se utilizó el criostato para conocer la trayectoria de la cánula y confirmar si la cánula que implantamos está en la región de interés, en este, caso hipocampo dorsal. La tinción de Nissl (Violeta de Cresilo) consistió en pasar los cerebros por xilol y posteriormente en etanol al 100%, etanol al 95% y etanol al 70% y por último en agua Milli-Q en ese orden y durante 5 minutos en cada solución. Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo durante 30 min y el exceso de colorante se eliminó sumergiéndolas por 5 min en agua Milli-Q. Una vez que se terminó de enjuagar se colocaron las laminillas en etanol al 70%, 95%, 100% también durante 5 minutos. Finalmente, las laminillas se colocaron en el xilol hasta que los cortes cerebrales se aclararon una vez que se hizo esto se montaron las muestras con resina sintética (Bálsamo de Canadá), se dejó secar y se observó en el microscopio estereoscópico.

## **8.9 DISECCIÓN DEL HIPOCAMPO**

Se disectó el hipocampo dorsal para determinar el contenido total de neurotransmisores en esta estructura. Los animales fueron sacrificados por decapitación inmediatamente después de que finalizó la exposición a la prueba de aprendizaje y memoria (Laberinto Acuático de Morris). A cada animal se le extrajo el cerebro, se colocó en una caja de Petri, la cual estuvo colocada sobre hielo en todo momento para mantener frío el cerebro. Posteriormente se extrajo la estructura cerebral de interés (hipocampo dorsal separado en derecho e izquierdo) el tejido obtenido se colocó en un tubo y se pesó antes y después para obtener el peso solo

del tejido, se rotuló y se colocó sobre hielo seco y posteriormente se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### **8.10 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE 5-HT Y NA POR HPLC.**

Primero se realizó la estabilización del equipo de 24-48 hrs. para que la señal se observara mejor con respecto a las monoaminas se utilizó un sistema Perkin-Elmer LC-250 de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector electroquímico, se utilizó una columna Alltec (C18 100 x 4.8 mm con un tamaño de entre partículas de  $3\ \mu\text{m}$ ), la velocidad de flujo fue de  $1\ \mu\text{L}$  por minuto.

#### **8.11 HOMOGENIZACIÓN DEL TEJIDO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO TISULAR.**

Las muestras de hipocampo dorsal que se tenían almacenadas se descongelaron posterior a esto se agregaron  $300\ \mu\text{L}$  de ácido perclórico y se homogenizó el tejido, con un embolo el tejido homogenizado se colocó en todo momento en hielo y se mantuvo cubierto para evitar que la luz no degradara la muestra, posteriormente se centrifugaron por 15 minutos a una temperatura de  $7^{\circ}\text{C}$  a 8000 revoluciones por minuto. El sobrenadante se filtró y se almacenó en congelación a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Se inyectaron  $25\ \mu\text{L}$  de la muestra filtrada al sistema cromatográfico. La fase móvil consistió en una solución acuosa de buffer de fosfatos (0.1 M con un pH de 3.2) la cual contenía 0.2 mM de sulfato de sodio, 0.1 mM de EDTA y 15% metanol v/v.

## 8.12 CUANTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES POR HPLC

Para cuantificar la liberación de 5-HT y NA, antes de ser sometidas al Laberinto acuático de Morris, se llevó a cabo por medio de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC de sus siglas en inglés), el cual consistió en un análisis cromatográfico de fase reversa de una columna Atlantis 5  $\mu\text{m}$ , 2.1 cm x 50 mm y una pre-columna Nova-Pack, Waters 5  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 10 mm. La fase móvil fue: EDTA (0.054 mM), ácido cítrico (0.05 M), ácido octansulfónico (0.1 mM), cloruro de sodio (NaCl 2.31 mM), acetonitrilo (50 mL/L) disueltos en agua Milli-Q a un pH= 2.9, flujo de 0.35 mL/min. La detección de catecolaminas se realizó mediante un detector electroquímico amperométrico de un solo canal (Waters ® model 2465, U.S.) a un potencial de 450 mV y a una temperatura de 30 °C, se cuantificó por mediciones del área de los picos comparándolos contra una curva estándar (Figura 8) (92, 95).

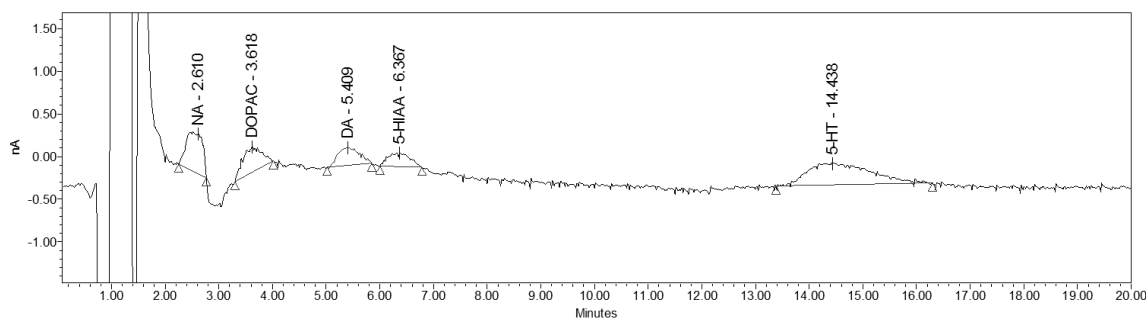


Figura 8. Cromatograma de un HPLC-ED. Se obtuvo los picos de las diferentes catecolaminas obtenidas de una solución estándar de 10 nM y el rango de sensibilidad al que se encuentra es de 5 nA.

**8.13 CURVAS ESTÁNDAR, ASÍ COMO LOS COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE 5-HT, 5-HIAA Y NA QUE SE OBTUVIERON AL CUANTIFICAR EL CONTENIDO TISULAR DE HIPOCAMPO DORSAL.**

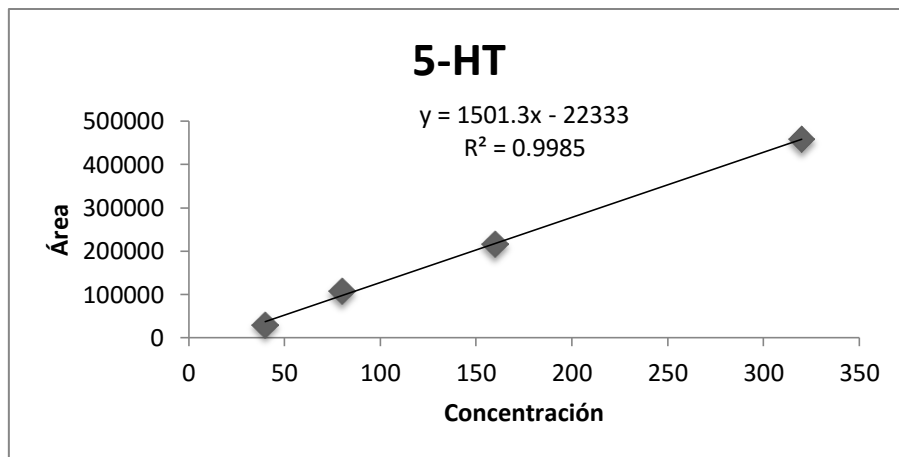


Figura 9. Se muestra en la gráfica la curva estándar de serotonina (5-HT) con los estándares de 40, 80, 160, 320 así como su coeficiente de correlación el cual es de  $R^2=0.9985$ .

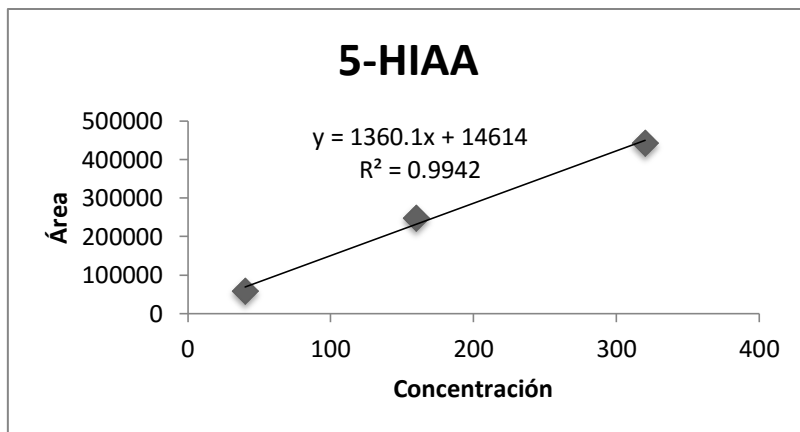


Figura 10. Se muestra en la gráfica la curva estándar del metabolito de la serotonina (5-HIAA) con los estándares de 40, 80, 320 así como su coeficiente de correlación el cual es de  $R^2=0.9942$ .

