



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**SEROTONINA Y NORADRENALINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS
ESTRESADAS PRENATALMENTE Y SU RELACIÓN CON EL APRENDIZAJE Y
LA MEMORIA ESPACIAL. PARTICIPACIÓN DE LA CORTICOSTERONA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

M. en B.E. Diana Méndez Guerrero
Matrícula: 2143800928

Directora:

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Asesores:

Dr. Moisés Rubio Osornio
Dra. Sandra Adela Orozco Suárez

Iztapalapa, Ciudad de México, junio 2021

Declaración de originalidad

La que suscribe Diana Méndez Guerrero, alumna del posgrado Doctorado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "SEROTONINA Y NORADRENALINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y SU RELACIÓN CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA ESPACIAL. PARTICIPACIÓN DE LA CORTICOSTERONA.",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 11 de junio del 2021.

Atentamente



Diana Méndez Guerrero

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado. Eliminar este párrafo en la versión que incluyan en la tesis.

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 11 de junio de 2021

Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, DCBS
P r e s e n t e

La que suscribe (Diana Méndez Guerrero) alumna con número de matrícula 2143800928, del posgrado Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "SEROTONINA Y NORADRENALINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y SU RELACIÓN CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA ESPACIAL. PARTICIPACIÓN DE LA CORTICOSTERONA" a desarrollar en la UAM-I, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Diana Méndez Guerrero

Comité Tutorial:

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

(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.

Dr. Moisés Rubio Osornio

(Asesor Externo)

Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"
ruomon@gmail.com

Dra. Sandra Orozco Suárez

(Asesora Externa)

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas.
Hospital de Especialidades.
C.M.N. Siglo XXI
sorozco5@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, así como en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas en el Hospital de Especialidades C.M.N. Siglo XXI y en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en el Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, bajo la Dirección de la Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez y la asesoría del Dr. Moisés Rubio Osornio y la Dra. Sandra Orozco Suárez.

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Para la realización de los estudios del Doctorado en Biología Experimental la alumna Diana Méndez Guerrero recibió el apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante la beca con No. de Becario: 465534/ CVU: 620749.

Miembros de 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:

“Serotonina y noradrenalina en el hipocampo dorsal de ratas estresadas prenatalmente y su relación con el aprendizaje y la memoria espacial. Participación de la corticosterona.”

Presentó

M. en B.E. Diana Méndez Guerrero

El día 11 de junio de 2021



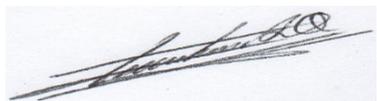
PRESIDENTA

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

Sandra a Orozco Suarez

VOCAL

Dra. Sandra Orozco Suárez
Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Neurológicas.
Hospital de Especialidades.
C.M.N. Siglo XXI
Ciudad de México

“No es la especie más fuerte la que sobrevive, ni la más inteligente, si no la que responde mejor al cambio.”

Charles Darwin.

AGRADECIMIENTOS

La conclusión de esta tesis ha requerido de mí esfuerzo, tiempo y dedicación. El proceso no ha sido sencillo sin embargo agradezco porque al fin se ha culminado esta etapa de mí vida con éxito. Considero importante que el trabajo debe ser reconocido como una labor conjunta realizada por las personas que se mencionan más adelante.

En primera instancia agradezco a mis directores y asesores que han sido mis guías profesionales y a quien les debo el conocimiento obtenido en este trabajo, en especial a la Dra. María del Socorro Retana Márquez una persona de gran experiencia profesional, le agradezco por sus ganas de trasmitirme su conocimiento, dedicación, objetividad profesional, contribución y sobre todo por la paciencia durante estos años para la conclusión de esta tesis.

Al Dr. Moisés Rubio Osornio por su apoyo, comentarios y ayuda para la realización de las técnicas y por compartir sus conocimientos, pero también por esa energía y buenas vibras no sólo en el ámbito académico, si no, en el personal gracias por ser una persona tan cálida y por sus palabras.

A la Dra. Sandra Orozco Suárez por su apoyo, tiempo y ayuda en el procesamiento de las muestras y realización de la técnica de Western Blot así como los comentarios para el proyecto.

A la Dra. María del Carmen Rubio Osornio por su excelente calidad humana y su disposición para siempre apoyarme en todo momento tanto en la parte experimental

del proyecto, así como, por su apoyo incondicional, gracias por esas lindas palabras de aliento y animarme a seguir adelante. Recuerdo cada ocasión que la busqué, usted siempre me brindó esa disponibilidad para compartir sus conocimientos conmigo y darme ese valor para continuar.

A Felipe de Jesús Jiménez Vásquez por estar ahí siempre conmigo acompañándome en los momentos más difíciles de desvelo, trabajos interminables, por alentarme a seguir adelante y por aquellos momentos compartidos en el laboratorio de trabajo y risas. Te quiero mucho.

A mis compañeras Ángeles, Lizbeth y Fahiel por compartir lindos momentos en el laboratorio.

DEDICATORIA

Gracias a la vida y a mi familia por el amor y bondad con la que me permiten sonreír ante todos mis logros personales y profesionales que son el resultado de su ayuda. Me he dado cuenta que cuando caigo nuevamente me ponen a prueba para subir un escalón más, aprender de mis errores y entiendo que se presentan frente a mí para que mejore cada día más como ser humano, y crezca tanto en la parte profesional como emocional y personal.

Esté trabajo ha sido un gran reto y bendición en todo sentido, agradezco y dedico esta tesis a mi madre Andrea Guerrero Zermeño y hermanos Petter e Iván que estuvieron ahí cuando los necesitaba en todos los aspectos de la vida, y no terminaré mis ganas por decirles gracias a ustedes por formar parte de esta meta cumplida.

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 prenatal ocasiona déficit en el aprendizaje y en la memoria espacial en cualquier etapa de la vida postnatal por modificación de la función hipocampal. En esta estructura existen terminales axónicas de neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas, las cuales participan en los procesos cognitivos. A pesar de que se ha estudiado la participación de ambos sistemas en los procesos cognitivos, actualmente se desconoce si el estrés prenatal altera la liberación de serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA) en el hipocampo dorsal durante el desempeño cognoscitivo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en las concentraciones de 5-HT y NA en el hipocampo dorsal durante el aprendizaje y la memoria espacial en ratas estresadas prenatalmente. Para ello, se utilizaron ratas macho de 3 meses de edad, control y estresadas prenatalmente, que se sometieron a pruebas conductuales de aprendizaje y memoria espacial utilizando el laberinto acuático de Morris (LAM) para determinar su desempeño. Posteriormente se extrajo el hipocampo dorsal para cuantificar el contenido de 5-HT y NA, así como muestras de sangre del tronco para evaluar los niveles de corticosterona. En otros machos se realizaron cirugías estereotáxicas para realizar microdiálisis y evaluar la concentración extracelular de 5-HT y NA en el hipocampo dorsal, tanto basal como después de las pruebas cognitivas. Los animales estresados prenatalmente tuvieron latencias de llegada mayores en la prueba de laberinto acuático de Morris durante los días de entrenamiento; así como menor permanencia en el cuadrante y menor número de cruces que los animales control en el día de la prueba de memoria. El contenido de 5-HT disminuyó durante las

tareas de aprendizaje y memoria en ambos grupos, pero el contenido de NA fue menor en el grupo de estrés prenatal a lo largo de las pruebas. La liberación de 5-HT y NA en el hipocampo dorsal fue significativamente menor en los animales estresados prenatalmente durante las pruebas conductuales. El contenido basal del transportador de 5-HT fue mayor en los animales con estrés prenatal, pero no hubo cambios a lo largo de las pruebas conductuales. La respuesta del eje adrenal fue mayor en los animales estresados prenatalmente que en los controles. En conjunto, los resultados de este trabajo muestran que el deterioro cognitivo ocasionado por el estrés prenatal, está relacionado con la disminución en la liberación de 5-HT y NA, así como con los elevados niveles de corticosterona. El transportador de 5-HT no parece tener participación en las alteraciones causadas por el estrés prenatal.

ABSTRACT

Prenatal stress causes spatial learning and memory deficits at any stage of postnatal life by modifying hippocampal function. Serotonergic and noradrenergic axon terminals, involved in cognitive processes, are present in the hippocampus. Despite studies about the participation of both neurochemical systems in cognitive processes, it is currently unknown whether prenatal stress affects the release of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) in the dorsal hippocampus during cognitive performance. Therefore, the aim of this work was to evaluate 5-HT and NA changes in the dorsal hippocampus during spatial learning and memory in prenatally stressed rats. Spatial learning and memory tests were performed using the Morris Water Maze (MWM) in 3-month-old, control and prenatally stressed males. Dorsal hippocampus was dissected in basal conditions, and after learning and memory to quantify 5-HT and NA content. Trunk blood samples were also obtained for corticosterone evaluation. Stereotaxic surgeries were performed in other males to perform microdialysis and evaluate the extracellular concentration of 5-HT and NA in the dorsal hippocampus, both at baseline and after behavioral tests. In the Morris water maze higher arrival latencies were observed in prenatally stressed animals along the training days, as well as a shorter time and fewer crosses in the quadrant compared with control animals during the memory trial. 5-HT content decreased during learning and memory tasks in both groups, but NA content was lower in the prenatal stress group during behavioral tests. 5-HT and NA release in dorsal hippocampus was significantly lower in prenatally stressed animals during behavioral tests. Serotonin transporter basal content was

higher in prenatally stressed animals, but no changes were observed during behavioral tests. The adrenal axis response was higher in prenatally stressed animals than in controls. Taking together, the results of this work show that cognitive impairment caused by prenatal stress is related to decreased 5-HT and NA release, as well as to the high levels of corticosterone. Serotonin transporter seems not to be involved in learning and memory disruption caused by prenatal stress.

ABREVIATURAS

ACTH.....	Hormona adenocorticotropa/adrenocorticotropina
ARNm.....	Ácido ribonucleico mensajero
AVP.....	Arginina vasopresina
CA.....	Cuerno de Amón
CRH.....	Hormona liberadora de corticotropina
EP.....	Estrés prenatal
GC.....	Glucocorticoides
GR.....	Receptores para glucocorticoides
GD.....	Giro dentado
GLUT.....	Transportador de glucosa
HHA.....	Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal
HPLC-ED.....	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detector electroquímico
HPLC-UV.....	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detector ultra violeta
LAM.....	Laberinto Acuático de Morris
LC.....	Locus Coeruleus
LC-NA/SNS.....	Locus Coeruleus-noradrenalina-sistema nervioso simpático (SNS)
LTP.....	Potenciación de largo plazo
MR.....	Receptores para mineralocorticoides
NA.....	Noradrenalina
PVN.....	Núcleo paraventricular

POMC.....	Proopiomelanocortina
pCRH.....	Hormona liberadora de corticotropina placentaria
SNC.....	Sistema Nervioso Central
SERT.....	Transportador de serotonina
5-HT.....	Serotonina
5-HIAA.....	Ácido 5-hidroxiindolacético
11-βHSD2	11-β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2

ÍNDICE

MIEMBROS DE JURADO	VII
AGRADECIMIENTOS	IX
DEDICATORIA	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIV
ABREVIATURAS	XVI
INTRODUCCIÓN	- 1 -
SISTEMA Y RESPUESTA DE ESTRÉS.....	- 1 -
EJE HIPOTÁLAMO - HIPÓFISIS - ADRENAL	- 3 -
ESTRÉS DURANTE LA GESTACIÓN.....	- 8 -
GLUCOCORTICOIDES EN LA DESCENDENCIA ESTRESADA PRENATALMENTE	- 10 -
ALTERACIÓN DEL EJE ADRENAL EN ANIMALES ESTRESADOS PRENATALMENTE	- 11 -
PROGRAMACIÓN DEL CEREBRO FETAL	- 11 -
EMBRIOGÉNESIS DEL HIPOCAMPO	- 13 -
NEUROBIOLOGÍA DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	- 14 -
APRENDIZAJE Y MEMORIA	- 14 -
EL HIPOCAMPO Y SU PAPEL EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	- 15 -
ANTECEDENTES	- 21 -
EFECTOS DEL ESTRÉS MATERNO EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA	- 21 -
NEUROQUÍMICA DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA EN ANIMALES ESTRESADOS PRENATALMENTE.....	- 22 -
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 27 -
JUSTIFICACIÓN	- 27 -
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	- 28 -
HIPÓTESIS	- 28 -
OBJETIVO GENERAL	- 29 -
OBJETIVOS PARTICULARES	- 29 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 30 -
MODELO BIOLÓGICO	- 30 -
DISEÑO EXPERIMENTAL	- 30 -
EXPOSICIÓN AL ESTRESOR	- 31 -
PRUEBAS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA	- 32 -
CONTENIDO TISULAR DE NA, 5-HT Y 5-HIAA EN HIPOCAMPO	- 33 -
CIRUGÍAS ESTEREOTÁXICAS	- 34 -
MICRODIÁLISIS	- 36 -
CONTENIDO DE SERT EN EL HIPOCAMPO DORSAL	- 39 -
CUANTIFICACION DE CORTICOSTERONA	- 40 -
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 40 -
RESULTADOS	- 41 -
GANANCIA DE PESO CORPORAL EN LAS HEMBRAS GESTANTES.	- 41 -

EFFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA ESPACIAL.....	- 43 -
CONTENIDO TISULAR DE 5-HT Y 5HIAA EN EL HIPOCAMPO DORSAL.....	- 46 -
LIBERACIÓN DE 5-HT Y 5-HIAA EN EL HIPOCAMPO DORSAL	- 47 -
CONTENIDO DE SERT EN EL HIPOCAMPO DORSAL	- 50 -
CONTENIDO TISULAR DE NA EN EL HIPOCAMPO DORSAL.....	- 51 -
LIBERACIÓN DE NA EN EL HIPOCAMPO DORSAL	- 52 -
CONCENTRACIONES SÉRICAS DE CORTICOSTERONA	- 53 -
DISCUSIÓN	- 55 -
REFERENCIAS.....	- 65 -
ARTICULO CIENTÍFICO	- 84 -
ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA.....	- 95 -

INTRODUCCIÓN

El estrés es una reacción fisiológica del organismo para hacer frente a las demandas del medio ambiente o a situaciones adversas durante un periodo de tiempo indeterminado y es definido como la respuesta del organismo a situaciones que son impredecibles e incontrolables y que pueden llegar a exceder su capacidad reguladora (Charmandari et al., 2005; Koolhaas et al., 2011).

Sistema y respuesta de estrés

La respuesta de estrés se lleva a cabo a través de mecanismos neuroendocrinos que pueden modificar la conducta, la reproducción e incluso los mecanismos neuroquímicos relacionados con la memoria y el aprendizaje, entre otros. Esta respuesta es dirigida por estructuras del sistema nervioso central (SNC) y por glándulas periféricas. Los dos componentes principales del sistema de estrés son el sistema Locus Coeruleus (LC)- Noradrenalina (NA)-sistema nervioso simpático (SNS)-médula adrenal (LC-NA/SNS) y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) (Charmandari et al., 2005; Meaney et al., 1998). La respuesta de estrés es indispensable y crucial para la supervivencia de los individuos; sin embargo, los eventos desfavorables, también conocidos como estresores, los cuales alteran la homeostasis (Koolhaas et al., 2011), pueden comprometer, a la larga, la salud de los organismos.

La respuesta adaptativa de estrés depende de la calidad de los estímulos estresantes, que pueden ser físicos, tales como cambios en el medio ambiente o bien internos, como la anoxia, la hipoglucemia, los cambios en la temperatura corporal, el ejercicio o las lesiones; pueden ser psicológicos, los cuales afectan la emoción y causan ansiedad o frustración y son los activadores más potentes de eje HHA; también pueden ser mixtos, con componentes físicos y emocionales. Otros componentes importantes de los estresores son la intensidad y la duración, que puede ser de segundos hasta unas cuantas horas (agudo) o de varios días, semanas e incluso meses (crónico) (Johnson et al., 1992).

Durante la respuesta de estrés agudo se activa el eje LC-NA/SNS, el cual, a través del SNS que libera adrenalina y noradrenalina, provoca la movilización de las reservas energéticas de glucosa del hígado, incrementa las frecuencias cardíaca y respiratoria, además de aumentar la presión sanguínea y favorecer el flujo sanguíneo hacia el cerebro y el músculo esquelético (Peckett et al., 2011) (Figura 1). De esta forma, los efectos de las hormonas del estrés favorecen el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Vegiopoulos et al., 2007).

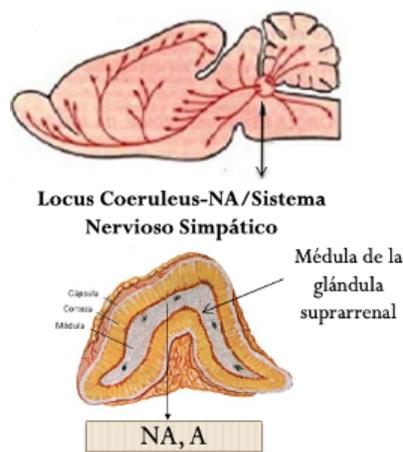


Figura 1. Componente del sistema de estrés. La respuesta de estrés es dirigida a través del sistema Locus Coeruleus (LC), noradrenalina (NA), sistema nervioso simpático (SNS), médula adrenal, el cual se activa durante el estrés agudo. Modificado de (Charmandari et al., 2005).

Eje hipotálamo - hipófisis - adrenal

El principal regulador hipotalámico del eje HHA es la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual estimula la síntesis y secreción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en los corticotropos de la adenohipófisis (Charmandari et al., 2005; Chrousos, 2009). La secreción de ACTH es regulada tanto por la CRH como por la arginina vasopresina (AVP). Durante el estrés crónico, se incrementan la amplitud y la sincronización de los pulsos de CRH y AVP desde el núcleo paraventricular (PVN) hacia el sistema porta hipofisiario, a través del cual llegan a los corticotropos hipofisarios. Estas células sintetizan la prohormona pro-opiomelanocortina (POMC), la cual se escinde para dar lugar a la ACTH y a una β -lipoproteína, uno de sus fragmentos es la β -endorfina, mismas que son liberadas hacia la vena hipofisiaria y a la circulación sistémica (Feldman et al., 1997). La POMC es sintetizada, además de la hipófisis, en el Núcleo Arcuato del hipotálamo y en diferentes zonas del cerebro. Las neuronas que sintetizan CRH/AVP inervan y son inervadas a su vez por las neuronas que sintetizan POMC en el núcleo arcuato (Nikolarakis et al., 1986). Una vez liberada, la ACTH es transportada por la circulación hasta la glándula adrenal, donde estimula la síntesis y secreción de GC y de andrógenos adrenales (Andreis et al., 1992). Por lo tanto, la respuesta de estrés se asocia con el incremento en la concentración plasmática de GC (Charmandari et al., 2005; Chrousos, 2009).