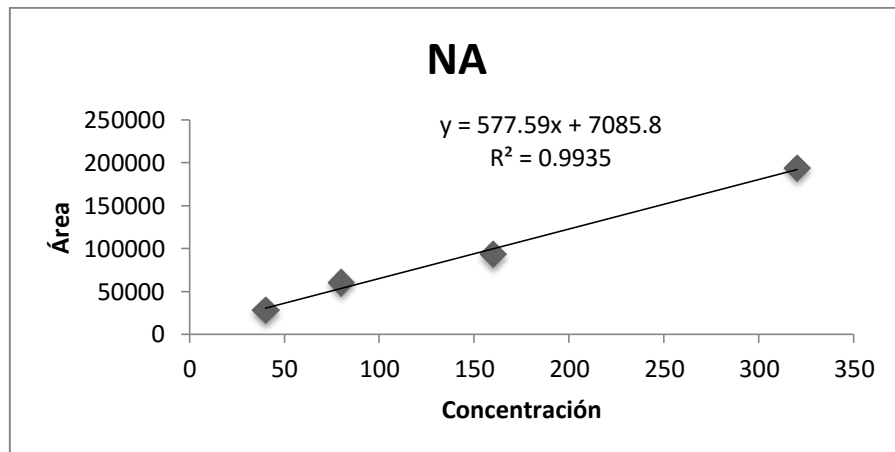


Figura 11. Se muestra en la gráfica la curva estándar de noradrenalina (NA) con los estándares de 40, 80, 160, 320 así como su coeficiente de correlación el cual es de  $R^2=0.9935$ .



## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se presentaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Los datos obtenidos del Laberinto acuático de Morris (LAM) se analizaron con una ANOVA de un factor de medidas repetidas, seguidas por una prueba post hoc de Newman-Keuls. Mientras que las latencias promedio obtenidas del LAM se analizaron con una t-Student, el contenido tisular utilizó una ANOVA de comparaciones múltiples seguida de una prueba post hoc de Dunnett. El análisis de los porcentajes de permanencia en el cuadrante se analizaron con la prueba de Chi-cuadrada y los valores de número de cruces se analizaron con una ANOVA de 1 factor. Las diferencias serán consideradas estadísticamente significativas a partir de una  $P < 0.05$ .

## 10. RESULTADOS

### 10.1 LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

Las latencias de llegada a la plataforma disminuyeron durante los días de aprendizaje (1-4) en los animales del grupo control, y también en los días 6 y 13 donde se evaluó la memoria a corto y a largo plazo. Los sujetos de EP presentaron latencias de llegada mayores a las del grupo control en todos los días de la prueba, estas diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 12).

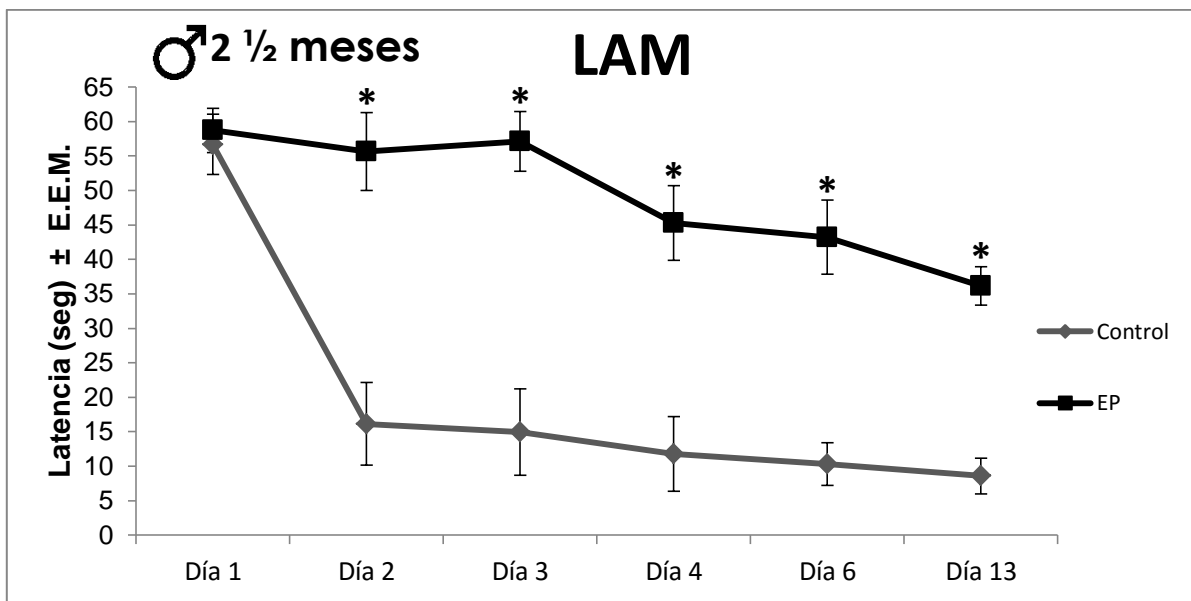


Figura 12. Latencias de llegada a la plataforma. Los animales estresados prenatalmente presentaron mayores latencias de llegada. Los animales del grupo control presentaron latencias de llegada progresivamente menores cada día. Las latencias de llegada en los días 2, 3, 4, 6 y 13 de evaluación de la prueba de memoria espacial en los animales de EP son estadísticamente diferentes en comparación con el grupo control  $P < 0.05$ .  $n = 20$  por grupo

Las latencias promedio de los machos de EP fueron significativamente mayores a los controles ( $p < 0.05$ ; Figura 13).

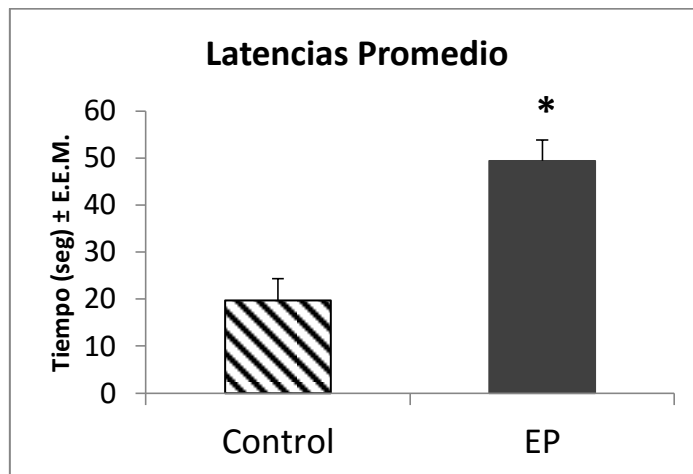


Figura 13. Latencias promedio de escape en los animales control y EP. Las latencias fueron mayores en los sujetos de EP en comparación con el grupo control,  $*p < 0.05$ . Datos mostrados como la media  $\pm$  E.E.M.

#### 10.1.1 Memoria de corto plazo.

De acuerdo con la prueba de LAM y con el objetivo de evaluar la memoria de corto plazo en los sujetos control y EP en el día 7 se cuantificó el porcentaje de la permanencia en el cuadrante y el número de cruces en donde anteriormente se encontraba la plataforma; durante esta prueba la rata estuvo un tiempo de no más de 60 segundos dentro de la piscina. De acuerdo con las gráficas 13 y 14 se muestra el desempeño de los sujetos control y de EP y los individuos de EP permanecieron menos tiempo en el cuadrante donde estuvo antes la plataforma, y presentaron un menor número de cruces.  $*p < 0.05$  (Figuras 14 y 15).

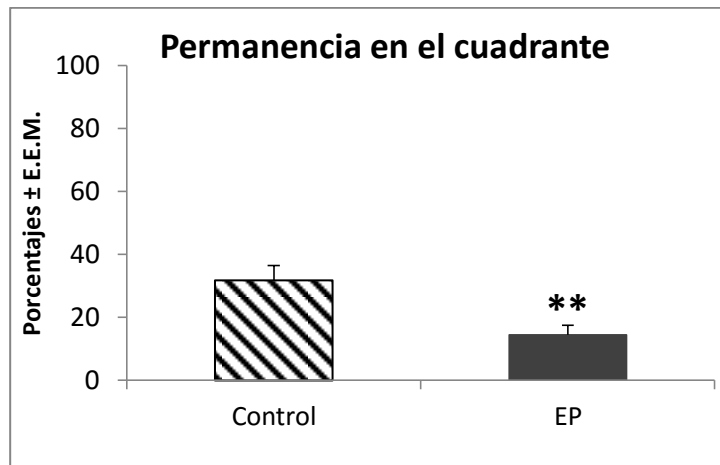


Figura 14. Tiempo de permanencia en el cuadrante en el que se encontraba la plataforma. Los animales EP permanecieron menor tiempo en el cuadrante, en comparación con los animales control. \*\*  $p < 0.01$  comparado con el control.