Estas hormonas son los efectores finales del eje HHA y ejercen sus efectos en sus órganos blanco en el hígado tienen función de estimular la gluconeogénesis, incrementando los niveles de glucosa, la glucogenólisis y en el tejido adiposo la lipólisis, entre otros (Sánchez et al., 2000; Sapolsky et al., 2000). Los GC adrenales son importantes en la regulación de la actividad del eje HHA, así como en la terminación de la respuesta de estrés, actuando en el hipocampo, además del hipotálamo y la hipófisis. La retroalimentación negativa que los GC ejercen en la secreción de CRH y ACTH permite limitar la duración de la exposición del organismo a los glucocorticoides, minimizando así sus efectos catabólicos, lipolíticos, anti reproductivos e inmunosupresores (Retana-Márquez et al., 2012).

En el cerebro, los corticosteroides se unen a dos tipos de receptores: los receptores para mineralocorticoides (MR) y los receptores para glucocorticoides (GR) (Herman et al., 1989; Reul y Kloet 1985). Los MR se expresan principalmente en el hipocampo, en la amígdala y en la corteza prefrontal. Los GR se expresan en todo el cerebro, pero principalmente en el núcleo PVN del hipotálamo y en el hipocampo (Retana-Márquez et al., 2012; Reul y Kloet 1985). Los MR tienen una alta afinidad por los GC y se activan con bajas concentraciones de éstos, en ausencia de estrés. Los GR en cambio, tienen menor afinidad por los GC y se activan durante el estrés o durante los picos circadianos o ultradianos de los glucocorticoides (Rosenfeld et al., 1993). La unión de los GC con los GR en las neuronas del núcleo PVN y en los corticotropos hipofisarios, ejerce control por retroalimentación negativa sobre la secreción de CRH y ACTH, respectivamente, durante los picos circadianos o ultradianos o bien durante la

respuesta de estrés, mediante mecanismos genómicos (Groeneweg et al., 2012; de Kloet et al., 1998; Habib et al., 2001), (Figura 2).

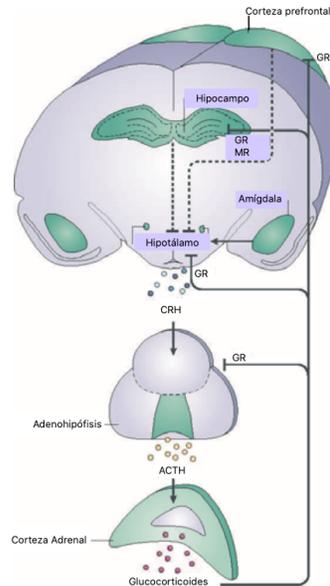


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y su regulación. El núcleo paraventricular del hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH) hacia el sistema porta-hipofisiario, a través del cual llega a los corticotropos hipofisarios, donde estimula la liberación de corticotropina (ACTH) hacia la vena hipofisiaria. La ACTH estimula en la corteza adrenal la síntesis y secreción de glucocorticoides. Los glucocorticoides circulantes se unen a los receptores para GR y MR en el hipocampo, el hipotálamo y la adenohipófisis para regular al eje mediante asas de retroalimentación negativa (Holgate y Bartlett, 2015).

Ambos tipos de receptores para GC están presentes tanto en el citosol como en la membrana de las neuronas que responden a estos esteroides (Groeneweg et al., 2012). Los GC producen sus efectos en sus células blanco mediante mecanismos genómicos, a través de receptores membranales, así como mecanismos no genómicos. Los GC se movilizan al interior de la célula y en el citoplasma se unen a su receptor específico que está unido a proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90. El complejo receptor-glucocorticoide sufre un cambio conformacional, disociándose las proteínas chaperonas; el complejo GC-receptor se dimeriza y el receptor es fosforilado,

esto permite que el complejo receptor-glucocorticoide se transloque al núcleo. En el núcleo, los dímeros se unen a las secuencias específicas de bases denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Gray et al., 2017). De esta manera se unen con el promotor e induce la síntesis del ARNm, el cual es madurado y posteriormente transportado al citoplasma donde se lleva a cabo la transcripción de las secuencias de sus nucleótidos, el ARNm fuera del núcleo llevará a cabo el proceso de traducción de secuencias de aminoácidos (Durán, 2011; Gómez Ordóñez et al., 2007) (Figura 3).

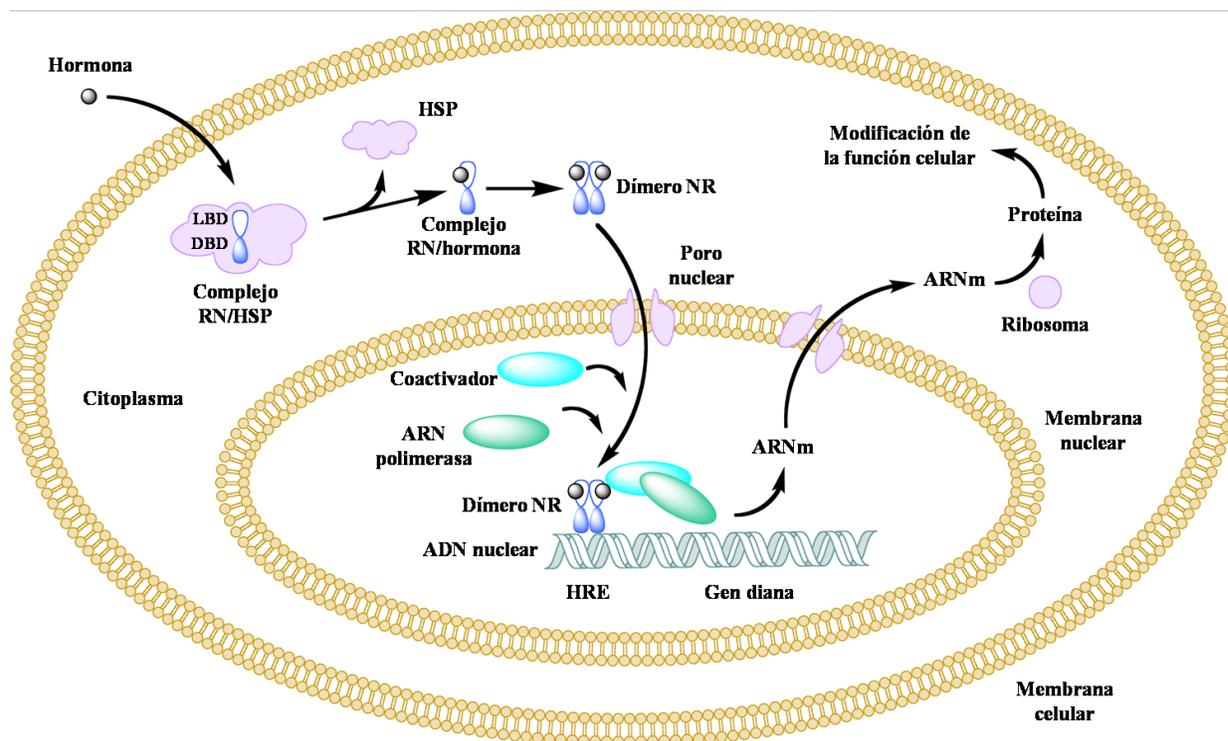
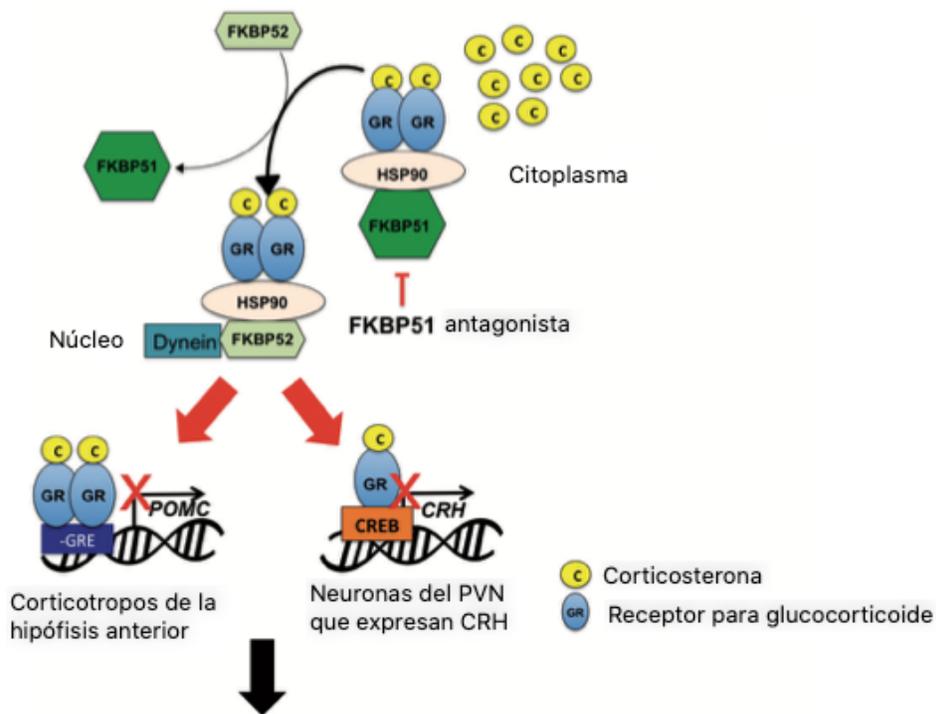


Figura 3. Mecanismo molecular de acción de los GC. Los GC se movilizan al citoplasma y se unen a su receptor específico que se encuentra unido a proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90, el complejo R-GC luego de la unión promueve la separación de las proteínas chaperonas y complejo se fosforila y se dimeriza, posteriormente este complejo se transloca al núcleo y se une a los elementos de respuesta de unión a GC, luego tendrá lugar la transcripción del ARNm y fuera del núcleo pasará por el proceso de traducción para la traducción de secuencias de aminoácidos. Modificado a partir de (Gómez Ordóñez et al., 2007; Rojas Durán et al., 2011).

Los GC ejercen retroalimentación negativa en el hipocampo, en el PVN del hipotálamo y en los corticotropos hipofisarios para regular la actividad del eje HHA durante los picos circadiano y durante la respuesta de estrés. Los GC atraviesan la membrana celular y se unen a los GR y MR que están en el citosol unidos a proteínas chaperonas HSP90, HSP70 y HSP23 y a las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52, las cuales regulan la afinidad de los GR y MR por la corticosterona y su translocación al núcleo. Los cambios conformacionales causados por la unión de la corticosterona con los MR y GR favorecen la disociación de la FKBP51 y la unión de la FKBP52, lo que permite que los receptores se unan al transportador nuclear dineína y sean translocados al núcleo. Una vez en el núcleo, el complejo glucocorticoide-receptor se une a elementos de respuesta a GC negativos (nGRE o -GRE), y reprime la transcripción del gene que codifican para POMC en los corticotropos de la adenohipófisis (Gjerstad et al., 2018). En las neuronas del PVN, el GR no se une directamente al promotor del gen para CRH, sino que la corticosterona disminuye la transcripción del gen para CRH inhibiendo la unión de CREB al elemento de respuesta a AMPc (CRE) dentro del promotor del gen para CRH, a través de un mecanismo que involucra interacciones proteína-proteína entre GR y CREB (Yamamori et al., 2007; Gjerstad et al., 2018) (Figura 4).



- Disminuye los niveles basales de corticosterona y los inducidos por estrés
- Cambios en dinámica ultradiana (?)

Figura 4. Regulación de la actividad del eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HHA) por la corticosterona. El incremento de corticosterona durante el estrés o en los picos circadianos provoca la separación de GR de FKBP51 y su unión a FKBP52, lo que ocasiona la traslocación nuclear de GR y su unión al ADN. Los GR presentes en la adenohipófisis y en el núcleo paraventricular (PVN) regulan la retroalimentación negativa causada por la corticosterona, reduciendo la síntesis de POMC en los corticotropos y de CRH en las neuronas del PVN. (Modificado de Gjerstad et al., 2018).

Estrés durante la gestación

El estrés que se presenta en las mujeres durante la gestación, es conocido como estrés materno o estrés prenatal y se ha relacionado con una mayor vulnerabilidad para desencadenar problemas psicosociales en la descendencia, tanto en la infancia como en la edad adulta. En los niños, el estrés prenatal se ha está asociado con problemas cognitivos, conductuales, físicos y emocionales (King et al., 2009; King y

Laplante, 2005; Laplante et al., 2008) como el autismo (Beversdorf et al., 2005; Kinney et al., 2008), el trastorno de hiperactividad y déficit de atención (TDAH) (Grizenko et al., 2008; J. Li et al., 2010), la depresión (Watson et al., 1999) y la esquizofrenia (Huttunen y Niskanen, 1978; Kinney, 2000).

Estudios en modelos animales demostraron que la exposición fetal a unas deficiencias nutricionales, escasez de nutrientes específicos o estrés puede inducir alteraciones permanentes en el desarrollo y alteraciones en la programación temprana, la cual está relacionada con una serie de enfermedades en la vida postnatal, incluyendo enfermedades cardiovasculares o déficits cognitivos (Barker, 1998). La exposición de ratas gestantes a condiciones estresantes como ruido, inmovilización o hacinamiento reduce el número de las camadas debido a la reabsorción de los embriones, así como malformaciones estructurales como la reducción en el volumen del hipocampo, retraso del crecimiento y menor peso al nacimiento de las crías (de Catanzaro y Macniven, 1992).

Estudios en ratas gestantes que se expusieron a estresores, como choques eléctricos en las patas, inmovilización o ruidos inesperados, se observaron efectos permanentes en la descendencia, tales como retraso en el desarrollo motor, ansiedad cuando se expusieron a nuevos ambientes, disminución del comportamiento social, sexual, así como alteraciones en las funciones cognitivas como son la atención y el aprendizaje (Huizink, 2000). La administración de dexametasona en ratas gestantes causa malformaciones y efectos neurotóxicos, particularmente en el hipocampo, además de retraso en el desarrollo motor (Benešová y Pavlík, 1989; Mulder et al., 2002).

Glucocorticoides en la descendencia estresada prenatalmente

El porcentaje de niños con autismo, nacidos de mujeres embarazadas que han sufrido experiencias tales como huracanes y tormentas tropicales, se incrementa de acuerdo con la intensidad de las tormentas de 3.72 por cada 10,000 nacimientos a 26.59 por cada 10,000 nacimientos (Kinney et al., 2008). En los casos de mujeres embarazadas que han pasado por terremotos durante la gestación, también aumenta significativamente el porcentaje de niños con depresión severa, de 5.5% en niños no expuestos a estrés prenatal a 13.3% en individuos que pasaron por dichas situaciones estresantes (Watson et al., 1999).

Diversos estudios en animales de experimentación han mostrado que el estrés materno por diversos estresores como la inmovilización en un ambiente iluminado (Barbazanges et al., 1996; Takahashi, 1998; Ward y Weisz, 1984), o la inmersión en agua fría (García-Vargas et al., 2019; Guerrero et al., 2016), en la última semana de gestación causa incremento en los niveles de corticosterona en el plasma materno. Se ha observado que el incremento de glucocorticoides maternos durante el estrés (de Weerth et al., 2003; Harris y Seckl, 2011; Henry et al., 1994), causa disminución de la expresión y actividad de la enzima placentaria 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β -HSD2), la cual metaboliza a los GC. Esto permite que los GC maternos lleguen hasta el feto, causando alteraciones en la programación fetal (Charil et al., 2010; Viltart y Vanbesien-Mailliot, 2007).

Alteración del eje adrenal en animales estresados prenatalmente

El estrés se puede presentar en cualquier etapa de la vida, incluso durante el periodo gestacional. Durante el estrés gestacional, el eje HHA materno libera grandes cantidades de glucocorticoides (Johnson et al., 1992), los cuales tienen un fuerte efecto en la programación del cerebro fetal. En los roedores, el eje HHA responde de manera aguda a partir del día 18 de la gestación, ya que el estrés prenatal por inmovilización induce el incremento de corticosterona tanto en la madre como en los fetos de ambos sexos (Ohkawa et al., 1991).

Programación del cerebro fetal

La “hipótesis de Barker” postula que la estructura y la función de muchos órganos experimentan programación durante el desarrollo embrionario y fetal, lo que determina el punto de regulación de las respuestas fisiológicas y metabólicas durante la etapa adulta. Por lo tanto, cualquier estímulo o alteración durante el periodo crítico del desarrollo embrionario o fetal, puede causar cambios estructurales, fisiológicos y metabólicos permanentes, predisponiendo al organismo a enfermedades de diversa índole en la etapa adulta (Kwon y Kim, 2017). El estrés en fases tempranas de la gestación aumenta la síntesis del CRH placentario (pCRH) y acorta la duración de la gestación (Glynn et al., 2001). En la mujer, la actividad del pCRH materno es modulada por el eje HHA y se ha demostrado que las concentraciones elevadas de pCRH pueden provocar parto prematuro espontáneo (Glynn et al., 2004; Sandman et al., 2006). Esta hormona placentaria, también puede influir en el desarrollo fetal del hipocampo debido

a que estimula la secreción de ACTH y de GC maternos. El estrés prenatal causa disminución en el RNAm para la enzima 11 β -HSD2, así como aumento en la metilación del promotor del gen para 11 β -HSD2 (Peña et al., 2012). En contraste con la producción de CRH hipotalámica, que es suprimida por la liberación de cortisol durante la respuesta de estrés materno, la pCRH se incrementa por liberación de cortisol, de modo que el estrés materno causa progresivamente niveles más altos de CRH en el plasma fetal, afectando así el desarrollo del hipocampo y otras áreas límbicas como son el septum lateral y la amígdala, ya que estas áreas son ricas en receptores para CRH durante y al final de la gestación (Sandman et al., 1999). La disminución de la expresión y la actividad de la enzima 11 β -HSD2 placentaria que causa el estrés prenatal (Welberg et al., 2005; Charil et al., 2010), incrementa la producción y el metabolismo de hormonas tales como las prostaglandinas, la progesterona, los estrógenos, el lactógeno placentario (HPL), además de disminuir el transportador de glucosa (GLUT-1) y el suministro de oxígeno (Carter, 1989; Mayhew et al., 1993), hacia la placenta, limitando el aporte de nutrientes como la glucosa (Shin et al., 1997), los lípidos (Innis, 2005) y los aminoácidos (Cramer et al., 2002) hacia el feto, contribuyendo así al bajo peso al nacimiento y retraso del crecimiento intrauterino, además de ocasionar trastornos del embarazo, como parto prematuro y preclamsia en las mujeres (Charil et al., 2010; Mairesse et al., 2007).

Embriogénesis del Hipocampo

En la rata, la embriogénesis del hipocampo inicia el día 14 de la gestación. A partir de ese día, se identifica el neuroepitelio hipocampal y el hipocampo fetal se observa a partir del día 20 de la gestación (Bayer et al., 1993; Bayer 1980) (Figura 5). Es importante mencionar que el hipocampo es una de las estructuras cerebrales que se sigue desarrollando y creciendo en la etapa postnatal, además de la corteza cerebral, el cuerpo estriado, el bulbo olfatorio y el cerebelo (Mengler et al., 2014). Se ha reportado que entre los días postnatales (P) P1 al P7 existe un aumento en la tasa de crecimiento y el volumen del hipocampo en un 26%; entre el P7 al P21 incrementa en un 120%, tomando en consideración las matrices germinales (se refiere al neuroepitelio y la zona subventricular), el cuerno de Amón (CA), el giro dentado (GD) y el conjunto fimbria-fórnix (Bayer 1980).

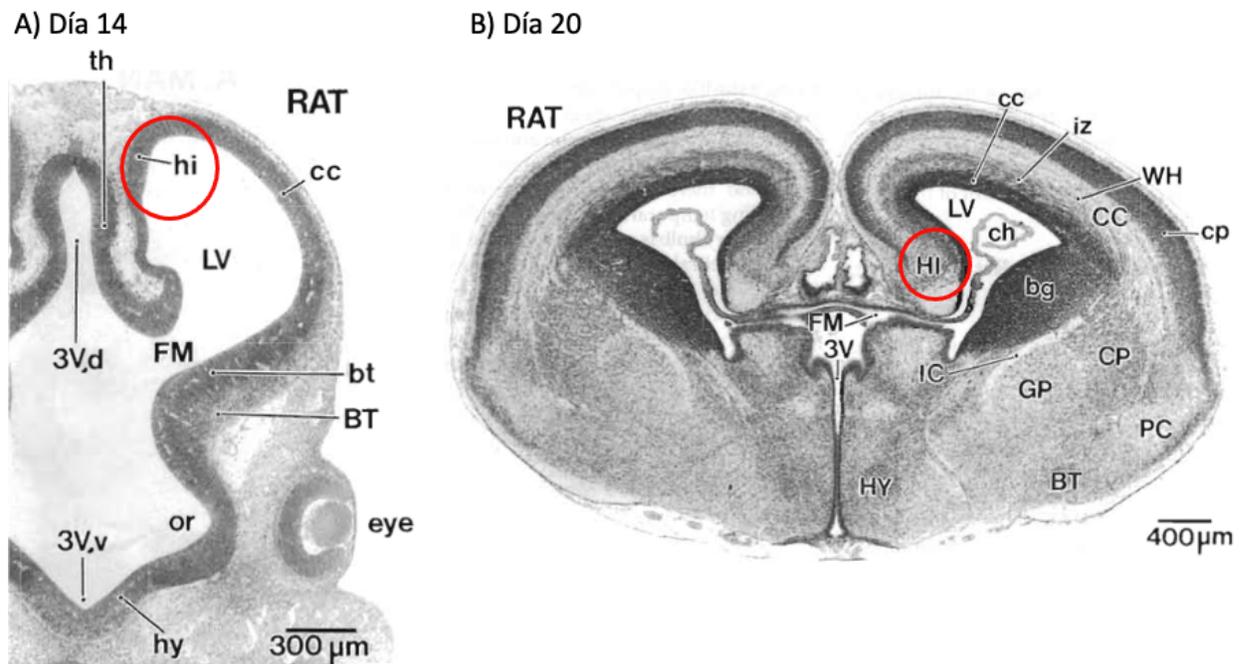


Figura 5. Cortes coronales de cerebro de rata durante el desarrollo en el útero A) Día 14 de la gestación comienza la formación del neuroepitelio hipocampal B) Día 20 de la gestación se forma propiamente el hipocampo fetal. (Bayer et al., 1993).

El hipocampo es una estructura cerebral que experimenta una importante maduración postnatal y es sensible a los cambios inducidos por los glucocorticoides. La neurogénesis de las neuronas piramidales ocurre entre los días 16 al 19 de la gestación y las neuronas granulares del giro dentado del hipocampo se forman en la primera semana postnatal (Takahashi, 1998). En la rata, se ha propuesto que la corticosterona regula procesos de neurogénesis, migración y muerte celular en el giro dentado (Gould et al., 1991).

Neurobiología del aprendizaje y la memoria

El aprendizaje y la memoria son formas de adaptación de los seres vivos a las condiciones cambiantes del medio ambiente. El aprendizaje es la experiencia que produce cambios morfológicos de dendritas y axones durante el procesamiento de la información aunado a la activación de enzimas, segundos mensajeros y factores de transcripción durante la potenciación de largo plazo (LTP). Los cambios pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento de los organismos (Morgado, 2005).

Aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria son dos procesos íntimamente relacionados; el aprendizaje es la adquisición de información y la memoria es el proceso de recuperación de la información adquirida previamente (Aguado-Aguilar, 2001). Por

ende, 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, que pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento de los organismos (Morgado, 2005). Actualmente, diferentes trabajos sobre la iniciación y el mantenimiento de la plasticidad sináptica en el hipocampo muestran que tanto el aprendizaje como la LTP inducida artificialmente, producen cambios morfológicos en las espinas dendríticas, lo que podrían constituir la base estructural de la memoria (Lamprecht y Ledoux, 2004; Melian et al., 2008; Dahlin et al., 2019; Lui et al., 2011; Bliss y Lomo, 1973).

El Hipocampo y su papel en el aprendizaje y la memoria

El hipocampo forma parte del sistema límbico, junto con la corteza cingulada, el tálamo y la amígdala; es una red integrada e implicada en los procesos de aprendizaje, de memoria, de atención, además de los estados de motivación y emoción (Koehl y Abrous, 2011). El área CA3 del hipocampo participa principalmente en la formación de la memoria declarativa (o explícita) en humanos; en los roedores, esta estructura está implicada en la formación de la memoria de tipo espacial (o relacional), ésta consiste en la recuperación de la información obtenida del entorno, así como lo aprendido de forma empírica, además de los procesos de recuperación de la información aprendida y almacenada previamente (Eichenbaum, 2000; Gabrieli, 1998). La región CA3 del hipocampo dorsal es esencial durante el desempeño de las pruebas de navegación espacial en roedores (Lee y Kesner, 2003). Las neuronas de la región CA1 del hipocampo presentan tasas de disparo mayores del 70% cuando se desempeñan

tareas de aprendizaje y memoria de trabajo espacial, las cuales son dependientes del hipocampo (Griffin et al., 2007).

El hipocampo no es un área cerebral homogénea, ya existe una disociación funcional a lo largo de su eje septo-temporal; es decir, la parte dorsal está más involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria y la navegación espacial (Bannerman et al., 2004; Tanti y Belzung, 2013), ya que la lesión en esta región del hipocampo deteriora el desempeño de animales de experimentación en el laberinto acuático de Morris, el cual se utiliza para evaluar la memoria de tipo espacial en los roedores (Morris et al., 1982; Tanti y Belzung, 2013). Además, la proporción de la tasa de disparo de las células piramidales de CA1 es mayor en la porción dorsal del hipocampo, cuando las ratas son sometidas a tareas de aprendizaje y memoria (Jung et al., 1994). Por su parte, la subregión ventral está más vinculada con el comportamiento emocional y la regulación del eje HHA durante la respuesta de estrés (Tanti y Belzung, 2013). 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 los fetos de roedores, lo que causa que la descendencia estresada prenatalmente presente una reducción en el volumen del hipocampo (Brunson et al., 2003).

La formación hipocampal se compone del GD, el hipocampo, el complejo subicular y la corteza entorrinal y se divide en cuerno de Amón 1 al 3 (CA1-CA3), que se componen principalmente de células piramidales (Schultz y Engelhardt, 2014; Sloviter, 1994). El hipocampo es considerado como la principal estructura que participa en el

aprendizaje y la memoria espacial. Para lograr llegar de un punto a otro, cualquier organismo debe ubicarse en el espacio en donde se localiza y de esta manera seleccionar la mejor ruta; esta elección depende de la ubicación del organismo en ese momento. La percepción propia de la orientación espacial requiere del conocimiento de dos tipos de información, la ubicación y rumbo direccional (Taube, 2007). La región dorsal de CA1, contiene la mayor densidad de células que codifican la localización espacial. Las neuronas del hipocampo que codifican la posición del sujeto en el espacio se conocen como “neuronas de lugar”. La actividad eléctrica de estas neuronas, registradas en ratas con libre movimiento, en relación a la ubicación de la rata en un espacio reducido muestra que aumentan su frecuencia de disparo cuando la rata se encuentra en un lugar específico (O’Keefe y Dostrovsky, 1971). Estas neuronas envían proyecciones excitatorias masivas a regiones dorsales del subiculum, del presubiculum y del postsubiculum (Jung et al., 1994; Witter y Groenewegen, 1990). El complejo subicular en las regiones dorsales contiene células que codifican la posición de la cabeza en un espacio abierto (Taube, 2007) (Figura 6).

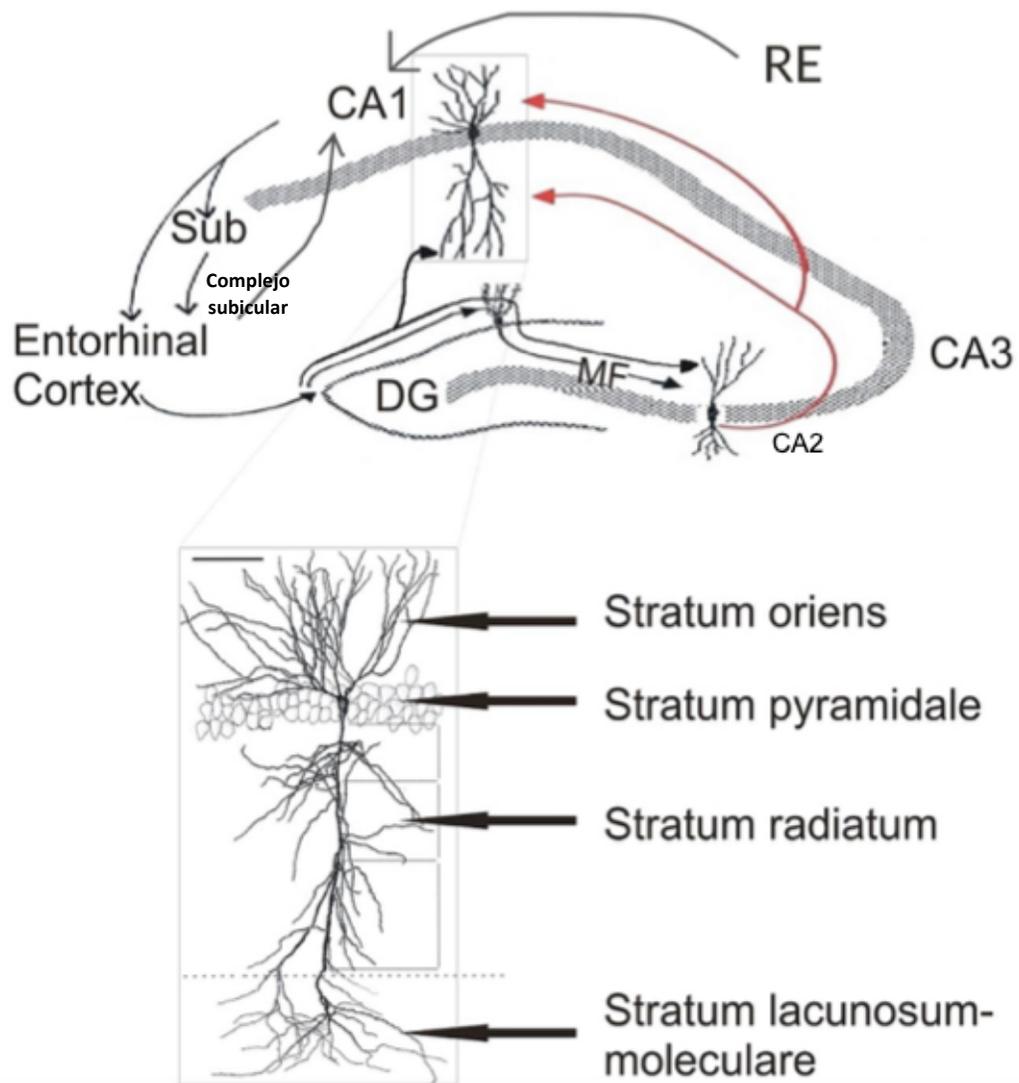


Figura 6. Regionalización del hipocampo. La información ingresa a la corteza entorrinal y puede proyectarse directamente al CA1 a través de un circuito trisináptico, haciendo sinapsis primero en el giro dentado, que luego proyecta al cuerno de Amón 3 (CA3) mediante fibras musgosas (MF) y desde el CA3 al CA1 a través de la vía colateral de Schaffer. También hay una proyección desde el núcleo reuniens (RE) hacia la región CA1. Luego, la información puede viajar desde el CA1 hasta la corteza entorrinal. Se muestra también la organización de diferentes capas de las células piramidales en el hipocampo. Las dendritas basales están en el estrato oriens, las dendritas apicales proximales están en el estrato radiatum y las dendritas apicales distales están ubicadas en el estrato lacunosum-moleculare (Megías et al., 2001).

Las proyecciones corticales más importantes y estudiadas de la región dorsal de CA1 y de la región dorsal del complejo subicular son la corteza cingulada anterior y la esplenial en ratas y en primates (Roberts et al., 2007; Swanson y Kohler, 1986). Estas regiones corticales están involucradas en el procesamiento cognitivo de información visual y espacial y en el procesamiento de la memoria y la exploración del medio ambiente (navegación espacial) en ratas, en primates y en humanos (Harker y Whishaw, 2004; Lavenex et al., 2007; Spiers y Maguire, 2006).

La parte dorsal del complejo subicular envía proyecciones paralelas masivas a través del fórnix postcomisular a los núcleos medial, lateral mamilar y el complejo talámico anterior (Ishizuka, 2001). Estas estructuras contienen la más alta densidad de neuronas relacionadas con la navegación o ubicación espacial. A su vez, estas estructuras subcorticales envían proyecciones de regreso a la corteza retroesplenial, la cual se compone de la corteza cingulada y se extiende hasta al cuerpo calloso, está estructura conecta a los dos hemisferios cerebrales (Risold et al., 1997). Posiblemente esta red neuronal compuesta de la región dorsal de CA1, del complejo subicular mamilar y de los núcleos talámicos anteriores proveen la interfase más importante para registrar un mapa cognitivo y de esta manera generar un sistema de navegación y dirección, por lo tanto, les permite a los animales una orientación y ejecución de conductas apropiadas que se aprendieron en el medio ambiente (Muller et al., 1996; Taube, 2007)

Las regiones dorsales CA1 y CA3 envían proyecciones de manera selectiva hacia la parte caudal del núcleo septal lateral y la pequeña región dorsal de la zona media de

la parte rostral del núcleo del tabique lateral, que a su vez se proyecta hacia el complejo septal medial y el núcleo supramamilar (Risold et al., 1997), dos estructuras que generan y controlan el ritmo theta del hipocampo activado durante la locomoción voluntaria (Kocsis y Vertes, 1997) (Figura 7).

El GD también recibe múltiples entradas sensoriales provenientes tanto de regiones corticales como subcorticales. La mayor entrada de información llega de la vía perforante que proviene de la capa 2 de la corteza entorrinal, que se divide en la vía perforante medial, la cual procesa la información espacial y el componente lateral, que procesa la información no espacial (Koehl y Abrous, 2011).

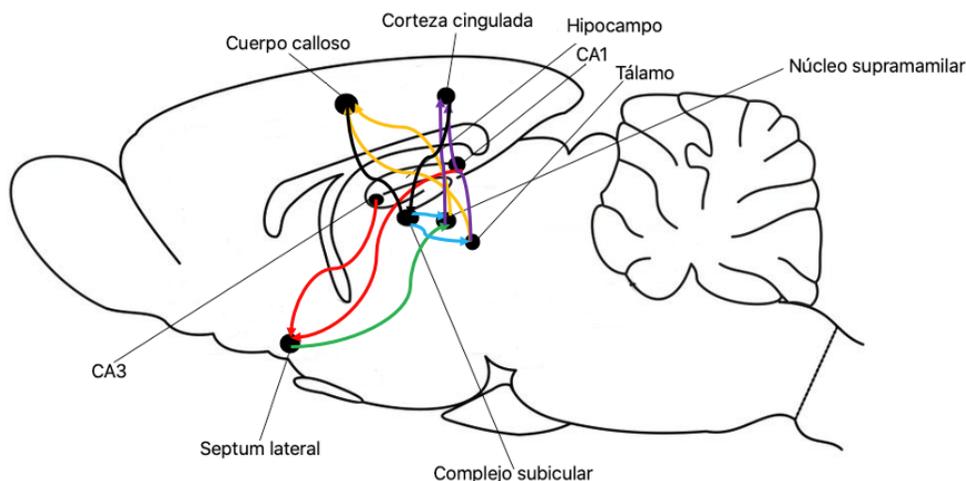


Figura 7. Proyecciones hacia el hipocampo. Algunas de las proyecciones vienen de la región dorsal de CA1 y CA3 que envían proyecciones a la parte caudal del septum lateral (flechas rojas). El septum lateral proyecta hacia el núcleo supramamilar (flecha verde). Del complejo subicular proyecta hacia los núcleos mamilares y el tálamo (flechas azules). Estas dos últimas estructuras proyectan hacia el cuerpo calloso y la corteza cingulada (flechas amarillas y moradas respectivamente) y por último se retornan las proyecciones regresan hacia el complejo subicular (línea negra).