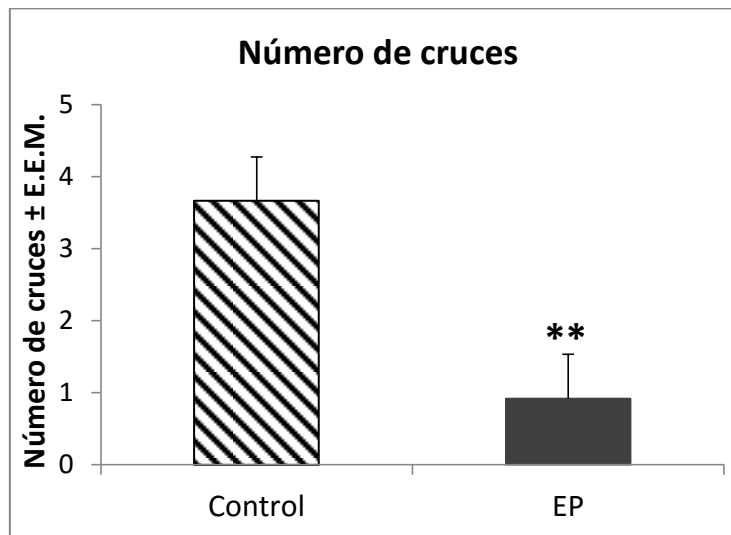


Figura 15. Número de cruces en el cuadrante donde se localizaba la plataforma. Día 7. Los sujetos EP cruzaron un menor número de veces en donde se encontraba la plataforma anteriormente en comparación con los sujetos control. \*\*  $p < 0.01$  comparados con el grupo control.

## 10.2 LIBERACIÓN DE 5-HT, 5-HIAA Y NA.

La evaluación de los microdializados de los sujetos estresados prenatalmente mostró una mayor liberación de serotonina y noradrenalina que en los sujetos control (Figura 16). Cuando se administró el alto potasio, la liberación de las monoaminas (5-HT y NA) fue menor en el grupo estresado prenatalmente, los datos de ambas figuras corresponden a una rata control y una rata de EP (Figura 17).

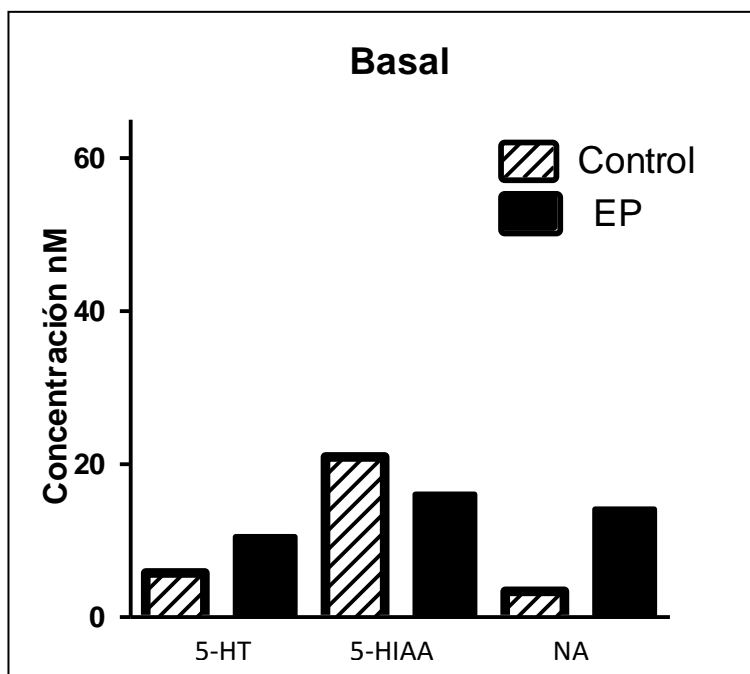


Figura 16. Liberación basal de 5-HT y NA en animales control y estresados prenatalmente. La liberación de aminos en los sujetos de estrés prenatal fue mayor en comparación con el control.

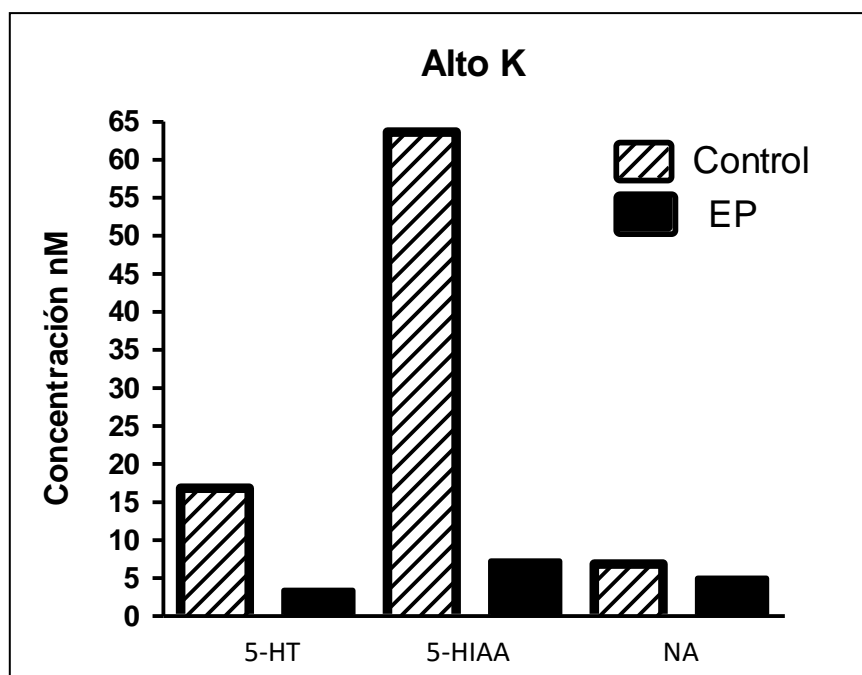


Figura 17. Liberación de aminas después de la administración de alto potasio, 50 mM. La liberación se incrementó en los sujetos controles, no así en los sujetos EP.

### 10.3 CONTENIDO TISULAR DE 5-HT, 5-HIAA Y NA EN HIPOCAMPO DORSAL

#### 10.3.1.1 Serotonina

Se evaluó el contenido tisular de serotonina en el hipocampo dorsal de animales estresados prenatalmente, en condiciones basales y después del aprendizaje (días 1 y 4) y memoria (7 y 13). La concentración de serotonina en el hipocampo dorsal no se modificó durante los días de aprendizaje, pero disminuyó en los días 7 y 13 (memoria de corto y largo plazo, respectivamente) tanto en el grupo control como en el de estrés prenatal. (Figura 18).

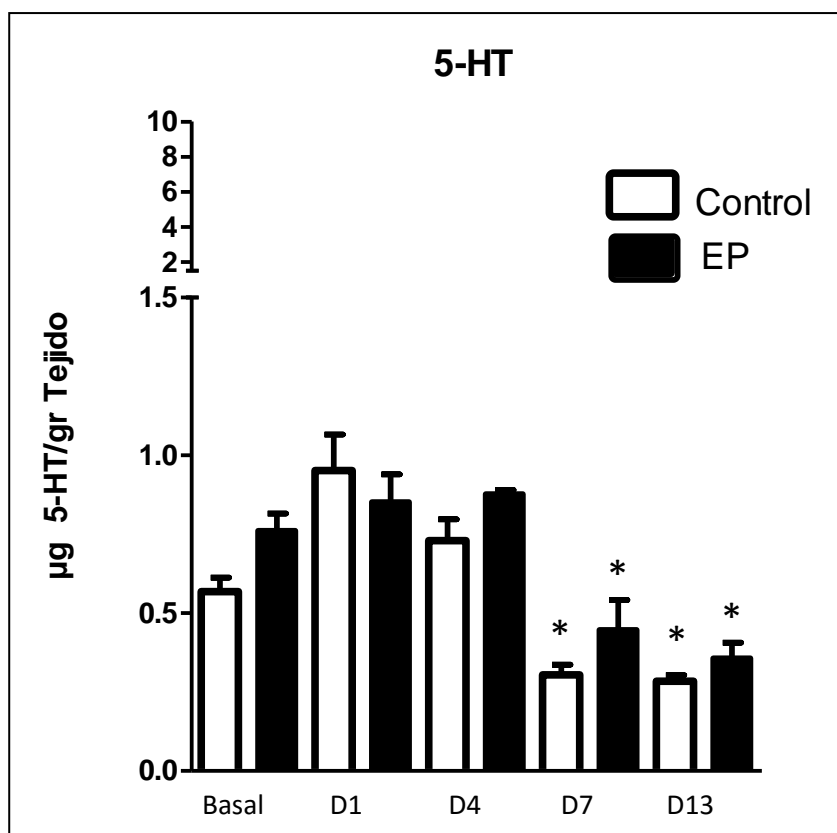


Figura 18. Contenido tisular de hipocampo dorsal comparando los niveles basales de 5-HT y después de la prueba de LAM.