ANTECEDENTES

Efectos del estrés materno en el aprendizaje y la memoria

Algunos de los efectos que causa el incremento de los glucocorticoides maternos durante la gestación se han demostrado en la descendencia en humanos y en animales de laboratorio, como son: menor peso al nacimiento, alteración en el desarrollo (Bloom et al., 2001) y alteración de la maduración de estructuras cerebrales, tales como el hipocampo. En la descendencia expuesta a estrés prenatal el número de GR y MR en hipocampo está reducido, así como en el volumen de esta estructura (de Kloet et al., 2008; Harris y Seckl, 2011; Karst et al., 2005). La lesión del hipocampo produce pérdida de memoria de tipo espacial en roedores cuando son sometidos al laberinto acuático de Morris (LAM) (Eichenbaum, 2000; Morris et al., 1982). El estrés prenatal causa en la descendencia adulta deficiencias en el aprendizaje y la memoria espacial, cuando se exponen al LAM (Akatsu et al., 2015; Aleksandrov et al., 2001; Guerrero et al., 2016; Weinstock, 2017). Además, el estrés prenatal afecta la función cognitiva mediante la interrupción de la plasticidad sináptica en las sinapsis glutamatérgicas (Jia et al., 2010), mediante la disminución del receptor NMDA en el hipocampo (Freund, 1992), que está relacionado con la LTP, y podría asociarse con las deficiencias cognitivas observadas en los animales estresados prenatalmente. Además, la exposición a altos niveles de corticosterona materna durante la gestación provoca disminución de la memoria de corto y largo plazo mediante alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica.

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la descendencia de ambos sexos presenta deficiencias tanto en el aprendizaje como en la memoria; estas deficiencias están relacionadas con la disminución en el proceso de neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. Estos efectos se han atribuido a los elevados niveles de glucocorticoides maternos observados en los días 18 y 19 de la gestación (Guerrero et al., 2016). El incremento de las concentraciones de corticosterona generado por el estrés materno deteriora la adquisición y la recuperación de información en LAM (Szuran et al., 2000).

Neuroquímica del aprendizaje y la memoria en animales estresados prenatalmente

En los procesos de aprendizaje y memoria participan varios neurotransmisores, tales como el glutamato, el GABA, la acetilcolina, la dopamina, la NA y la 5-HT. Las inervaciones noradrenérgicas y serotoninérgicas tienen una densidad y distribución similar, son extremadamente amplias y se superponen en gran medida (Hurley et al., 2004). La prueba de LAM ha sido una herramienta para investigar la orientación espacial en las ratas y se ha podido determinar el porcentaje de participación de cada neurotransmisor en esta prueba. El glutamato tiene un 100% de participación, mientras que GABA participaba en un 83%, acetilcolina con 59%, 5-HT con 63%, NA con 67% y dopamina con 86% (Myhrer, 2003). El aprendizaje y la consolidación de la memoria a corto y largo plazo también pueden estar regulados por los receptores serotoninérgicos los 5HT1A y los 5HT7, de los cuales se ha demostrado su

participación mediante la administración de fármacos agonistas y antagonistas (Perez-García y Meneses, 2009).

Las proyecciones noradrenérgicas provienen del LC de un grupo de neuronas denominadas "grupo de neuronas A6" estas neuronas envían proyecciones hacia el área tegmental ventral y dorsal, al cerebro anterior a través del haz medial hacia el tálamo, al hipotálamo y a las estructuras del cerebro anterior límbico (corteza cerebral, giro cingulado, hipocampo y amígdala) (Sara, 2009). El sistema noradrenérgico participa principalmente en la consolidación de la memoria y en la potenciación de largo plazo, la cual ocurre en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Además, en el giro dentado del hipocampo existe una gran densidad de fibras noradrenérgicas (Figura 8A) (Palacios-Filardo y Mellor, 2019). El estrés prenatal afecta el desarrollo de las neuronas noradrenérgicas en la etapa fetal y causa disminución en la inmunoreactividad de la tirosina hidroxilasa en las neuronas del LC (Bock et al., 2015; Ikemoto et al., 2015). Además, el estrés prenatal por exposición a un ambiente frío disminuye la inmunorreactividad de la tirosina hidroxilasa en las neuronas del LC de ratas jóvenes (Bock et al., 2015; Ikemoto et al., 2015). La NA es importante para la recuperación de la memoria dependiente del hipocampo, pero no para la adquisición y la memoria a corto plazo en el LAM. Estos efectos de la NA están mediados por receptores adrenérgicos β_1 (Murchinson et al., 2004; Schimanski et al., 2007). Además, el contenido de NA disminuye en el hipocampo de la descendencia estresada prenatalmente por estrés crónico leve e impredecible (Guan et al., 2017). El estrés prenatal por nado forzado e inmovilización disminuye la afinidad de los receptores tipo

β por la NA en el hipocampo dorsal (Grigoryan y Segal, 2013). A pesar de estos estudios, la participación de la NA en los procesos cognoscitivos está poco estudiada.

En el caso de las proyecciones serotoninérgicas, los núcleos del rafe dorsal principalmente del B5 al B8 envían proyecciones a otras estructuras cerebrales, (Siegel et al., 2006). Las neuronas de 5-HT del rafe dorsal inervan más densamente la corteza cerebral, el septum, la amígdala y el hipocampo, mientras que el núcleo del rafe medial inerva al cuerpo estriado (Siegel et al., 2006; Ögren et al., 2008) (Figura 8B). Aunado a lo anterior, las terminaciones nerviosas de las células granulares e interneuronas que se localizan en el giro dentado y en el hipocampo poseen 5-HT (Figura 8B) (Glikmann-Johnston et al., 2015; Kulla y Manahan-Vaughan, 2002). La administración de 5,7-Dihydroxytryptamina (5,7-DHT), neurotoxina utilizada para disminuir las concentraciones de 5-HT en el cerebro, interrumpe la adquisición de información, en tareas de memoria de trabajo y en el comportamiento exploratorio (Cassaday et al., 2003). Asimismo, la disminución de 5-HT mediante esta neurotoxina causa disminución en la memoria de corto plazo (Hritcu et al., 2007).

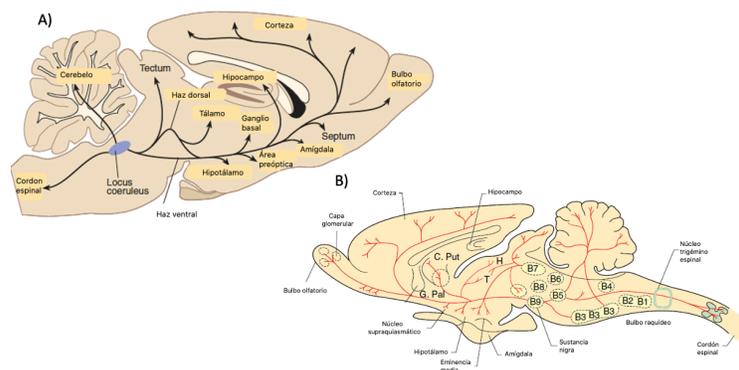


Figura 8. Núcleos y proyecciones en el cerebro de rata A) Proyecciones noradrenérgicas provenientes del Locus coeruleus hacia cerebelo, tallo cerebral, tálamo, ganglio basal, amígdala, septum, bulbo olfatorio, tectum, hipotálamo, corteza e hipocampo. B) Proyecciones serotoninérgicas provenientes del núcleo de rafe dorsal y medial hacia tallo cerebral, bulbo raquídeo, sustancia nigra, tálamo, eminencia media, amígdala, núcleo supraquiasmático, bulbo olfatorio, hipotálamo, corteza e hipocampo. Tomado de (Siegel et al., 2006).

La 5-HT inhibe la liberación de GABA a través del receptor 5HT1A en las interneuronas de la región CA1 (Freund 1992). Asimismo, se ha reportado que estos receptores 5-HT1A presinápticos reducen la liberación de glutamato de las colaterales de Schaffer en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo (Schmitz et al., 1995). Por tanto, la 5-HT es capaz de modular a otros sistemas de neurotransmisión que están ligados directamente con los mecanismos de LTP, como es el caso de glutamato. Estudios farmacológicos, en los que se ha utilizado la tomografía de emisión de positrones (PET) con ligandos para el receptor 5-HT1A, muestran que la 5-HT juega un papel clave en el aprendizaje y la memoria espacial (Glikmann-Johnston et al., 2015). El receptor 5-HT1A se localiza en diversas estructuras del sistema límbico, principalmente en el giro dentado y en la región CA1 del hipocampo, en el septum lateral y la amígdala, que son regiones involucradas en el aprendizaje y la memoria espacial y se ha demostrado que tiene un papel preponderante en estos procesos cognitivos en los roedores, mientras que los niveles reducidos de 5-HT deterioran la memoria espacial en ratas (Glikmann-Johnston et al., 2015). Experimentos farmacológicos en los que se ha alterado la liberación o la recaptura de 5-HT en el cerebro afectan la memoria espacial. El incremento en la liberación de 5-HT favorece

el desempeño en la memoria espacial. Por el contrario, la disminución en la 5-HT disminuye la memoria espacial (Kuypers y Ramaekers, 2005; Lesch et al., 1996).

Está demostrado que la interrupción del aprendizaje espacial en la descendencia causada por el estrés prenatal está relacionada con la expresión disminuida de ARNm de esos mismos receptores en el hipocampo (Akastu et al., 2015). La activación optogenética de las terminales serotoninérgicas en las neuronas piramidales del hipocampo de la región CA1 potencia la transmisión excitadora en las sinapsis CA3 a CA1 y mejora la memoria espacial. Por el contrario, el silenciamiento optogenético de las terminales serotoninérgicas en CA1 inhibe la memoria espacial en ratones (Texeira et al., 2018).

En los animales descendientes de madres que han sido expuestas a estrés por hacinamiento e inyección de solución salina, se observó disminución del 17% en los niveles de 5-HT en el hipocampo, asociado al incremento de su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en un 18%, con un incremento en la tasa metabólica del 49%. Además, la densidad sináptica en el hipocampo disminuyó en un 32% en el día 35 postnatal. Sin embargo, en estos animales no se observaron deficiencias en el aprendizaje, pero sí en la memoria en el LAM (Hayashi et al., 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La descendencia de madres que padecen estrés durante la gestación es más propensa a presentar deficiencias cognitivas, desde las primeras etapas de la vida hasta la etapa adulta. Dichas deficiencias están asociadas con alteraciones en la funcionalidad del hipocampo dorsal, el cual tiene una participación importante en el aprendizaje y la memoria espacial en los roedores. En el estudio de las deficiencias cognitivas, no existen reportes acerca de posibles cambios en el contenido tisular de neurotransmisores, así como su liberación después de realizar tareas de aprendizaje y memoria espacial. A pesar de la información que existe actualmente, aún no está claro si las alteraciones en el proceso de aprendizaje y memoria en los animales estresados prenatalmente están relacionadas directamente con cambios en la liberación de 5-HT y NA.

JUSTIFICACIÓN

Los procesos de aprendizaje y memoria requieren de la participación de diversos sistemas neuroquímicos, siendo el glutamato y el GABA los más estudiados. Sin embargo, la participación de los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico ha sido poco estudiada. Por lo anterior, es importante evaluar de qué manera el estrés prenatal afecta la funcionalidad de estos sistemas durante los procesos cognitivos. Si bien existen estudios farmacológicos que ya describen la participación de la 5-HT y NA, los estudios realizados con la técnica de microdiálisis pueden aportar información más

precisa de la respuesta de estos dos sistemas a los procesos cognitivos. Por ello, en este trabajo se evaluó tanto el contenido tisular como la concentración extracelular de 5-HT y NA en el hipocampo dorsal de animales estresados prenatalmente en la edad adulta durante el aprendizaje y la memoria espacial. Considerando que el estrés prenatal incrementa la secreción de glucocorticoides en la descendencia y que pueden ser un factor causal importante en la disminución de la neurotransmisión en el hipocampo dorsal en respuesta a pruebas conductuales de aprendizaje y memoria espacial, también se evaluó la respuesta del eje adrenal a la exposición al LAM. Asimismo, se evaluó el transportador de serotonina (SERT) para indagar su participación en los procesos cognitivos del hipocampo dorsal.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efectos tendrá el estrés prenatal en el contenido y la liberación de 5-HT y NA, así como en el transportador de 5-HT en el aprendizaje y la memoria espacial en la rata?

HIPÓTESIS

Si la 5-HT y NA participan estimulando el aprendizaje y la memoria espacial, entonces las deficiencias cognitivas causadas por el estrés prenatal estarán relacionadas con la

disminución en el contenido y la liberación de estos neurotransmisores del hipocampo dorsal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de la serotonina y la noradrenalina del hipocampo dorsal durante el aprendizaje y la memoria espacial en machos estresados prenatalmente.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la capacidad de aprendizaje y memoria espacial en machos expuestos a estrés prenatal.
- Evaluar la correlación de los procesos de aprendizaje y memoria espacial con la liberación de 5-HT y NA en el hipocampo dorsal.
- Evaluar la actividad y reactividad del eje adrenal en machos estresados prenatalmente.
- Cuantificar la participación del transportador de serotonina (SERT) en las pruebas cognitivas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo biológico

En este estudio se utilizaron ratas hembras y machos de la cepa Wistar de 200-250 g y de 250-300 g, respectivamente (3 meses de edad), estos animales fueron provistos por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (23° C) y con ciclo invertido de luz-obscuridad, 12/12 (la luz se apagó invariablemente a las 09:00 a.m. y se encendió a las 19:00 p.m.). Los animales fueron provistos de una dieta comercial para roedores y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062- ZOO-1999), y de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Diseño Experimental

Después de que las hembras y los machos realizaron la cópula, las hembras preñadas se asignaron aleatoriamente al grupo control o al de estrés. Las hembras control se mantuvieron sin alteraciones durante la gestación. Las hembras del grupo de estrés se sometieron a estrés por inmersión en agua fría, del día 15 al día 21 de gestación. Después del nacimiento, las camadas se homogenizaron en número en cada grupo y se sexaron. En el día postnatal 22 se destetaron y se separaron los machos de las hembras; se utilizaron únicamente los machos. A la edad de 2 1/2 meses de edad se realizó una cirugía estereotáxica a los animales de ambos grupos para la colocación

de cánulas dirigidas a hipocampo dorsal para realizar la microdiálisis en condiciones basales y después de las pruebas conductuales en el LAM. Se cuantificó la liberación de 5-HT, NA, así como la concentración del 5-HIAA por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detección electroquímica (HPLC-ED). Paralelamente a esto, se utilizaron otros grupos de control y estrés prenatal, se sometieron a la prueba de LAM y se sacrificaron por decapitación en los días 1, 4, 6, 13 de la prueba. Se extrajo el hipocampo dorsal para la cuantificación de contenido tisular de 5-HT, 5-HIAA y NA por HPLC-ED. Asimismo, se obtuvieron muestras de sangre para cuantificar corticosterona en suero mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detector ultra violeta (HPLC-UV). Adicionalmente se evaluó el contenido del SERT en el hipocampo dorsal de los animales control y estresados prenatalmente.

Exposición al estresor

Las hembras gestantes asignadas al grupo de estrés materno (n=20 por grupo), fueron sometidas a estrés por inmersión en agua fría dos veces al día (9:00 AM y 3:00 PM), durante la última semana de gestación (día 15 al 21). El paradigma de estrés consistió en colocar individualmente a las ratas en cajas con agua a 15°C y una profundidad de 15 cm, durante 15 min, una vez transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de agua de las ratas y se regresaron a sus cajas individuales (Retana-Márquez et al., 2003a; Retana-Márquez et al., 2009). La exposición al estresor se realizó en un cuarto diferente al cuarto de alojamiento.

Después del nacimiento, las camadas de cada grupo experimental se homogenizaron en número, se sexaron y pesaron las crías. En el día postnatal 22, las crías fueron

destetadas y se separaron los machos de las hembras de ambos grupos. Aproximadamente el 50% de la descendencia fueron machos.

Pruebas de aprendizaje y memoria

Las pruebas de aprendizaje y memoria se realizaron utilizando el LAM en la descendencia masculina adulta, de tres meses de edad, control y los estresados prenatalmente (n=50, cada grupo). Se utilizó una piscina circular, (170 cm de diámetro y 50 cm de altura), con una altura de agua de 30 cm, a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. La piscina se dividió en cuatro cuadrantes imaginarios (NE, NO, SE, SO), tomando como referencia la zona de acceso al laberinto. Los sujetos se liberaron desde diferentes puntos de partida en cada repetición, así como en cada día. Se colocaron tres figuras contrastantes en las paredes blancas alrededor de la tina, como pistas espaciales. Dentro de la piscina se colocó una plataforma de acrílico transparente (19cm x 22cm), en uno de los cuadrantes a 2 cm por debajo de la superficie del agua. El parámetro conductual que se analizó fue la latencia de escape, que es el tiempo que tardan las ratas en encontrar la plataforma sumergida tanto en la fase de aprendizaje (días 1-4) como en las de memoria de corto (día 6) y de largo plazo (día 13). En las pruebas del primer día, si una rata no encontró la plataforma en un tiempo de 60 s, se le guió hacia la plataforma y se le permitió permanecer ahí por 30 s. Cuando las ratas encontraron la plataforma dentro del periodo de 60 s, se les dejó en la plataforma por 30 s. En las pruebas de memoria de los días 6 y 13, se llevó a cabo un solo ensayo y se registraron las latencias de escape.

En las sesiones en las que se retiró la plataforma de la piscina (día 7) se evaluó el tiempo de permanencia en el cuadrante, que es el tiempo que la rata permanece en el cuadrante en donde estuvo la plataforma, así como el número de cruces de la rata sobre la zona donde anteriormente se encontraba la plataforma, esta se consideró también memoria de corto plazo (Guerrero et al., 2016; Kapoor et al., 2009; Nazeri et al., 2015).

Contenido tisular de NA, 5-HT y 5-HIAA en Hipocampo

Inmediatamente después de las pruebas conductuales, los animales de los grupos control y de estrés prenatal, fueron sacrificados por decapitación después de las pruebas de aprendizaje (días 1 y 4) y de memoria (días 6 y 13) en el LAM. A cada animal se le extrajo el cerebro, el cuál se colocó en una caja de Petri, sobre hielo, para mantener frío el cerebro. Posteriormente, se extrajo el hipocampo dorsal derecho y se colocó en un tubo y se pesó antes y después para obtener el peso del tejido, los tubos se rotularon y se congelaron a -70° C, hasta su procesamiento.

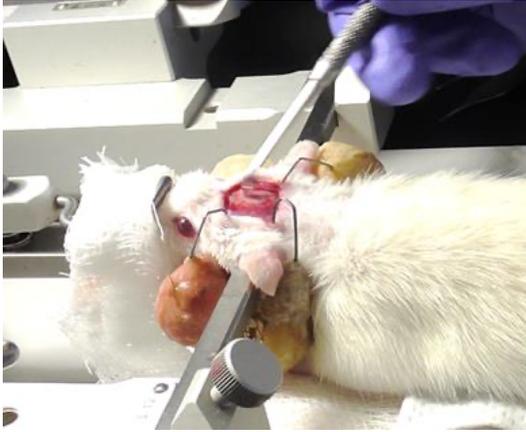
Para la cuantificación de las aminas, se agregaron 300 μ L de ácido perclórico al 0.1 M a cada muestra de hipocampo y se homogenizaron con un pequeño émbolo. El tejido homogenizado se mantuvo en hielo y cubierto, para evitar que la luz degradara la muestra. Posteriormente se centrifugaron por 15 minutos a 8000 rpm y a una temperatura de 4° C. El sobrenadante se filtró con membranas de nitrocelulosa, poro de 0.45 μ m (MF-Millipore™, Irlanda) y 13 mm de diámetro. Posteriormente, se inyectaron 10 μ L de la muestra filtrada al sistema cromatográfico HPLC-ED. La fase

móvil consistió en una solución acuosa de buffer de fosfatos (0.1 M con un pH de 3.2) la cual contenía sulfato de sodio, 0.2 mM, EDTA, 0.1 mM y metanol al 15% v/v.

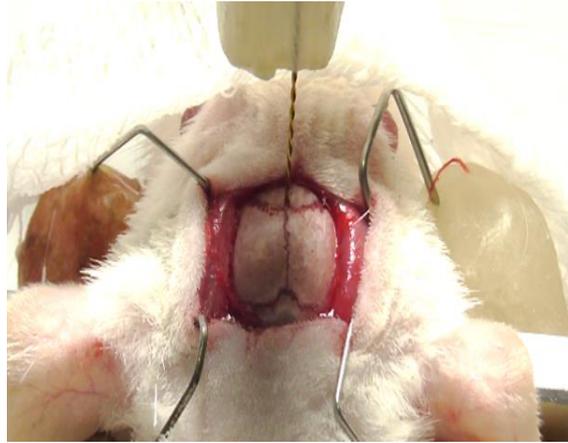
Cirugías Estereotáxicas

En otros machos control y estresados prenatalmente (n=50, de cada grupo) se efectuaron cirugías estereotáxicas. Las ratas se anestesiaron con ketamina (PiSA, S.A. de C.V., 80 mg/kg, i.p.) y xilazina (PiSA, S.A. de C.V., 20 mg/kg, i.m.). Se introdujo una cánula guía dirigida al hipocampo dorsal, utilizando las siguientes coordenadas: anteroposterior -5.3 desde bregma, medial/lateral 5.2 mm y dorso/ventral a partir de la dura -3.0 mm (Paxinos y Watson, 2006). Se colocaron cuatro tornillos de acero inoxidable en el cráneo y el implante se fijó con acrílico dental. Los animales se dejaron recuperar durante 7 días después de la cirugía (Figura 9).

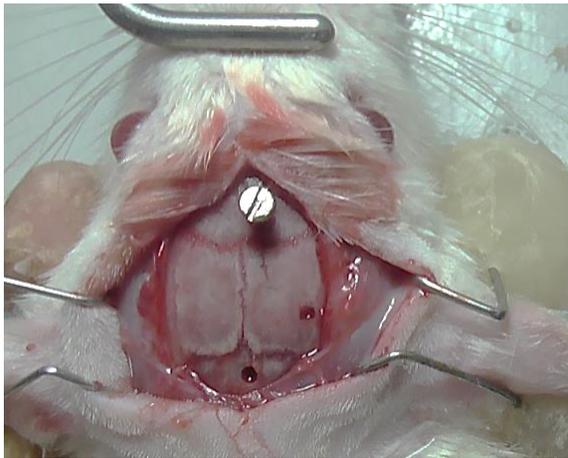
A)



B)



C)



D)



E)



Figura 9. 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 establecidas E) Una vez que la cánula se introdujo se fija el implante con acrílico dental y los roedores se dejan en recuperación durante 7 días.

Microdiálisis

Después de los 7 días de recuperación posteriores a la cirugía se introdujo una cánula de microdiálisis, la cual sobresale 3mm por debajo de la cánula guía y se ubicó en el hipocampo dorsal, fijándose al cráneo con acrílico dental. La parte activa de la cánula de microdiálisis, consistió de una membrana de poliacrilonitrilo (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 extracelular 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, CaCl₂, 2.3 mM, KCl, 4 mM y ácido ascórbico, 12.5 µM; pH=7.4. La SRM se pasó por 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 µL/min durante 2 h durante las cuales los animales se estabilizaron y posteriormente se colectan los dializados (30 µL cada uno) cada hora. Las muestras (10 µL cada una) se inyectaron al sistema HPLC-ED mediante un inyector Rheodyne (Waters Corp., Milford, MA, USA). Para la separación de los analitos, se empleó una

columna Symmetry C18, tamaño de partícula 2.5 μ m x 25 mm (Waters Corp., Milford, MA, USA). Se utilizó una bomba (modelo 515, Waters Corp, Milford MA, USA). Se utilizó una fase móvil de fosfatos con un pH de 3.1 a un flujo de 0.2mL/min. Los analitos se detectaron con un detector electroquímico (modelo 2465, Waters Corp., Milford, MA, USA) a una sensibilidad de 5 nA y un potencial de +800 mV. Los resultados fueron analizados usando el programa Milenium 32 (Waters, Milford, MA, USA).

Posteriormente, los animales se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebro y se congeló rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -70° C. Los cerebros se cortaron mediante el uso de un criostato marca Leica modelo CM 1510-3, para obtener secciones coronales de 30 μ m de grosor de cada cerebro a nivel del hipocampo dorsal. Las secciones obtenidas se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados, y se realizó la tinción de Nissl a las muestras para confirmar la trayectoria de la cánula y su posición en el hipocampo dorsal. Se colocó resina sintética y cubreobjetos (Paxinos et al., 2020).

Tinción de Nissl (Violeta de Cresilo). Los cerebros se pasaron por xilol y posteriormente por etanol al 100%, etanol al 95% y etanol al 70% y por último en agua Milli-Q, 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% durante 5 minutos en cada uno. 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 para corroborar la ubicación de la cánula en el hipocampo dorsal (Figura 10A). También se observan las coordenadas de ubicación de la cánula (Figura 10B).

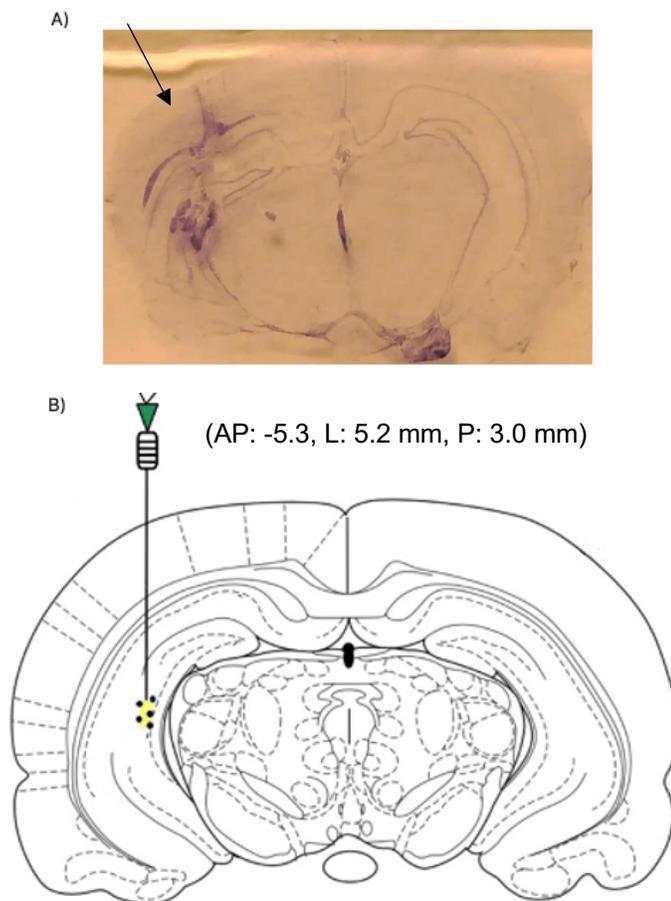


Figura 10. Cánula dirigida al hipocampo dorsal. (A) Corte coronal de cerebro de rata donde se muestran las trayectorias de las cánulas dirigidas a hipocampo dorsal. La flecha negra señala la lesión. (B) Corte coronal de cerebro de rata donde se muestran las coordenadas para el implante de las cánulas. Los puntos negros muestran la trayectoria de la cánula guía que se colocó en cada cirugía. Modificado de Paxinos y Watson, 2007.

Contenido de SERT en el hipocampo dorsal

El hipocampo dorsal de animales control y estrés prenatal (n=6 cada grupo) se homogenizó en 100 μ L de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, pH 7.5) más un coctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche Molecular Biochemicals). La concentración total de proteínas se determinó mediante el método de Bradford. A las muestras se les adicionó β -mercaptoetanol al 2% y fueron desnaturalizadas en baño María a temperatura de ebullición (94°C); posteriormente se cargaron 100 μ g por pozo en un gel de poliacrilamida al 12% y se corrió la electroforesis a 120 volts durante 90 min. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (BioRad, EE. UU.) a 350 miliampers durante 2 h. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h en una solución de PBS más leche en polvo descremada al 5% en más Tween 20 al 0.05%. Las membranas se incubaron con anticuerpo primario anti-SERT (Anticuerpo policlonal SERT de conejo, marca Genetex en una dilución 1:1000 en refrigeración durante toda la noche. Luego de 4 lavados con PBS-Tween al 0.05% durante 15 min cada lavado, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo, a una dilución 1:5000 (Vector Laboratories Inc.), durante 2 horas a temperatura ambiente. Las bandas de proteínas se detectaron con el sustrato HRP Luminata Crescendo Western (WBLURO500, Merck Lab). Las bandas se digitalizaron a través de LI-COR con el C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner, y el análisis DIV se realizó con el programa de software de análisis de Western Blot Image Studio.

Cuantificación de Corticosterona

Se obtuvieron muestras de sangre del tronco de los animales del grupo control y del grupo de estrés prenatal (n=6 por grupo). El suero (1 mL) se mezcló con 100 µL de una solución de 19-nortestosterona (5 µg/mL en agua/metanol) como estándar interno. La corticosterona se extrajo en 5 mL de una mezcla de dietil éter-diclorometano (60:40 v/v) y se centrifugó por 5 minutos a 800 revoluciones por minuto. Se extrajo la fase orgánica y se mezcló con 1 mL de agua grado HPLC, se agitó por 1 min y se centrifugó por 5 min. Se obtuvo la fase orgánica (3 mL) y se evaporó a temperatura ambiente. Los residuos fueron disueltos en 100 µL de metanol-agua (60:40 v/v). La corticosterona se separó y detectó en un sistema HPLC-UV con una precolumna (Symmetry C18, tamaño de partícula 3.5 µm, 2.1 x 10 mm (Waters Corp., Milford, MA, USA). La separación fue hecha a 40°C en una columna Waters Symmetry C18 (tamaño de partícula 5 µm; tamaño de columna de 2.0 x 150 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA) con una mezcla de agua-acetonitrilo, grado HPLC (65:35 v/v), a un flujo de 0.4 mL/min. Se utilizó un sistema controlador 600-MS para la fase móvil y los esteroides se detectaron con un detector UV (modelo 486, Waters Corp., Milford MA a una longitud de onda de 250 nm. Los resultados fueron analizados usando el programa Milenium 32 (Waters, Milford, MA, USA) ((Retana-Márquez et al., 2003b; Woodward y Emery, 1987).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se presentan como la media \pm el error estándar (EEM). Para el análisis de los pesos de las hembras gestantes se utilizó una regresión lineal, para los

resultados del laberinto acuático de Morris se utilizó una ANOVA de medidas repetidas, los pesos al nacimiento, la duración de la gestación, el número de cruces y las latencias promedio se analizaron con una t-Student, el número de crías, los niveles séricos de corticosterona el contenido tisular, la liberación y la evaluación de contenido de SERT en hipocampo dorsal se analizaron con una ANOVA de dos factores seguido de una prueba post hoc Tukey. Los porcentajes de permanencia en el cuadrante se analizaron con la prueba Chi-cuadrada. Se realizaron correlaciones de Pearson (r) entre los días que se realizó el LAM con las concentraciones de corticosterona, el contenido y la liberación de 5-HT y NA. Las diferencias entre grupos fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Ganancia de peso corporal en las hembras gestantes.

La ganancia de peso corporal en las hembras gestantes durante la última semana de gestación fue menor en las hembras expuestas a estrés materno. El coeficiente de correlación (r_2) de la curva control fue de 0.9970 y el de la curva de las hembras estresadas fue de 0.9898. Las pendientes de las curvas fueron diferentes, (control= 10.66 ± 0.8477 vs EP= 7.784 ± 0.6725 , $p=0.01891$) (Figura 11). Los pesos al nacimiento de las crías macho estresadas prenatalmente fueron menores que los de las crías control (Figura 12).

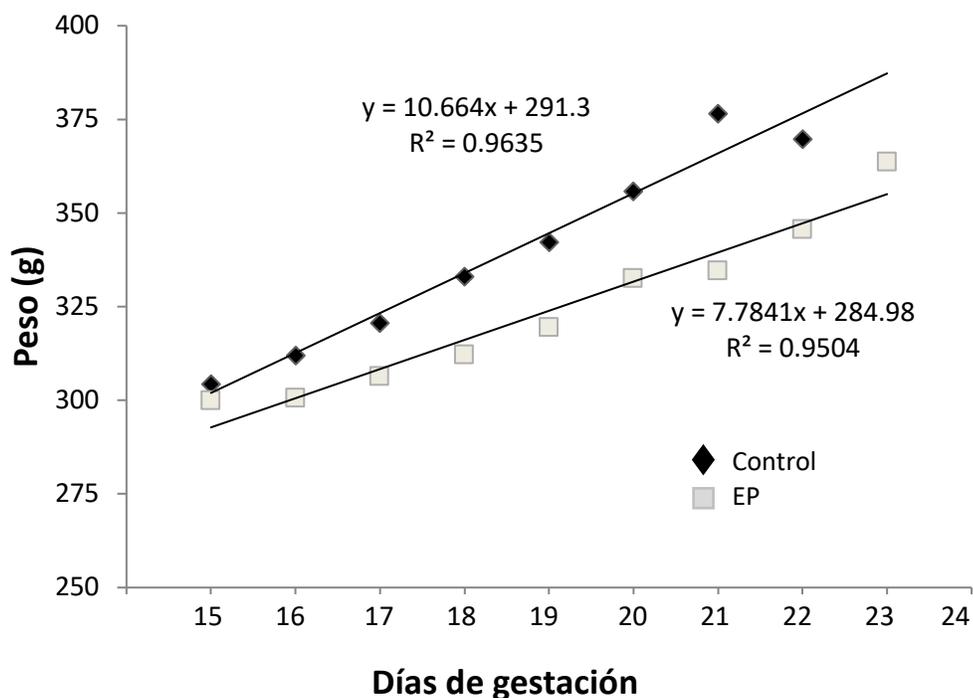


Figura 11. Pesos de las hembras gestantes. Se muestran los días de gestación del día 15 al 23 tanto control como estresadas prenatalmente. El análisis con regresión lineal muestra diferencias entre las pendientes del grupo control vs el estresado prenatalmente $p= 0.01891$ $n=20$ por grupo.

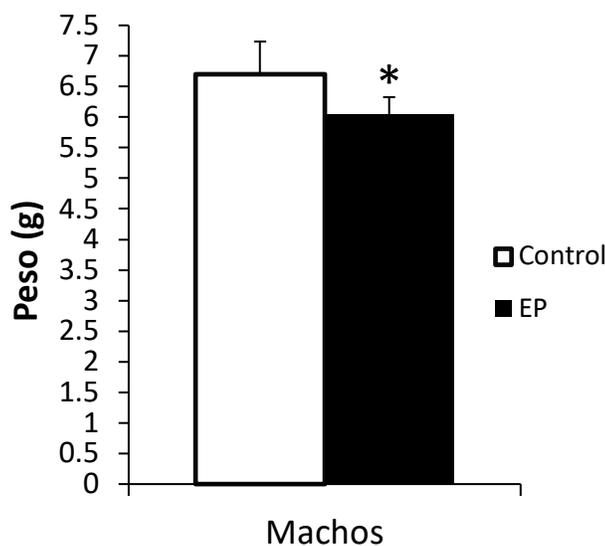
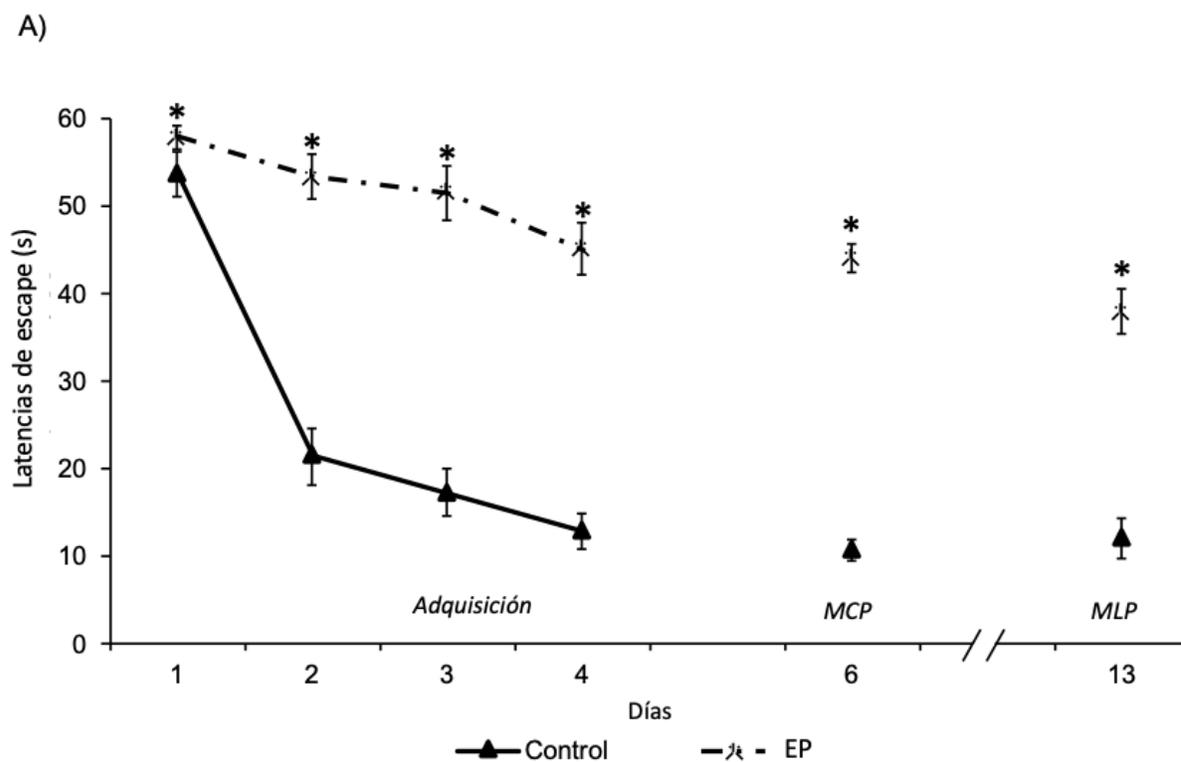


Figura 12. Pesos al nacimiento. De los animales del grupo control y estrés prenatal. Existen diferencias significativas entre los machos del grupo control comparado con el grupo estresado prenatalmente. Los resultados se analizaron con una prueba de t-Student $*p<0.0033$ $n=25$ por grupo.