\*  $P < 0.05$  entre los grupos Control y EP basales, D1 y D4 comparados con los grupos de los días 7 y 13.

### 10.3.1.2 5-HIAA

Para evaluar el contenido tisular en hipocampo dorsal del ácido-5-hidroxiindolacético, se utilizó un grupo de ratas controles y estresadas para cuantificar los niveles de metabolito antes de la prueba (basales). Después en otro grupo de ratas del grupo de estrés se evaluó el contenido del metabolito durante la prueba de LAM en los días 1, 4, 7 y 13.

En los días 1 y 4 después de la prueba conductual el metabolito de la serotonina no se modificó en el grupo de estrés prenatal comparado con el control, y en los días 7 y 13 disminuyó en ambos grupos (Figura 19).

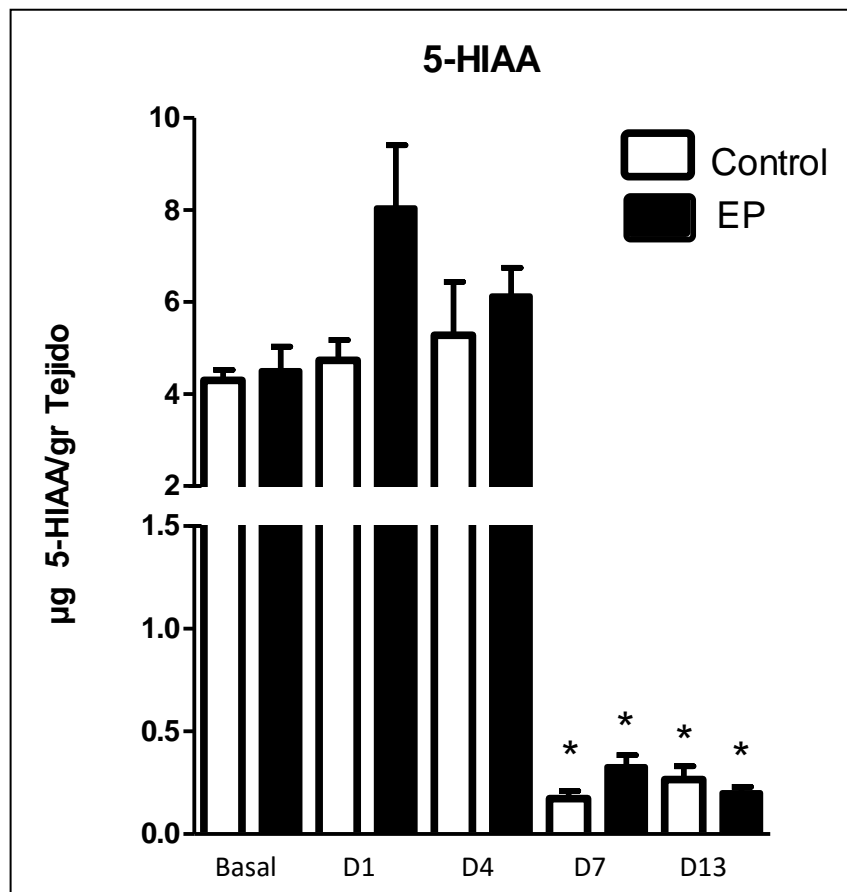


Figura 19. Contenido tisular de hipocampo dorsal comparando los niveles basales de 5-HIAA y después de la prueba de LAM.

\*  $P < 0.05$  disminución significativa entre los grupos Control y EP de los días 7 y 13 comparados con los grupos de los días 1 y 4 y las concentraciones basales de 5-HIAA.



### 10.3.1.3 NA

El contenido de noradrenalina en hipocampo dorsal de sujetos que fueron expuestos a estrés prenatal en condiciones basales antes de la prueba y después del laberinto acuático de Morris no se modificó en los días 1, 4, y 7 del grupo control y de estrés prenatal durante la prueba de LAM. Sin embargo en el día 13 el contenido de NA disminuyó en el grupo de estrés comparado con el control (Figura 20).

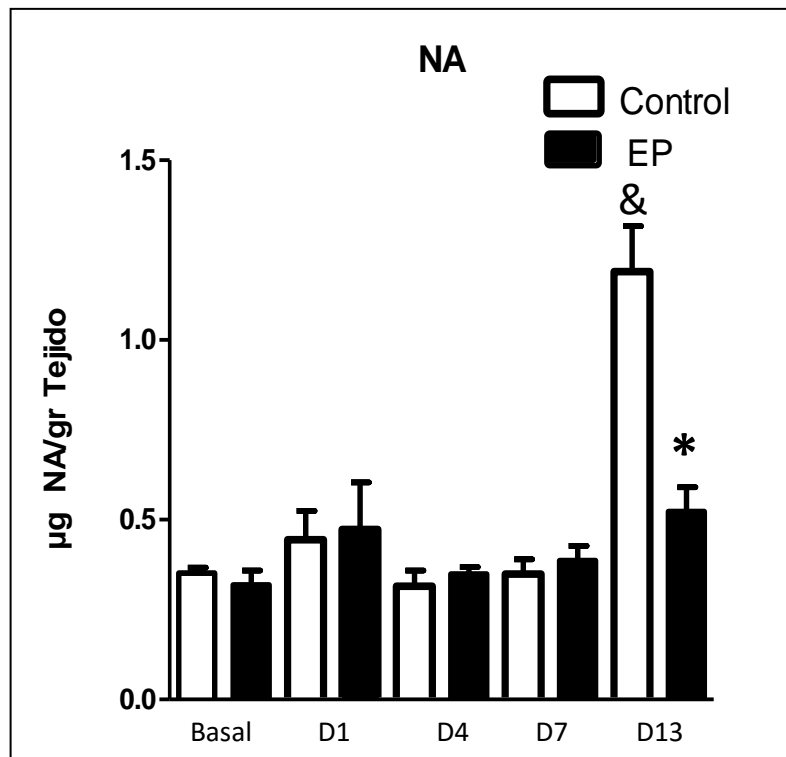


Figura 20. Contenido tisular de hipocampo dorsal comparando los niveles basales de NA y después de la prueba de LAM.

\*  $p < 0.05$  Disminución significativa de los grupos control y EP D13.

&  $p < 0.05$  Incremento en el contenido de sujetos control del D13 con todos los grupos control y EP de los días restantes.

## 11. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las latencias de llegada aumentaron en el laberinto acuático de Morris del día 2 al día 13 en el grupo de estrés prenatal y en el día 7 la permanencia en el cuadrante y el número de cruces disminuyó en el grupo estresado prenatalmente. Lo anterior confirma que las ratas expuestas a estrés por inmersión en agua fría presentan deficiencias en los procesos de aprendizaje y memoria (70, 96).

Los resultados de este trabajo difieren de lo reportado en otros trabajos en cobayas, en las que se utilizaron otros estresores como la luz estroboscópica en los días de gestación 50, 51, 52, 60, 61 y 62. Este estresor no modificó las latencias de llegada a la plataforma en el laberinto acuático de Morris (61). El estrés por inmovilización durante los días 15 al 19 de la etapa gestacional, tampoco modificó las latencias de escape en el laberinto acuático de Morris tanto en hembras como en machos (97).

Sin embargo, existen estudios en los que se reporta que el estrés por inmovilización aplicado del día 15 hasta el nacimiento de las crías provocó aumento en las latencias para encontrar la plataforma en el laberinto acuático de Morris y esto se asocia con la inhibición de la neurogénesis en hipocampo (98).