Efectos del estrés prenatal sobre el aprendizaje y la memoria espacial.

Las latencias de llegada a la plataforma disminuyeron progresivamente durante los días de aprendizaje (1-4) en los animales del grupo control, manteniéndose bajas en los días en que se evaluó la memoria de corto (día 6) y de largo plazo (día 13). Los animales estresados prenatalmente presentaron latencias de llegada mayores a las del grupo control en todos los días de la prueba (Figura 13A). Las latencias promedio de llegada a la plataforma en los machos estresados prenatalmente fueron significativamente mayores a las del grupo control (Figura 13B).



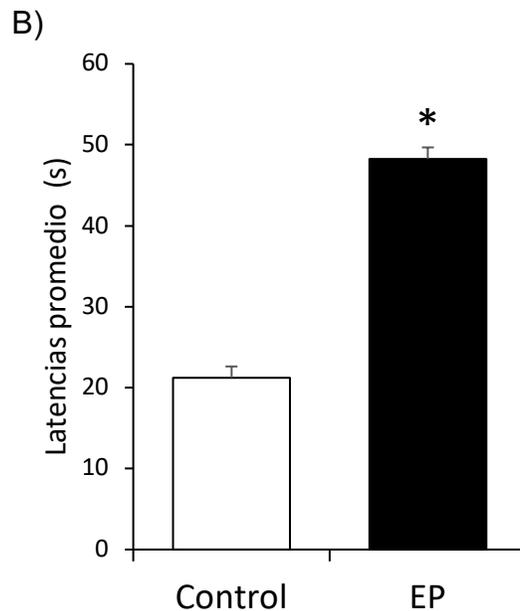
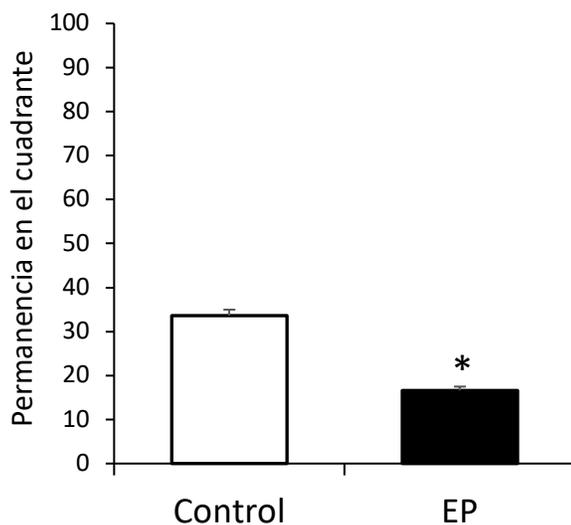


Figura 13. (A) Latencias de llegada en el LAM. Los animales estresados prenatalmente presentaron mayores latencias de llegada, en contraste con los animales del grupo control los cuales tuvieron latencias de llegada progresivamente menores cada día. Las latencias de llegada en los días 1, 2, 3, 4, 6 y 13 de evaluación de la prueba de memoria espacial en los animales de EP fueron estadísticamente diferentes en comparación con el grupo control. Los datos se analizaron con una ANOVA de medidas repetidas $p < 0.007$ seguida de una comparación de medias de Bonferroni Día 1 ($*p < 0.006$), Día 2 ($*p < 0.0001$), Día 3 ($*p < 0.0003$), Día 4 ($*p < 0.0007$), Día 6 ($*p < 0.0002$), Día 13 ($*p < 0.0002$). $n = 12$ por grupo. (B) Latencias de escape promedio en los animales control y estresados prenatalmente. Las latencias fueron mayores en los sujetos de EP respecto al grupo control. Los datos fueron analizados con una t-Student $*p < 0.04$ $n = 50$ por grupo.

Después de las sesiones de aprendizaje (días 1-4) se realizaron las pruebas de memoria de corto y largo plazo en los machos de ambos grupos. En el día 7, la prueba se realizó retirando la plataforma y se evaluó la ubicación y localización espacial dentro de la tina mediante 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 no mayor de 60 segundos dentro de la piscina. En esta prueba se observó que, en comparación con los machos control, los sujetos estresados

prenatalmente permanecieron menos tiempo en el cuadrante donde estuvo antes la plataforma, y presentaron un menor número de cruces. $*p < 0.01$ (Figuras 14A y 14B).

A)



B)

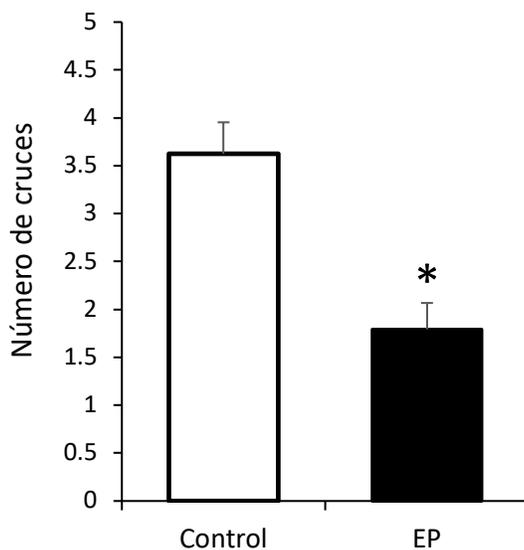
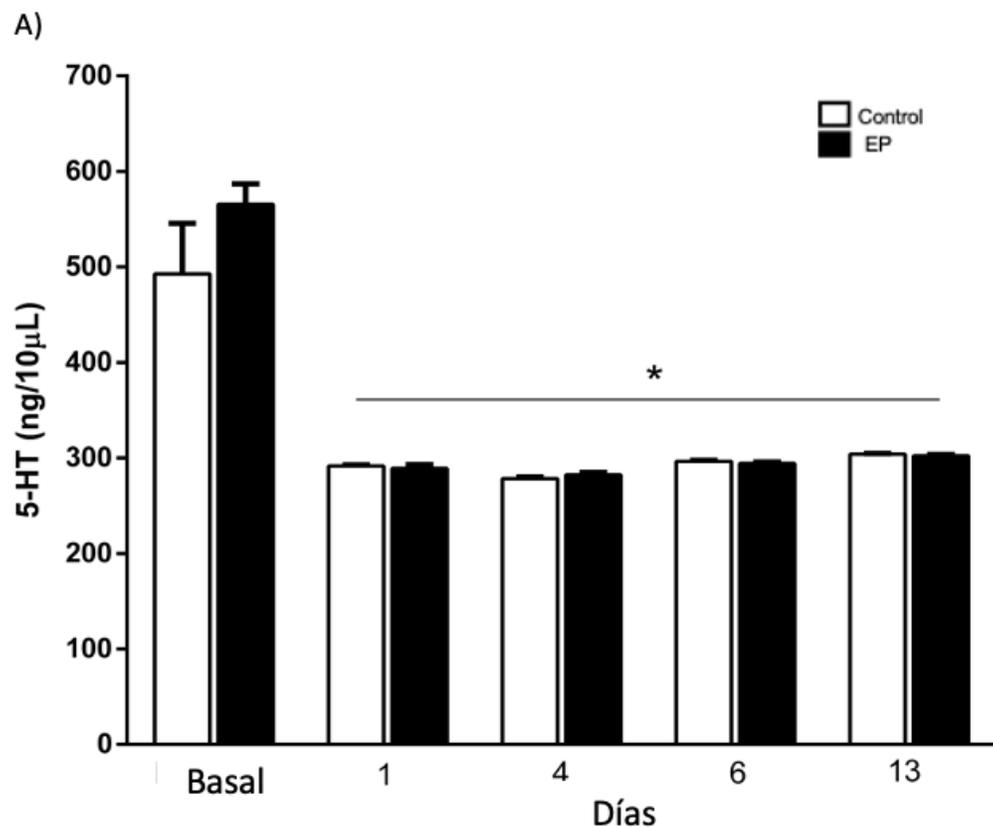


Figura 14. (A) Tiempo de permanencia en el cuadrante en el que se encontraba la plataforma. Los animales EP permanecieron menor tiempo en el cuadrante. Los datos se analizaron con una prueba de Chi cuadrada $*p < 0.0003$. (B) Número de cruces en el cuadrante donde se localizaba la plataforma. Los

sujetos estresados prenatalmente cruzaron un menor número de veces en donde se encontraba anteriormente la plataforma, comparado con los sujetos control. Los resultados se analizaron con una t-Student * $p < 0.0001$.

Contenido tisular de 5-HT y 5HIAA en el hipocampo dorsal

El contenido tisular basal de 5-HT en el hipocampo dorsal fue similar en ambos grupos, control y estrés prenatal y disminuyó de manera similar en ambos grupos durante las pruebas de aprendizaje (días 1-4) y memoria de corto (día 6) y de largo plazo (día 13) (Figura 15A). Con respecto al metabolito de la 5-HT, el 5-HIAA, se observó que durante el aprendizaje y la memoria, las concentraciones del metabolito disminuyeron de manera similar en el hipocampo dorsal de animales control y estresados prenatalmente (Figura 15B).



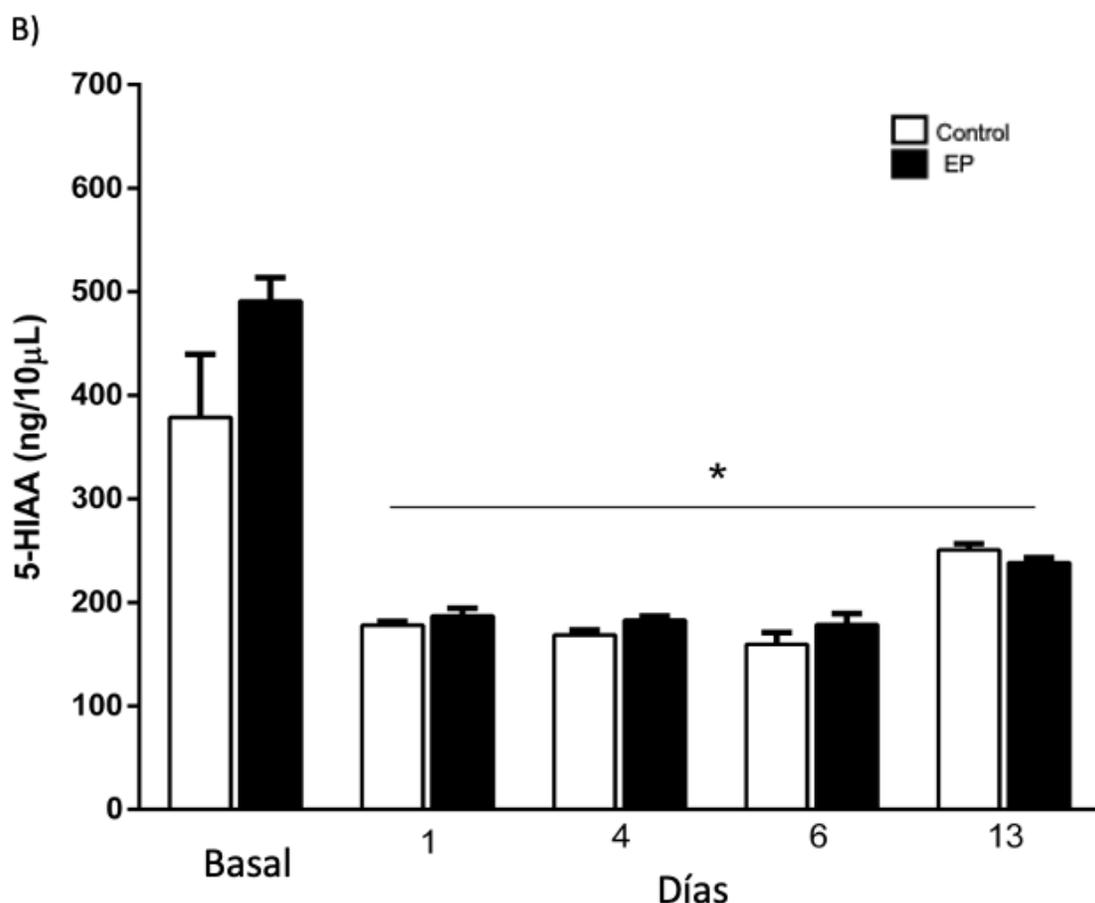


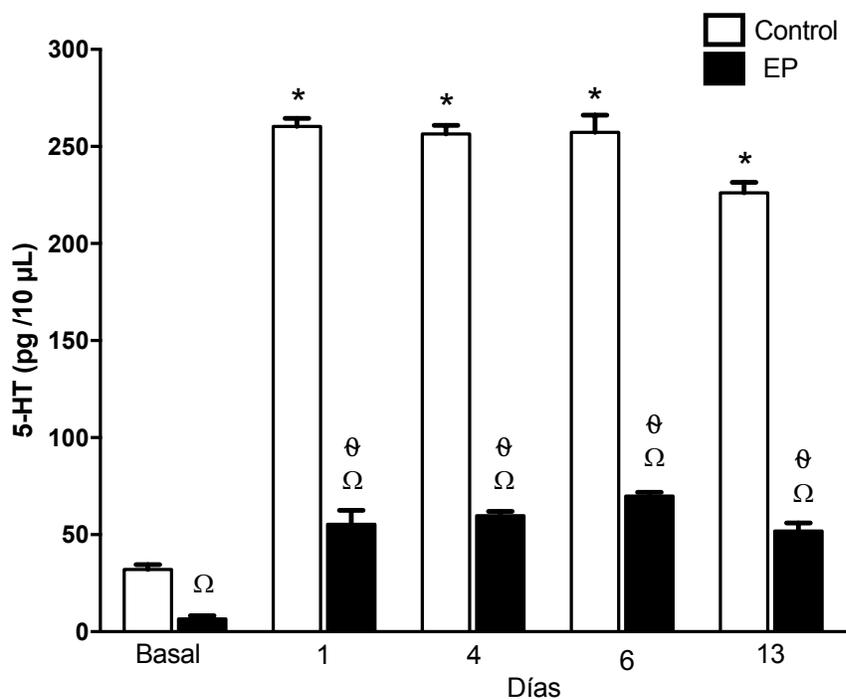
Figura 15. Contenido tisular de 5-HT y 5-HIAA en hipocampo dorsal en animales control y estresados prenatalmente antes y después de la prueba del LAM. (A) Las concentraciones basales de 5-HT fueron similares en ambos grupos y disminuyeron durante las pruebas de aprendizaje (días 1-4) y memoria de corto (día 6) y largo plazo (día 13). $*p < 0.0003$. El análisis de los resultados se realizó con una ANOVA $p < 0.0001$ seguida de un post hoc de Tukey. (B) El contenido tisular basal del metabolito de la 5-HT fue similar en ambos grupos control y estrés prenatal y disminuyó durante los días en que se evaluó el aprendizaje y la memoria, $*p < 0.032$ contrastando las concentraciones basales contra después de las pruebas. Los resultados se analizaron con una ANOVA seguida de un post hoc de Tukey; $n = 6$ por grupo.

Liberación de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo dorsal

La liberación basal de 5-HT fue menor en el hipocampo dorsal de los animales estresados prenatalmente. Durante los días de aprendizaje, la liberación de 5-HT en el hipocampo dorsal de los animales control se incrementó alrededor de 4.5 veces con respecto a su basal. El incremento en la liberación de esta amina se mantuvo elevado

después de las pruebas de memoria de corto y largo plazo. En contraste, la liberación de 5-HT después de las pruebas de aprendizaje y memoria en los animales estresados prenatalmente, si bien se incrementó con respecto a su basal, se mantuvo muy por debajo de lo observado en los animales control (Figura 16A). Con respecto al 5-HIAA, la concentración basal del metabolito fue similar en ambos grupos. Después de las pruebas de aprendizaje (día 1 y 4) y de memoria (días 6 y 13) la concentración del metabolito aumentó en el hipocampo dorsal de las ratas control, pero no hubo cambios en las concentraciones del metabolito en los animales estresados prenatalmente (Figura 16B).

A)



B)

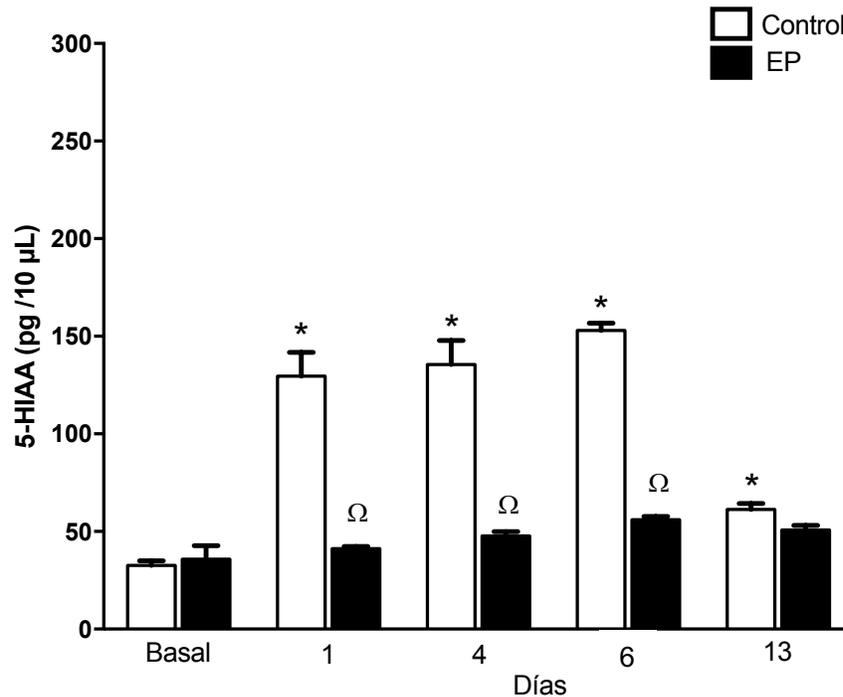


Figura 16. (A) Liberación basal de 5-HT y después de las pruebas de aprendizaje (días 1 y 4) y después de las pruebas de memoria de corto (6) y de largo plazo (13). La liberación de 5-HT en el hipocampo dorsal de las ratas estresadas prenatalmente fue menor que en las ratas control en condiciones basales y durante las pruebas de aprendizaje y memoria. (B) Concentración extracelular de 5-HIAA en condiciones basales y después de las pruebas de aprendizaje y memoria en el hipocampo dorsal de animales control y estresados prenatalmente. Las concentraciones basales fueron similares en ambos grupos, pero después de las pruebas de aprendizaje y memoria, las concentraciones del metabolito se incrementaron sólo en el grupo control. Se utilizó una ANOVA de dos vías. * $p = 0.005$ comparado con el control basal; $\Omega p = 0.046$ comparado con el control de cada día; $\Theta p = 0.001$ comparado con el control basal. Grupo control: $n = 6$ por grupo; Grupo de estrés prenatal: $n = 6$ por grupo.

El aumento en la liberación de serotonina durante el aprendizaje (día 4) correlacionó negativamente con las bajas latencias de llegada en los animales control en el LAM ($r = -0.9789$, $p = 0.001$). En el caso de los animales estresados prenatalmente, se observó una correlación negativa entre las elevadas latencias de llegada al LAM durante el aprendizaje contra la baja liberación de serotonina ($r = -0.8940$, $p = 0.01$).

Contenido de SERT en el hipocampo dorsal

El contenido basal del transportador de serotonina en el grupo estresado prenatalmente es significativamente mayor en comparación con su grupo control. Sin embargo, durante las pruebas cognitivas, no se observaron cambios significativos en el contenido del SERT, en ninguno de los dos grupos (Figura 17).

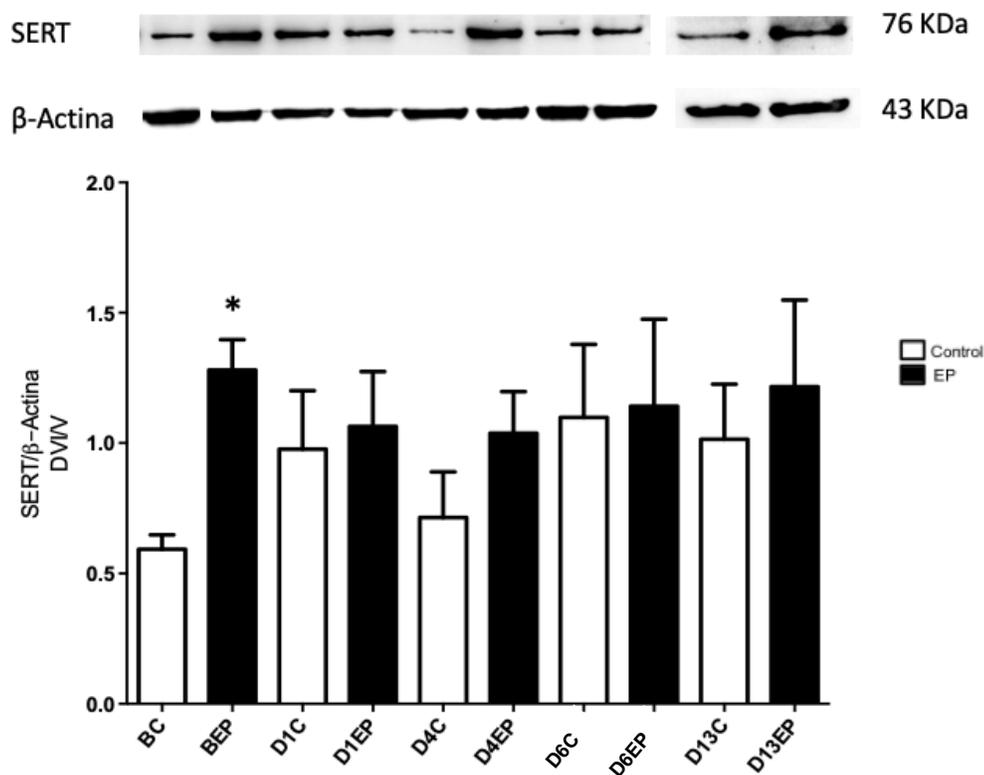


Figura 17. Contenido del transportador de serotonina (SERT) en el hipocampo dorsal en animales control y estresados prenatalmente. El contenido de SERT en el hipocampo dorsal de los animales estresados prenatalmente en condiciones basales fue mayor, comparado con los animales control. Después de las pruebas de aprendizaje y memoria, el contenido de SERT no mostró diferencias entre los grupos. $n=5$, cada día de cada grupo. Los datos se analizaron con una ANOVA seguida de la prueba post hoc de Tukey. * $p<0.05$ comparados con el control. $n= 3$ por grupo.

Contenido tisular de NA en el hipocampo dorsal

En el caso del contenido de NA basal en el hipocampo dorsal, éste fue significativamente menor en los animales estresados prenatalmente en comparación con los animales control. Durante las pruebas de aprendizaje (días 1 y 4) y de memoria de corto (día 6) y de largo plazo (día 13), el contenido de NA disminuyó significativamente en los machos control, con respecto a su nivel basal. En cambio, en los animales estresados prenatalmente, en los cuales el contenido basal fue bajo, no se observaron cambios durante el aprendizaje ni durante los días en que se evaluó la memoria de corto y largo plazo (Figura 18).

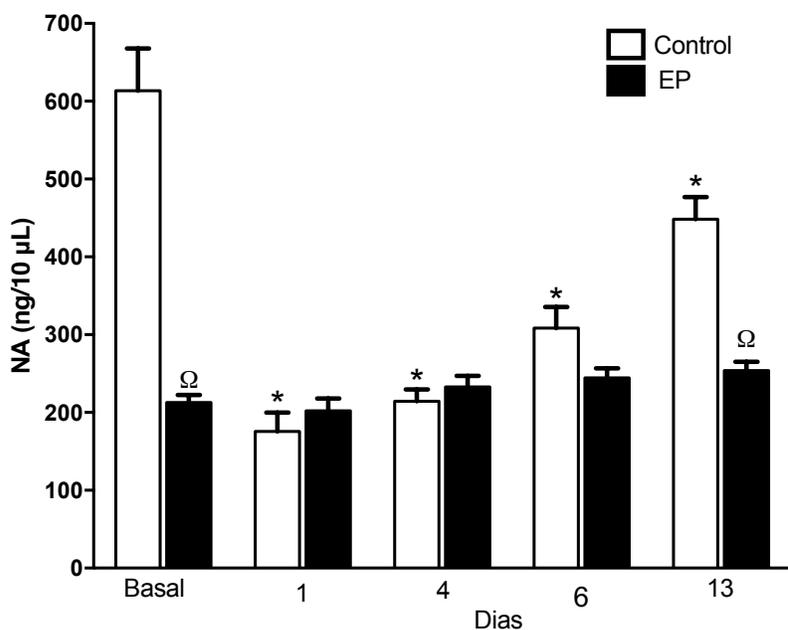


Figura 18. Contenido tisular de NA en hipocampo dorsal en animales control y estresados prenatalmente. El contenido tisular basal de NA en los machos estresados prenatalmente fue menor que en el control en condiciones basales y en el día 13 (memoria de largo plazo), el contenido de NA

se incrementó en el grupo control. El contenido de NA no se modificó en los animales estresados prenatalmente a lo largo de las pruebas de aprendizaje y memoria. Se utilizó una ANOVA de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey. * $p = 0.003$ comparado con el control basal; $\Omega p = 0.003$, comparado con el control de cada día. $n=6$ por grupo.

Liberación de NA en el hipocampo dorsal

En relación a la NA, la liberación basal de esta catecolamina en el hipocampo dorsal fue menor en los animales estresados prenatalmente en comparación con los controles. Después de las pruebas de aprendizaje y memoria, la NA se incrementó significativamente con respecto a su basal en los controles. Sin embargo, en los animales estresados prenatalmente no hubo cambios en la liberación de NA ni durante el aprendizaje ni la memoria con respecto a su basal (Figura 19).

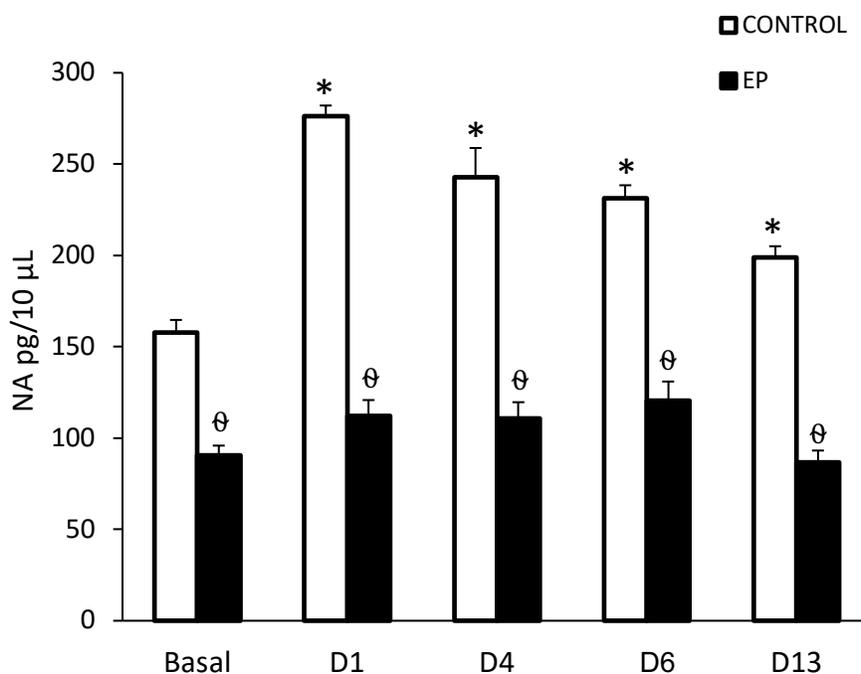


Figura 19. Liberación basal de NA en el hipocampo dorsal y después de la prueba de LAM. La liberación de NA fue menor en el grupo estresado prenatalmente, tanto en condiciones basales como después de las pruebas de aprendizaje (días 1 y 4) y memoria (días 6 y 13). La liberación de NA en las ratas estresadas prenatalmente no se modificó con las pruebas de memoria espacial. Se utilizó una ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de Tukey. * $p = 0.019$ comparado con el control basal; $\theta p = 0.006$ comparado con el control de cada día. Grupo control: $n = 6$ por grupo. Grupo estrés prenatal: $n = 6$ por grupo.

La elevada liberación de NA en el grupo control correlacionó negativamente con las bajas latencias de llegada en la memoria de largo plazo ($r = -0.9121$, $p = 0.01$). Por el contrario, las altas latencias de llegada en los animales estresados prenatalmente en el LAM correlacionaron negativamente con la baja liberación de NA ($r = -0.9361$, $p = 0.01$). De manera similar a la serotonina, las elevadas concentraciones de corticosterona correlacionaron negativamente con la baja liberación de NA, tanto en los días de aprendizaje ($r = -0.9961$, $p = 0.001$) como en la memoria de largo plazo ($r = -0.9999$, $p = 0.001$).

Concentraciones séricas de corticosterona

Las concentraciones séricas basales de corticosterona en los animales estresados prenatalmente fueron significativamente mayores que las de los animales control. Los niveles de corticosterona después de las pruebas de aprendizaje y memoria en el LAM se incrementaron significativamente en ambos grupos, siendo más altos en los animales estresados prenatalmente. Los incrementos en la corticosterona fueron menores en cada día de la prueba (Figura 20).

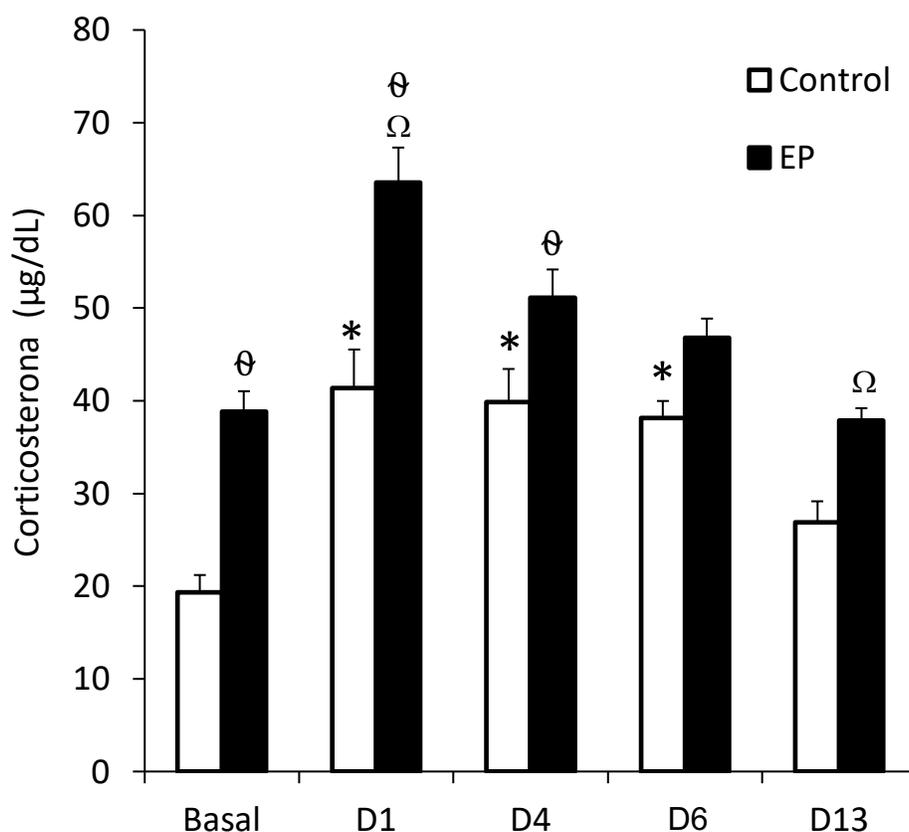


Figura 20. Concentraciones séricas de corticosterona en la descendencia masculina control y estresada prenatalmente. Las concentraciones de corticosterona en condiciones basales y después de las pruebas de aprendizaje y memoria fueron mayores en los animales estresado prenatalmente. Se utilizó una ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey. *p = 0.003 comparado con el control basal; ^θp=0.002 con respecto al control de cada día; ^Ωp = 0.001, comparado con el basal de estrés prenatal; grupos control y estrés prenatal: n = 6 por grupo

Las altas concentraciones de corticosterona observadas en los animales estresados prenatalmente mostraron una correlación positiva con las elevadas latencias de llegada en el LAM ($r= 0.9754$, $p=0.001$).

Además, la baja liberación basal de serotonina correlacionó negativamente con la elevada concentración de corticosterona basal en los animales estresados prenatalmente ($r= -0.9884$, $p=0.001$). De manera similar, el incremento en la corticosterona durante el aprendizaje y la memoria en el LAM correlacionó

negativamente con la menor liberación de serotonina en los animales estresados prenatalmente ($r = -0.7576$, $p=0.05$; $r = -0.9487$, $p=0.001$, respectivamente).

DISCUSIÓN

El estrés prenatal altera los procesos cognitivos en la descendencia. Dichas alteraciones se han relacionado principalmente con la programación fetal debido a los corticosteroides maternos durante la respuesta de estrés afectando así el desarrollo fetal y causando efectos de largo plazo. Los resultados de este trabajo, muestran que las deficiencias cognitivas en los animales estresados prenatalmente están relacionadas con alteraciones en el contenido y liberación de 5-HT y NA y estos efectos están asociados a los niveles elevados de corticosterona en la descendencia.

Peso corporal de hembras gestantes

La menor ganancia de peso corporal observadas en las hembras gestantes sujetas a estrés puede deberse al aumento en la liberación de CRH hipotalámica, la cual controla la actividad del eje adrenal durante la respuesta de estrés, pero también tiene efectos anorexigénicos, disminuyendo así la ingesta de alimento en las hembras gestantes estresadas (Carr, 2002; González-Jiménez y Río-Valle, 2012). La CRH que proviene del núcleo paraventricular puede mediar los efectos de la leptina, la cual se incrementa por efecto del estrés (Konishi et al., 2006) y junto con la insulina, reducen la ingesta de alimento (González-Jiménez y Río-Valle, 2012).

Peso corporal de la descendencia

El bajo peso de la descendencia estresada prenatalmente al nacimiento podría deberse a los glucocorticoides maternos liberados durante el estrés, ya que en estudios donde se administró dexametasona durante el último tercio de la gestación y el peso neonatal se redujo (Welberg et al., 2001). El bajo peso al nacimiento observado en este presente trabajo difiere de lo observado en otros estudios (Abe et al, 2007; Zohar y Weinstock, 2011; Amugongo y Hlusko, 2014), en los que no se encontraron cambios en el peso neonatal de la descendencia. Estas diferencias podrían deberse al tipo de estresor utilizado en los estudios; en esos estudios utilizaron estresores tales como la inmovilización, el cuál es un estresor de intensidad mediana, a diferencia del estresor utilizado en este trabajo que es la inmersión en agua fría, el cual estimula de manera más intensa al eje adrenal (Retana-Márquez et al, 2003a).