El estrés social aplicado del día 16 al 20 de gestación, si generó incremento en las latencias de llegada a la plataforma en el LAM (99). Resultados similares se han reportado utilizando el estrés por choques eléctricos en las patas del día 13 al 19 gestacional, generando incremento en las latencias de llegada a la plataforma de las

ratas de 5 semanas de edad en el laberinto acuático de Morris (68). En otro trabajo donde aplicó estrés prenatal por inmovilización en el día 12 al día 18 de la gestación disminuyeron las latencias para encontrar la plataforma en el grupo de estrés (96). Las diferencias en los trabajos antes mencionados con los obtenidos en este estudio, podrían explicarse por el tipo de estresor utilizando, la especie del roedor, los días evaluados de la prueba o diseño del LAM y la intensidad del estresor. Es posible que los niveles de corticosterona sean diferentes después de la aplicación del estresor. El estresor utilizado en este trabajo es el que causó los mayores efectos en el aprendizaje y la memoria, en comparación con los estudios citados. Los datos obtenidos en este trabajo concuerdan con los publicados por nuestro grupo de investigación. El estrés por inmersión en agua fría del día 15 al día 21 de gestación causa incremento en el tiempo de llegada a la plataforma en los animales estresados y disminución en el tiempo de permanencia en el cuadrante y el número de cruces en el lugar donde previamente se encontraba la plataforma (70). Resultados similares han sido reportados en otros estudios (96), lo que indica que el estresor elegido en el presente trabajo es más intenso y activa al eje HHA, aumentando la concentración de corticosterona en el feto. En consecuencia, la interacción de la corticosterona con las estructuras cerebrales del feto afecta los procesos de memoria y aprendizaje en la etapa adulta.

La deficiencia en el proceso de aprendizaje observado en las ratas adultas estresadas prenatalmente podría explicarse por una menor plasticidad en el hipocampo de estos animales. Se sabe que el estrés por inmovilización en ratones

durante la gestación del día 8 al día 19 provoca disminución en la potenciación de largo plazo en el área CA1 del hipocampo y que dicha alteración aparece en la etapa prenatal y se mantiene hasta la edad adulta (100). Debido a que el hipocampo es una estructura cerebral implicada en el procesamiento de la información espacial es uno de los blancos más susceptibles a los corticosteroides durante el desarrollo fetal debido a que presenta una gran cantidad de receptores para GC (9). Los resultados de otros reportes confirman que el estrés prenatal es capaz de deteriorar la capacidad de aprendizaje y la consolidación de la memoria en la etapa adulta (68); además, nuestros resultados sugieren que existen deficiencias en el almacenamiento de la información y su posterior recuerdo en la prueba de laberinto acuático de Morris.

Nuestros resultados confirman también que el estrés prenatal genera problemas al recordar la posición de la plataforma, lo que implica deficiencias en el almacenamiento de la información y su posterior recuperación. Lo anterior indica la incapacidad de los animales para utilizar las pistas espaciales ubicadas alrededor de la tina y poder ubicarse correctamente en el laberinto acuático de Morris para encontrar la plataforma, como se ha reportado previamente por otros grupos de investigación (68, 96, 101).

Es importante mencionar que la intensidad del estresor es un factor crucial en la inducción del deterioro cognitivo en la edad adulta. El estrés por inmersión en agua fría causa una respuesta más intensa, en términos de activación del eje adrenal, en comparación con otros estresores como el estrés por inmovilización, los choques

eléctricos etc. (89). El estrés por inmovilización es de intensidad media y genera habituación cuando se aplica de manera continua por un determinado número de días (89, 102). Un estresor leve facilita el aprendizaje, mientras que un estresor intenso lo deteriora (103).

Se sabe que la plasticidad sináptica en el hipocampo está fuertemente correlacionada con la memoria espacial y por tanto se considera como la base celular de este tipo de memoria (104).

El ambiente en la vida temprana o gestacional puede tener un fuerte impacto en la vida postnatal del individuo y la exposición materna a altas concentraciones de corticosteroides, es un factor que provoca que el recién nacido presente problemas de bajo peso al nacer, tamaño reducido del hipocampo y que además en la etapa adulta presente déficit o deterioro cognitivo a este mecanismo se le ha llamado "programación fetal" (105, 106).

Las alteraciones en el desempeño cognitivo de los animales estresados prenatalmente no parecen deberse a cambios en el contenido y liberación de serotonina en el hipocampo dorsal, pues no se observaron cambios en este neurotransmisor. Sin embargo, el incremento observado en el contenido de serotonina durante los días de aprendizaje, indica que está relacionado con este proceso, pero no en la memoria de corto y largo plazo, pues su contenido disminuyó en los días en los que se evaluó la memoria (días 7 y 13).

Las proyecciones provenientes del núcleo de rafe originadas en el tallo cerebral que se distribuyen en todo el encéfalo de la rata donde se almacena y se recaptura la serotonina, la cual se extiende por todas las áreas del cerebro anterior y se

relacionan con el aprendizaje y la memoria (107). La actividad de las proyecciones serotoninérgicas dependen de la disponibilidad de la triptófano hidroxilasa, la monoamina oxidasa A (MAO-A), el transportador (SERT) y de los receptores para serotonina; todos ellos parecen tener relación con la memoria (77), aunque en este trabajo no se observaron cambios en la concentración de serotonina, existe evidencia que indica que los receptores serotoninérgicos, así como la liberación y recaptura de 5-HT podrían estar involucrados en el aprendizaje y la memoria (108).

Las alteraciones farmacológicas de las concentraciones de 5-HT por modificaciones de la liberación o recaptura de 5-HT ha demostrado tener influencia en la memoria espacial, en general el incremento de los niveles extracelulares de 5-HT mantienen o mejoran el desempeño en la memoria y los niveles reducidos de este neurotransmisor perjudican la memoria espacial (109). Cambios en la liberación probablemente estimulan indirectamente a los receptores postsinápticos 5-HT<sub>1A</sub>, los cuales están en áreas importantes como el hipocampo relacionadas con el aprendizaje y la memoria espacial (110). En otro reporte donde se administró paraclorofenilalanina, el cual inhibe a la triptófano hidroxilasa, generando disminución en las concentraciones de 5-HT (110), provocó déficit en la memoria, además de una disminución de receptores 5-HT<sub>1A</sub> el cual se encuentra localizado en el hipocampo (111). Los resultados de este trabajo sugieren que las deficiencias en el aprendizaje y la memoria espacial podrían explicarse por el bajo contenido de 5-HT en el hipocampo dorsal de los animales del grupo de estrés prenatal.

La exposición materna al estrés crónico por choques eléctricos en las patas, en el día 10 al día 20 de la gestación, induce regulación a la baja de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y

de su ARNm en el núcleo del Rafe de la descendencia en la edad adulta (112). El estrés por hacinamiento e inyecciones dolorosas del día 15 al día 21 de gestación es capaz de provocar disminución de serotonina y aumento de su metabolito (5-HIAA) en el hipocampo antes de la prueba de laberinto acuático de Morris (en condiciones basales) (76). El contenido de 5-HT y 5-HIAA es elevado en los días 1 y 4 de la prueba de LAM, esto se debe a que probablemente a que las menores concentraciones de serotonina se metabolizan en mayor proporción. Por el contrario, las concentraciones que se presentaron después de la prueba de LAM en los días 7 y 13 donde disminuyeron significativamente la 5-HT y el 5-HIAA; al disminuir la concentración de 5-HT también disminuye la concentración del 5-HIAA. Por lo tanto es posible que la 5-HT no participe de manera directa en la memoria de largo plazo. Existen estudios que muestran que el desempeño en el laberinto acuático de Morris depende del tipo de estresor y del área cerebral que se evalúe. El deterioro cognitivo y emocional, relacionado con el estrés crónico se asocia con la atrofia de las dendritas y espinas dendríticas en las neuronas piramidales de CA3 en hipocampo (59). En este trabajo se evaluó el hipocampo dorsal, debido a que está involucrado en los procesos de aprendizaje y memoria. El contenido de serotonina se cuantificó antes y durante los días 1 y 4 de aprendizaje y los días 7 y 13 en la memoria de corto y largo plazo en el LAM. Esto permite ver si el contenido se modifica o no durante estos procesos.

Existe una gran complejidad en los sistemas de aprendizaje y memoria pues implican la participación de diversos neurotransmisores, los cuales trabajan en conjunto con la

serotonina en estos mecanismos. Tal es el caso de la influencia del sistema serotoninérgico en el control de la actividad de las neuronas dopaminérgicas ya que es un factor fundamental en el humor y la emoción (113). Existe evidencia de que el estrés prenatal afecta la función cognitiva mediante la interrupción de la plasticidad sináptica en las sinapsis glutamatérgicas (114). El estrés prenatal disminuye el receptor NMDA en el hipocampo (115), el cual está relacionado con la potenciación a largo plazo y su disminución en esto favorece que la depresión a largo plazo aparezca. Esto podría explicar las deficiencias cognitivas observadas en los animales estresados prenatalmente. Es posible que la exposición a altos niveles de corticosterona materna durante la gestación genere disminución de la memoria de corto y largo plazo mediante alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica.

Otra acción de la 5-HT consiste en modular la excitabilidad del sistema GABAérgico. Se ha demostrado que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> inhibe la liberación de GABA en las interneuronas de la región CA1 (116). Otros efectos mediados por 5-HT sobre GABA han sido descritos por el reclutamiento de receptores en la membrana postsináptica (117), la modulación de la función del receptor promoviendo su fosforilación (118), efectos que convergen en vías de señalización como las acopladas a proteínas G, adenilato ciclasa o fosfolipasa C (119) y los efectos en distintos canales iónicos, que influyen en el potencial de membrana y la excitabilidad neuronal (120). Asimismo se ha reportado que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> pre-sinápticos reducen la liberación de glutamato de las colaterales de Schaffer en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo (121). Con lo anteriormente señalado se demuestra que la 5-HT es



capaz de modular a otros sistemas de neurotransmisión que están ligados directamente con los mecanismos de la potenciación a largo plazo como es el caso de glutamato. Por lo tanto los efectos del estrés prenatal están presentes dañando a los sistemas de neurotransmisión responsables de mecanismos cognitivos como el aprendizaje y la memoria espacial.

En este estudio se observó también que el estrés prenatal por inmersión en agua fría provocó disminución de noradrenalina en el día 13 de la prueba de laberinto acuático de Morris, en el que se evaluó la memoria de largo plazo.

Se sabe que la retención de alguna experiencia novedosa después del proceso de aprendizaje está mediado por noradrenalina, modulando la consolidación de un recuerdo mediante la activación de los receptores adrenérgicos localizados en la periferia de las fibras aferentes vagales las cuales se proyectan al núcleo del tracto solitario en el tronco cerebral y desde esta región influye a la actividad neuronal en otras regiones del cerebro incluida la amígdala e hipocampo (44).

La activación de los receptores beta-adrenérgicos que se encuentran en el hipocampo favorecen la potenciación a largo plazo (122). Esto podría sugerir que la NA está relacionada con la memoria de largo plazo, lo que es congruente con lo reportado por Croiset *et al.*, en el 2000, en relación a que altas concentraciones de noradrenalina se asocian con la consolidación de la memoria y la PLP (123).

En resumen, los datos obtenidos en este trabajo acerca del contenido de 5-HT indican que este neurotransmisor parece tener un papel importante en la adquisición del aprendizaje, pero no de la memoria de corto y largo plazo.

Sin embargo, no se modifica por la exposición al estrés prenatal y no parece estar relacionada con las alteraciones del aprendizaje y la memoria observados en los animales estresados prenatalmente.

En contraste, la noradrenalina parece estar involucrada en la memoria de largo plazo y su disminución en el día 13 indica que es responsable, al menos en parte, de las alteraciones en la memoria generadas por el estrés prenatal.

## **12. CONCLUSIONES**

El estrés prenatal causa deficiencias en el aprendizaje y la memoria espacial a corto y a largo plazo en la edad adulta de las crías y genera un aumento en la liberación basal de catecolaminas de las crías en la etapa adulta.

La deficiencia en la memoria de largo plazo (día 13) en la prueba de aprendizaje y memoria parece deberse a deficiencias en la transmisión noradrenérgica y las alteraciones del sistema serotoninérgico no parecen tener relación con el aprendizaje debido a que las concentraciones de serotonina y su metabolito no se modifican durante el aprendizaje.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. Annual review of physiology. 2005;67:259-84.
2. McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. Annals of the New York Academy of Sciences. 1998;840:33-44.
3. Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. Neuroscience and biobehavioral reviews. 2011;35(5):1291-301.
4. S R-M, Delgadillo-Sánchez, M. JK. Avances en la Biología de la Reproducción. 2012:236 p.
5. Meaney MJ, Viau V, Aitken DH, Bhatnagar S. Stress-induced occupancy and translocation of hippocampal glucocorticoid receptors. Brain research. 1988;445(1):198-203.
6. Duval F, González F, Rabia H. Neurobiología del estrés. Revista chilena de neuro-psiquiatría. 2010;48(4):307-18.
7. Nicolaidis NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. Neuroimmunomodulation. 2015;22(1-2):6-19.
8. Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. Endocrine reviews. 2007;28(7):726-41.
9. Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 1992;16(2):115-30.
10. Rojas Durán F. El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. 2011.
11. Gómez Ordóñez Silvia, María GÁÁ, L. VPE. Corticoides: 60 años después, una asignatura pendiente. Rev Cienc Salud Bogotá (Colombia). 2007;5(3):58-69.
12. Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. The Journal of physiology. 2006;572(1):31-44.
13. Reul J, Kloet Ed. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. Endocrinology. 1985;117(6):2505-11.
14. Bohus B, De Kloet E, Veldhuis H. Adrenal steroids and behavioral adaptation: relationship to brain corticoid receptors. Adrenal actions on brain: Springer; 1982. p. 107-48.
15. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis\*. Endocrine reviews. 1986;7(3):284-301.
16. Lamberts SW, Zuiderwijk J, Uitterlinden P, Blijd JJ, Bruining HA, Jong FH. Characterization of adrenal autonomy in Cushing's syndrome: a comparison between in vivo and in vitro responsiveness of the adrenal gland. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1990;70(1):192-9.
17. Melian WA, Rosado JB, Aguado RC. Plasticidad sináptica duradera (LTP): un punto de partida para entender los procesos de aprendizaje y memoria.
18. Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996;93(24):13515-22.
19. Kim JJ, Koo JW, Lee HJ, Han J-S. Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. The Journal of Neuroscience. 2005;25(6):1532-9.

20. Morgado I. Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de neurologia*. 2005;40(5):289-97.
21. Modir F, Salmani ME, Goudarzi I, Lashkarboluki T, Abrari K. Prenatal stress decreases spatial learning and memory retrieval of the adult male offspring of rats. *Physiology & behavior*. 2014;129:104-9.
22. Luine VN, Spencer RL, McEwen BS. Effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. *Brain research*. 1993;616(1):65-70.
23. Diamond DM, Park CR, Heman KL, Rose GM. Exposing rats to a predator impairs spatial working memory in the radial arm water maze. *Hippocampus*. 1999;9(5):542-52.
24. Joëls M. Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in pharmacological sciences*. 2006;27(5):244-50.
25. Diamond DM, Bennett MC, Fleshner M, Rose GM. Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus*. 1992;2(4):421-30.
26. Sünram-Lea SI, Owen L, Finnegan Y, Hu H. Dose–response investigation into glucose facilitation of memory performance and mood in healthy young adults. *Journal of Psychopharmacology*. 2011;25(8):1076-87.
27. Fillenz M, Lowry J, Boutelle M, Fray A. The role of astrocytes and noradrenaline in neuronal glucose metabolism. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1999;167(4):275-84.
28. Gibbs ME, Hutchinson DS, Summers RJ. Role of  $\beta$ -adrenoceptors in memory consolidation:  $\beta$ 3-adrenoceptors act on glucose uptake and  $\beta$ 2-adrenoceptors on glycogenolysis. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(10):2384-97.
29. Sapolsky RM. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. *The Journal of neuroscience*. 1986;6(8):2240-4.
30. Osborne DM, Pearson-Leary J, McNay EC. The neuroenergetics of stress hormones in the hippocampus and implications for memory. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9.
31. Aguado-Aguilar L. Aprendizaje y memoria. *Revista de neurologia*. 2001;32(4):373-81.
32. Shors TJ, Matzel LD. Long-term potentiation: what's learning got to do with it? *Behavioral and Brain Sciences*. 1997;20(04):597-614.
33. Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5(1):45-54.
34. Bliss TV, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*. 1973;232(2):331-56.
35. Caruso V, Lagerström MC, Olszewski PK, Fredriksson R, Schiöth HB. Synaptic changes induced by melanocortin signalling. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014;15(2):98-110.
36. Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current opinion in neurobiology*. 1994;4(3):389-99.
37. García R, Hernández E, Concha A, Pérez CA, García LI, Hernández ME, et al. El cerebelo y sus funciones. *Rev Méd Uv*. 2009;9:24-30.
38. López-Rojasa J, Almaguer-Meliánb W, Bergado-Rosadob J. La 'marca sináptica' y la huella de la memoria. *Revista de neurologia*. 2007;45(10):607-14.
39. Rimmele U, Besedovsky L, Lange T, Born J. Emotional memory can be persistently weakened by suppressing cortisol during retrieval. *Neurobiology of learning and memory*. 2015;119:102-7.
40. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002;3(6):453-62.

41. Baldi E, Bucherelli C. The inverted “u-shaped” dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. *Nonlinearity in biology, toxicology, medicine*. 2005;3(1):nonlin. 003.01. 2.
42. Gold PE, van Buskirk R. Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. *Behavioral biology*. 1978;23(4):509-20.
43. Clayton EC, Williams CL. Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behavioural brain research*. 2000;112(1):151-8.
44. McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science*. 2000;287(5451):248-51.
45. Roozendaal B, Barsegyan A, Lee S. Adrenal stress hormones, amygdala activation, and memory for emotionally arousing experiences. *Progress in brain research*. 2007;167:79-97.
46. Roozendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL. Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala  $\beta$ -adrenoceptor–cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*. 2002;15(3):553-60.
47. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clinical science (London, England: 1979)*. 1998;95(2):115-28.
48. de Catanzaro D, Macniven E. Psychogenic pregnancy disruptions in mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1992;16(1):43-53.
49. Huizink AC. Prenatal stress and its effect on infant development. 2001.
50. Benešová O, Pavlík A. Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain. *Neuropharmacology*. 1989;28(1):89-97.
51. Mulder EJ, De Medina PR, Huizink AC, Van den Bergh BR, Buitelaar JK, Visser GH. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early human development*. 2002;70(1):3-14.
52. Glynn LM, Schetter CD, Wadhwa PD, Sandman CA. Pregnancy affects appraisal of negative life events. *Journal of psychosomatic research*. 2004;56(1):47-52.
53. Sandman CA, Glynn L, Schetter CD, Wadhwa P, Garite T, Chicz-DeMet A, et al. Elevated maternal cortisol early in pregnancy predicts third trimester levels of placental corticotropin releasing hormone (CRH): priming the placental clock. *Peptides*. 2006;27(6):1457-63.
54. Sandman CA, Wadhwa P, Glynn L, Chicz-Demet A, Porto M, Garite TJ. Corticotrophin-releasing hormone and fetal responses in human pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;897:66-75.
55. Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. *Brain research reviews*. 2010;65(1):56-79.
56. Angiolini E, Fowden A, Coan P, Sandovici I, Smith P, Dean W, et al. Regulation of placental efficiency for nutrient transport by imprinted genes. *Placenta*. 2006;27 Suppl A:S98-102.
57. Mairesse J, Lesage J, Breton C, Breant B, Hahn T, Darnaudery M, et al. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2007;292(6):E1526-33.
58. McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. 1968.
59. Hajszan T, Dow A, Warner-Schmidt JL, Szigeti-Buck K, Sallam NL, Parducz A, et al. Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biological psychiatry*. 2009;65(5):392-400.

60. Nazeri M, Shabani M, Ghotbi Ravandi S, Aghaei I, Nozari M, Mazhari S. Psychological or physical prenatal stress differentially affects cognition behaviors. *Physiology & behavior*. 2015;142:155-60.
61. Kapoor A, Kostaki A, Janus C, Matthews SG. The effects of prenatal stress on learning in adult offspring is dependent on the timing of the stressor. *Behavioural Brain Research*. 2009;197:144-9.
62. Markham JA, Taylor AR, Taylor SB, Bell DB, Koenig JI. Characterization of the cognitive impairments induced by prenatal exposure to stress in the rat. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2010;4.
63. Tanti A, Belzung C. Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific? *Neuroscience*. 2013;252:234-52.
64. Brunson KL, Chen Y, Avishai-Eliner S, Baram TZ. Stress and the developing hippocampus: a double-edged sword? *Molecular neurobiology*. 2003;27(2):121-36.
65. Lowry P, editor *Corticotropin-releasing factor and its binding protein in human plasma*. Ciba Found Symp; 1993.
66. King BR, Smith R, Nicholson RC. The regulation of human corticotrophin-releasing hormone gene expression in the placenta. *Peptides*. 2001;22(11):1941-7.
67. Sandman CA, Glynn LM. Corticotropin-releasing hormone programs the fetal and maternal brain. 2009.
68. Yang J, Han H, Cao J, Li L, Xu L. Prenatal stress modifies hippocampal synaptic plasticity and spatial learning in young rat offspring. *Hippocampus*. 2006;16(5):431-6.
69. Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena A, Cinque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2003;27(1):119-27.
70. Guerrero Aguilera María de los Angeles ROMdC, Portillo Martínez Wendy, Retana-Márquez Socorro, . Tactile stimulation effects on hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory in prenatally stressed rats. *Brain research bulletin*. 2016;124:1-11.
71. Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 1998;16(3):209-16.
72. Lim EP, Tan CH, Jay TM, Dawe GS. Locus coeruleus stimulation and noradrenergic modulation of hippocampo-prefrontal cortex long-term potentiation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2010;13(9):1219-31.
73. Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychological bulletin*. 2004;130(1):115-42.
74. Thompson WR. Influence of prenatal maternal anxiety on emotionality in young rats. *Science*. 1957;125(3250):698-9.
75. Takahashi LK, Haglin C, Kalin NH. Prenatal stress potentiates stress-induced behavior and reduces the propensity to play in juvenile rats. *Physiology & behavior*. 1992;51(2):319-23.
76. Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 1998;16(3-4):209-16.
77. Meneses A, Liy-Salmeron G. Serotonin and emotion, learning and memory. 2012.
78. Wirth A, Holst K, Ponimaskin E. How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons. *Progress in neurobiology*. 2016.

79. Van den Hove DL, Lauder JM, Scheepens A, Prickaerts J, Blanco CE, Steinbusch HW. Prenatal stress in the rat alters 5-HT1A receptor binding in the ventral hippocampus. *Brain research*. 2006;1090(1):29-34.
80. Whitaker-Azmitia PM. Role of the neurotrophic properties of serotonin in the delay of brain maturation induced by cocaine. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;846:158-64.
81. García-Osta A, Frechilla D, Del Rio J. Effect of p-chloroamphetamine on 5-HT1A and 5-HT7 serotonin receptor expression in rat brain. *Journal of neurochemistry*. 2000;74(5):1790-7.
82. García GP, Salmerón GL, Meneses A. Receptores Serotoninérgicos y Memoria. *Revista mexicana de análisis de la conducta*. 2006;32:241-69.
83. Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain, behavior, and immunity*. 2005;19(4):296-308.
84. de Weerth C, van Hees Y, Buitelaar JK. Prenatal maternal cortisol levels and infant behavior during the first 5 months. *Early human development*. 2003;74(2):139-51.
85. Peters DA. Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1982;17(4):721-5.
86. J BW, E. CJ, K. FM. Neurochemical systems involved in learning and memory. *Neurobiology of Mental Illness*. 2004:813-20.
87. Gibbs ME, Hutchinson DS, Summers RJ. Noradrenaline release in the locus coeruleus modulates memory formation and consolidation; roles for alpha- and beta-adrenergic receptors. *Neuroscience*. 2010;170(4):1209-22.
88. Retana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Vazquez-Palacios G, Martinez-Garcia R. Naltrexone effects on male sexual behavior, corticosterone, and testosterone in stressed male rats. *Physiology & behavior*. 2009;96(2):333-42.
89. Retana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Vazquez-Palacios G, Dominguez-Salazar E, Martinez-Garcia R, Velazquez-Moctezuma J. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2003;28(2):207-27.
90. Kapoor A, Kostaki A, Janus C, Matthews SG. The effects of prenatal stress on learning in adult offspring is dependent on the timing of the stressor. *Behavioural Brain Research*. 2009;197(1):144-9.
91. Paxinos G, Watson, C., . *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Amsterdam. 2007; sixth ed.
92. Blanco-Lezcano L, Rocha-Arrieta LL, Alvarez-Gonzalez L, Martinez-Marti L, Pavon-Fuentes N, Gonzalez-Fraguela ME, et al. [The effects of lesions in the compact part of the substantia nigra on glutamate and GABA release in the pedunculopontine nucleus]. *Revista de neurologia*. 2005;40(1):23-9.
93. Paxinos G. *Atlas of the Developing Mouse Brain: At E17. 5, PO, and*: Academic press; 2007.
94. Ham AW, Cormack DH, Treviño HV, Blengio JR, Ramírez LC. *Tratado de histología: Interamericana*; 1975.
95. Retana-Marquez S, Viguera-Villasenor RM, Juarez-Rojas L, Aragon-Martinez A, Torres GR. Sexual behavior attenuates the effects of chronic stress in body weight, testes, sexual accessory glands, and plasma testosterone in male rats. *Hormones and behavior*. 2014;66(5):766-78.
96. Akatsu S, Ishikawa C, Takemura K, Ohtani A, Shiga T. Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice. *Neuroscience research*. 2015;101:15-23.

97. Szuran TF, Pliška V, Pokorný J, Welzl H. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiology & behavior*. 2000;71(3):353-62.
98. Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous D. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(20):11032-7.
99. Aleksandrov A, Polyakova O, Batuev A. The effects of prenatal stress on learning in rats in a Morris maze. *Neuroscience and behavioral physiology*. 2001;31(1):71-4.
100. Son GH, Geum D, Chung S, Kim EJ, Jo J-H, Kim C-M, et al. Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience*. 2006;26(12):3309-18.
101. Amaral C, Antonio B, Oliveira MGM, Hamani C, Guinsburg R, Covolan L. Early postnatal nociceptive stimulation results in deficits of spatial memory in male rats. *Neurobiology of learning and memory*. 2015;125:120-5.
102. Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiology & behavior*. 1988;43(1):47-55.
103. Salehi B, Cordero MI, Sandi C. Learning under stress: the inverted-U-shape function revisited. *Learning & memory*. 2010;17(10):522-30.
104. Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 1998;20(3):445-68.
105. Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *Journal of neuroendocrinology*. 2001;13(2):113-28.
106. Cottrell EC, Seckl J. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2009;3:19.
107. Meneses A. 5-HT system and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1999;23(8):1111-25.
108. Meneses A, Perez-Garcia G. 5-HT 1A receptors and memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2007;31(5):705-27.
109. Kuypers KP, Ramaekers JG. Transient memory impairment after acute dose of 75mg 3,4-Methylene-dioxymethamphetamine. *Journal of Psychopharmacology*. 2005;19(6):633-9.
110. du Jardin KG, Jensen JB, Sanchez C, Pehrson AL. Vortioxetine dose-dependently reverses 5-HT depletion-induced deficits in spatial working and object recognition memory: a potential role for 5-HT 1A receptor agonism and 5-HT 3 receptor antagonism. *European Neuropsychopharmacology*. 2014;24(1):160-71.
111. Glikmann-Johnston Y, Saling MM, Reutens DC, Stout JC. Hippocampal 5-HT1A Receptor and Spatial Learning and Memory. *Frontiers in pharmacology*. 2015;6.
112. Lakehayli S, Said N, El Khachibi M, El Ouahli M, Nadifi S, Hakkou F, et al. Prenatal stress alters diazepam withdrawal syndrome and 5HT1A receptor expression in the raphe nuclei of adult rats. *Neuroscience*. 2016.
113. De Deurwaerdère P, Di Giovanni G. Serotonergic modulation of the activity of mesencephalic dopaminergic systems: Therapeutic implications. *Progress in neurobiology*. 2016.
114. Zhao D, Liu D, Chen X, Wang K, Zhang A, Kang J, et al. Prenatal stress disturbs hippocampal KIF17 and NR2B in spatial cognition in male offspring. *Journal of neuroscience research*. 2013;91(4):535-44.
115. Jia N, Yang K, Sun Q, Cai Q, Li H, Cheng D, et al. Prenatal stress causes dendritic atrophy of pyramidal neurons in hippocampal CA3 region by glutamate in offspring rats. *Developmental neurobiology*. 2010;70(2):114-25.



116. Freund T. GABAergic septal and serotonergic median raphe afferents preferentially innervate inhibitory interneurons in the hippocampus and dentate gyrus. *Epilepsy research Supplement*. 1991;7:79-91.
117. Li P, Kerchner GA, Sala C, Wei F, Huettner JE, Sheng M, et al. AMPA receptor–PDZ interactions in facilitation of spinal sensory synapses. *Nature neuroscience*. 1999;2(11):972-7.
118. Feng J, Cai X, Zhao J, Yan Z. Serotonin receptors modulate GABAA receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(17):6502-11.
119. Okuhara DY, Beck SG. 5-HT1A receptor linked to inward-rectifying potassium current in hippocampal CA3 pyramidal cells. *J Neurophysiol*. 1994;71(6):2161-7.
120. Premkumar LS, Gage PW. Potassium channels activated by GABAB agonists and serotonin in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 1994;71(6):2570-5.
121. Schmitz D, Empson R, Heinemann U. Serotonin and 8-OH-DPAT reduce excitatory transmission in rat hippocampal area CA1 via reduction in presumed presynaptic Ca<sup>2+</sup> entry. *Brain research*. 1995;701(1):249-54.
122. Sara SJ. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature reviews neuroscience*. 2009;10(3):211-23.
123. Croiset G, Nijssen MJ, Kamphuis PJ. Role of corticotropin-releasing factor, vasopressin and the autonomic nervous system in learning and memory. *European journal of pharmacology*. 2000;405(1):225-34.

## 14. APÉNDICE I. EVALUACIÓN DEL SITIO DEL IMPLANTE

### 14.1 HISTOLOGÍA

En las imágenes siguientes se muestran los cortes coronales de cerebro de rata teñidos con Violeta de Cresilo donde se observa la trayectoria de la cánula que se implanto y como se puede apreciar en el sitio de implante la cánula se encuentra en hipocampo dorsal la cual es nuestra estructura de interés (Figura 21 y 22).

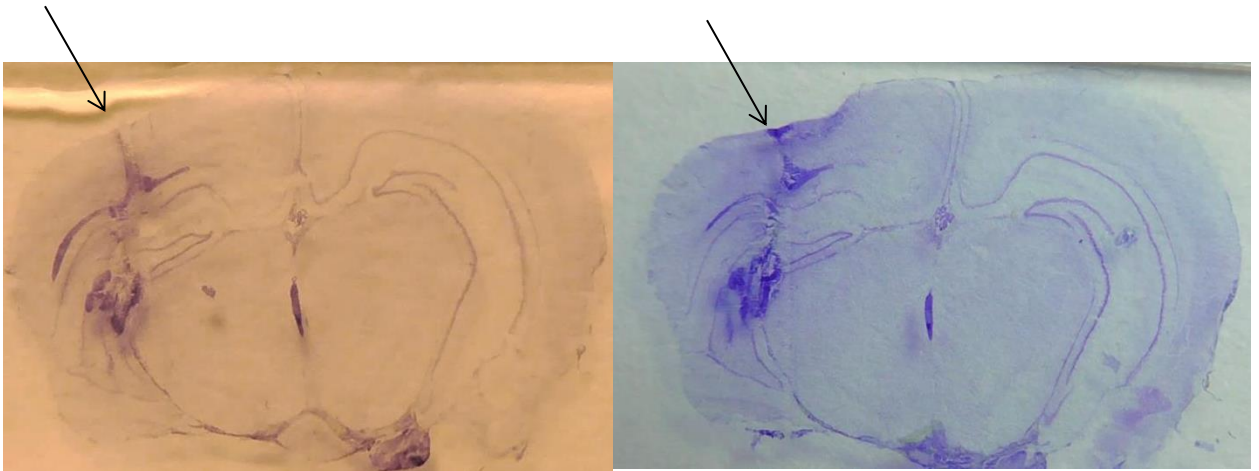


Figura 21.- Se observan dos cortes coronales de cerebro de rata donde se muestran las trayectorias que siguieron las cánulas implantadas dirigidas a hipocampo dorsal, con la flecha negra se señala la lesión.

## 14.2 SITIOS DE IMPLANTE

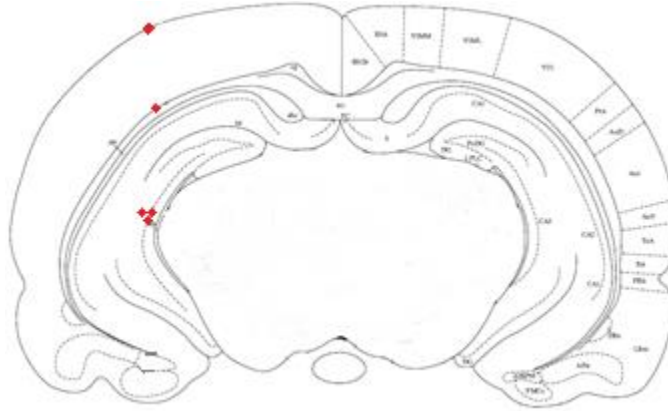


Figura 22.- Corte coronal de cerebro de rata donde se muestra el sitio de implante ideal con los puntos rojos representan la trayectoria del electrodo que se implanto y a donde llevo.

Tomado de Paxinos y Watson, 2007.