El desarrollo fetal depende de un adecuado intercambio de nutrientes, el cual es regulado por la placenta (Knipp et al., 1999; O`Donnell et al., 2009). El estrés prenatal causa disminución en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT3 y GLUT4 placentarios (Mairesse et al., 2007). El incremento en la concentración de glucocorticoides impide el desarrollo placentario adecuado, disminuye la glucosa fetal en el plasma, alterando el desarrollo de los órganos fetales (Bloom et al., 2001; Fowden et al., 2006). El estrés prenatal por inmersión en agua fría genera una alta concentración de glucocorticoides maternos, lo que puede disminuir la expresión de la 11 β -HSD2, lo que permite que elevadas concentraciones de corticosterona pasen al feto (Mairesse et al., 2007), además de afectar el transporte de nutrientes a través de la placenta, causando así bajo peso al nacimiento.

Aprendizaje y memoria

Con respecto al aprendizaje y la memoria en la descendencia, en este trabajo se observó y confirmó que el estrés prenatal tiene efectos nocivos sobre estas conductas, mostrados por latencias de llegada mayores tanto en los días de aprendizaje (D1-4) como en los días de memoria de corto (D6) y largo plazo (D13). Estos resultados son consistentes con otros estudios en los que las latencias de llegada son mayores en los animales estresados prenatalmente (Modir et al., 2014; Szuran et al., 2000; Weinstock, 2008). Otros estudios, sin embargo, han reportado menores latencias de llegada en el LAM (Aleksandrov et al., 2001; Zuená et al, 2008) o incluso no observaron diferencias en el desempeño durante el aprendizaje espacial (Hayashi et al, 1998; Kapoor et al, 2009; Szuran et al, 2000). Las diferencias en los resultados reportados por otros autores también pueden explicarse por el diseño de la prueba de laberinto acuático de Morris, ya que en este trabajo se evaluó tanto el aprendizaje como la memoria de corto y largo plazo.

En las hembras gestantes, la inmersión en agua fría induce concentraciones elevadas de la corticosterona materna (Guerrero et al, 2016; García-Vargas et al, 2019). Las altas concentraciones de corticosterona materna causan degeneración neuronal en las neuronas del hipocampo (Souza et al, 2000) y causa pérdida de neuronas hipocámpales (Zhu et al, 2004), afectan el desarrollo del hipocampo, así como la neurogénesis en el cerebro adulto, tanto en machos como en hembras (Guerrero et al, 2016), además de retracción y atrofia de las dendritas de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (Conrad, 2006; Hosseini-Sharifabad y Hadinedoushan, 2007; Hajszan et al, 2009), lo que se refleja como deficiencias cognitivas en la etapa

adulto (Luine et al, 1994; Sunanda et al, 2000). Asimismo, la potenciación de largo plazo disminuye desde la etapa prenatal y se mantiene hasta la edad adulta (Gi et al., 2006). Además, el déficit en el aprendizaje en las ratas adultas, estresadas prenatalmente, se explica también por la menor plasticidad en el hipocampo, la cual correlaciona con la menor memoria espacial (Milner et al., 1998).

Contenido y liberación de Serotonina

Además de las deficiencias cognitivas observadas, los resultados de este trabajo, muestran que el estrés prenatal también altera los niveles de 5-HT y NA durante el proceso cognitivo. El contenido basal de 5-HT y de su metabolito, el 5-HIAA, en el hipocampo dorsal fueron similares en el grupo control y en el grupo de estrés prenatal. Estos resultados difieren de otros estudios en los cuales las ratas estresadas prenatalmente muestran menor contenido de 5-HT en comparación con los animales control (Hayashi et al, 1998; Soares-Cunha et al, 2018). Estos resultados podrían explicarse por diferencias en el tipo de estresor utilizado (hacinamiento e inyección de solución salina, estrés crónico leve impredecible en esos estudios, contra inmersión en agua fría en este estudio), activando al eje adrenal de manera distinta, ocasionando diferencias en la activación del eje adrenal, 60 ng/mL por estrés crónico leve impredecible (Soares-Cunha et al, 2018), contra 600 ng/mL utilizando la inmersión en agua fría durante la fase oscura del ciclo de luz-oscuridad. También es importante considerar la edad de la descendencia a la cual se evalúa la 5-HT; en aquellos estudios se evaluó a las tres semanas (Hayashi et al, 1998) o dos meses (Soares-Cunha et al,

2018) y tres meses en este estudio; es posible que la tasa de recambio de la 5-HT se modifique con la edad, pero esto debe evaluarse en futuros estudios.

Los resultados de este estudio concuerdan con otros en los cuales la administración prenatal de dexametasona no modificó el contenido de 5-HT con respecto a los animales control de tres meses de edad (Muneoka et al, 1997), a pesar de que, en ese estudio se evaluó la 5-HT y su metabolito en el hipocampo completo y no en el hipocampo dorsal, el cual está relacionado con los procesos cognitivos (Bannerman et al, 2004; Tanti y Belzung 2013; Lee y Kessner, 2003; Eichenbaum, 2000). Esta evidencia apoya la idea de que los elevados niveles de glucocorticoides durante la gestación pueden influenciar directamente el desarrollo de los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico (Muneoka et al, 1997). A pesar de las similitudes en el contenido basal de 5-HT y 5-HIAA en ambos grupos (Figura 15), la liberación basal en las ratas estresadas prenatalmente fue significativamente menor que en los machos control (Figura 16). Además, la concentración extracelular de 5-HIAA fue mayor en los animales estresados prenatalmente que en los animales control, lo que indica que la 5-HT es metabolizada en mayor grado en los animales estresados prenatalmente. La disminución del contenido de 5-HT y de su metabolito en los homogenados de hipocampo, tanto en los animales control como en los estresados prenatalmente, después de las pruebas cognitivas, sugiere la liberación de la 5-HT. Sin embargo, debido a que el contenido de 5-HT se evaluó en el hipocampo dorsal completo, lo que incluye los valores intra y extracelulares de 5-HT, no es posible determinar si la disminución de 5-HT después del aprendizaje y la memoria se deba a una mayor liberación o bien a una menor síntesis o mayor recaptura del neurotransmisor. Sin

embargo, los datos de la microdialisis muestran que después de las pruebas de aprendizaje y memoria de corto y largo plazo, la liberación de 5-HT y la concentración de su metabolito se incrementaron, pero en mayor medida en las ratas control en comparación con las ratas estresadas prenatalmente. Dado que el contenido tisular fue similar en ambos grupos, es probable que las neuronas de los animales estresados prenatalmente estén sintetizando la 5-HT, pero son menos eficientes en liberarlo, lo que sugiere posibles defectos en la actividad electroencefalográfica o en el empaquetamiento de la 5-HT en las vesículas sinápticas. La baja concentración extracelular de 5-HT en condiciones basales, en los animales estresados prenatalmente, coincide con el alto contenido del transportador de 5-HT, lo que explicaría su menor concentración. Esto coincide con lo reportado en ratas (Belay et al, 2011) y ratones (Bielas et al, 2014). Sin embargo, después de las pruebas cognitivas, el contenido del transportador no difiere entre los animales control y los estresados prenatalmente, por lo que las diferencias en la liberación de 5-HT podrían deberse a otros factores, como son las deficiencias en la actividad electroencefalográfica o fallas en el empaquetamiento. Las bajas concentraciones del metabolito en los dializados de los machos estresados prenatalmente, sugiere que la enzima que metaboliza a la 5-HT podría estar en bajas cantidades o estar disminuida su actividad. Los datos obtenidos apoyan la idea de que la liberación de 5-HT en el hipocampo dorsal es importante para el proceso de aprendizaje y memoria espacial y que las deficiencias en el desempeño cognitivo espacial observadas en los animales estresados prenatalmente están relacionadas con la baja liberación de 5-HT, como lo muestran las pruebas de correlación. Estos resultados son consistentes con lo

reportado en otros estudios, en los cuales la liberación de 5-HT inducida farmacológicamente favorece la memoria espacial (Gikmann-Johnston et al, 2015), mientras que la disminución de la liberación de 5-HT mediante la administración de paraclorofenilalanina (PCPA), la cual inhibe a la enzima triptófano hidroxilasa y por lo tanto reduce la síntesis y la liberación de 5-HT, causa déficit en la memoria (du Jardin et al, 2014; Kuypers y Ramaekers, 2005). Diversos agonistas selectivos del receptor 5-HT_{1A} modulan la neurotransmisión de 5-HT e inducen cambios en el aprendizaje espacial (Glikmann-Johnston et al., 2015). La administración de flesinoxan, un agonista selectivo del receptor 5-HT_{1A} revierte los efectos causados por el PCPA, mejorando el déficit de la memoria espacial. Esta evidencia farmacológica corrobora que la 5-HT favorece un mejor desempeño en las tareas de aprendizaje y memoria espacial.

Transportador de 5-HT

El SERT recaptura la 5-HT hacia la neurona presináptica, constituyendo un mecanismo de inactivación del neurotransmisor. La inhibición de SERT in vivo aumenta la concentración de 5-HT en la hendidura sináptica (Bielas et al., 2014; Huang et al., 2012). En este trabajo se observó que el contenido basal del SERT fue mayor en los animales estresados prenatalmente que en los machos control, lo que explica la baja concentración extracelular de 5-HT en condiciones basales en los animales estresados prenatalmente. Sin embargo, durante las pruebas cognitivas no se observaron cambios en el contenido del SERT, ni en los animales control ni en los estresados prenatalmente, lo que muestra que la recaptura de 5-HT durante los procesos

cognitivos es similar en ambos grupos. Estos resultados difieren de lo reportado en ratones, en los cuales el estrés prenatal indujo disminución del SERT (Mueller y Bale, 2008). Sin embargo, la exposición prenatal a la dexametasona aumenta la expresión del SERT en la descendencia adulta (Slotkin et al., 2006), lo cual coincide con el aumento del contenido de esta proteína por efecto del estrés prenatal, sólo en condiciones basales.

Contenido y liberación de Noradrenalina

Con respecto a la NA basal, el contenido de este neurotransmisor en el hipocampo dorsal de los machos estresados prenatalmente fue menor a los observado en los machos control (Figura 18). Estos resultados son similares a los obtenidos en ratas a cuyas madres se les administró dexametasona durante la gestación, presentando bajos niveles de NA en el hipocampo (Muneoka et al, 1997). Esto fortalece la idea de que los altos niveles de corticosterona materna durante el estrés (Guerrero et al, 2016; García-Vargas et al, 2019) pueden causar alteraciones en las neuronas noradrenérgicas del hipocampo fetal, dando lugar a déficits cognitivos en la edad adulta (Muneoka et al, 1997).

El bajo contenido basal de NA presente en el hipocampo dorsal de las ratas estresadas prenatalmente, así como durante el aprendizaje y la memoria espacial, se relacionó con la baja liberación de NA en esa estructura, como lo muestran los datos de la microdiálisis (Figuras 18 y 19). El incremento en el contenido de NA en el día 13, aunada con la elevada liberación en los machos control, podría facilitar la potenciación de largo plazo (LTP), modulando la plasticidad sináptica (Palacios-Filardo y Mellor,

2019), así como la recuperación de la memoria (Murchinson et al, 2004), a través de señalización mediada por el receptor $\beta 1$ (Shimanski et al, 2007; Grigoryan y Segal, 2016). La NA incrementa la fosforilación de los receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA por la PKA, modulando así la LTP (Palacios-Filardo y Mellor, 2019). En este estudio, la liberación de NA en el hipocampo de los animales estresados prenatalmente correlacionó negativamente con la corticosterona durante el proceso de aprendizaje y memoria. La correlación positiva entre la liberación de NA y las latencias de escape durante las pruebas de aprendizaje y memoria indica que, además de la 5-HT, la liberación de NA también es importante para estos procesos. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que muestra que las deficiencias cognitivo-espaciales generadas por el estrés prenatal están relacionadas directamente con disminución de la liberación de 5-HT y NA.

Corticosterona

Con respecto a la corticosterona, los resultados de este estudio muestran en los machos estresados prenatalmente, una elevada concentración basal de esta hormona, además de una mayor respuesta del eje adrenal, en comparación con los animales control, durante las pruebas conductuales realizadas en el LAM. Esto indica que la corticosterona puede contribuir a las alteraciones observadas en los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico del hipocampo dorsal. Esto puede deberse a que los MR, que están involucrados en la regulación de la concentración basal de glucocorticoides, pueden impedir el restablecimiento de la corticosterna cuando están alterados (Kloet et al, 2016; Seckl, 2007; Lupien et al, 2009), así como los GR, que

están relacionados con la atenuación de la respuesta de estrés (Groeneweg et al, 2012) y que están presentes en el hipocampo, podrían interferir en la adquisición de la información, reflejándose en un bajo desempeño cognitivo (Ishiwata et al, 2005; Guerreiro et al, 2016). La alteración de los MR, puede provocar desregulación de los niveles basales de corticosterona (Lupien et al., 2009; Seckl, 2007), lo que da como consecuencia que el eje adrenal sea hiperactivo. La disminución de la densidad o contenido de los GR (Kapoor et al., 2008; Noorlander et al., 2006) genera que el eje adrenal sea hiperreactivo. Las concentraciones séricas de corticosterona evaluadas después de ser sometidos al LAM aumentaron significativamente en el grupo estresado prenatalmente en mayor medida que en los animales control. Es probable que las altas concentraciones de este esteroide interfieran con la liberación de 5-HT y NA, y que esto se refleje en el bajo desempeño durante las tareas cognitivas. En el grupo control las latencias de llegada son menores al final de las tareas de navegación espacial y esto se asocia con la disminución en los niveles de corticosterona en el grupo control durante la memoria de largo plazo.

CONCLUSIONES

Las deficiencias mostradas por los machos estresados prenatalmente durante el aprendizaje, la memoria de corto y de largo plazo se deben, en parte, a la disminución de la liberación de 5-HT y NA en el hipocampo dorsal. La elevada respuesta del eje adrenal durante el desempeño en el LAM también contribuye al déficit cognitivo que causa el estrés prenatal. El SERT no parece estar relacionado con las alteraciones en el desempeño cognitivo de los animales control o estresados prenatalmente.

REFERENCIAS

- Abe, H., Hidaka, N., Kawagoe, C., Odagiri, K., Watanabe, Y., Ikeda, T., Ishizuka, Y., Hashiguchi, H., Takeda, R., Nishimori, T., & Ishida, Y. (2007). Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience Research*, 59(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2007.06.1465>
- Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurologia*. <https://doi.org/10.33588/rn.3204.2000154>
- Akatsu, S., Ishikawa, C., Takemura, K., Ohtani, A., & Shiga, T. (2015). Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice. *Neuroscience Research*, 101, 15–23. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2015.07.002>
- Aleksandrov, A. A., Polyakova, O. N., & Batuev, A. S. (2001). The Effects of Prenatal Stress on Learning in Rats in a Morris Maze. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 31(1), 71–74. <https://doi.org/10.1023/A:1026682415860>
- Amugongo, S. K., & Hlusko, L. J. (2014). Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. *Aging and Disease*, 5(1), 1–16. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.05001>
- Andreis, P., Neri, G., Mazzocchi, G., F. M.-, & 1992, undefined. (1992). Direct secretagogue effect of corticotropin-releasing factor on the rat adrenal cortex: the involvement of the zona medullaris. *Academic.Oup.Com*. <https://academic.oup.com/endo/article-abstract/131/1/69/2495984>
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N. P., McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H. J., & Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 28, Issue 3, pp. 273–283). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.004>
- Barbazanges, A., Piazza, P. V., le Moal, M., & Maccari, S. (1996). Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *Journal of Neuroscience*, 16(12), 3943–3949. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-12-03943.1996>
- Barker, D. J. P. (1998). In utero programming of chronic disease. In *Clinical Science* (Vol. 95, Issue 2, pp. 115–128). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/cs0950115>

- Bayer S. A, Altman, J., Russo, R. J., & Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. Elsevier Academic Press, 14(1).
- Bayer Shirley A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *The Journal of Comparative Neurology*, 190(1), 115–134. <https://doi.org/10.1002/cne.901900108>
- Bear, MF., & Malenka, RC. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology* Elsevier, 4(3), 389–399. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0959438894901015>
- Belay, H., Burton, C. L., Lovic, V., Meaney, M. J., Sokolowski, M., & Fleming, A. S. (2011). Early Adversity and Serotonin Transporter Genotype Interact With Hippocampal Glucocorticoid Receptor mRNA Expression, Corticosterone, and Behavior in Adult Male Rats. *Behavioral Neuroscience*, 125(2), 150–160. <https://doi.org/10.1037/a0022891>
- Benešová, O., & Pavlík, A. (1989). Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain. *Neuropharmacology*, 28(1), 89–97. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(89\)90073-7](https://doi.org/10.1016/0028-3908(89)90073-7)
- Beversdorf, D. Q., Manning, S. E., Hillier, A., Anderson, S. L., Nordgren, R. E., Walters, S. E., Nagaraja, H. N., Cooley, W. C., Gaelic, S. E., & Bauman, M. L. (2005). Timing of prenatal stressors and autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 35(4), 471–478. <https://doi.org/10.1007/s10803-005-5037-8>
- Bielas, H., Arck, P., Bruenahl, C. A., Walitza, S., & Grünblatt, E. (2014). Prenatal stress increases the striatal and hippocampal expression of correlating c-FOS and serotonin transporters in murine offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 38, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.07.006>
- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Bloom, S. L., Sheffield, J. S., Mcintire, D. D., & Leveno, K. J. (2001). Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstetrics and Gynecology*, 97(4), 485–490. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(00\)01206-0](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(00)01206-0)

- Bock, J., Wainstock, T., Braun, K., & M Segal. (2015). Stress in utero: prenatal programming of brain plasticity and cognition. *Biological Psychiatry*, 78(5), 315–326. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322315001626>
- Brunson, K. L., Chen, Y., Avishai-Eliner, S., & Baram, T. Z. (2003). Stress and the developing hippocampus: A double-edged sword? In *Molecular Neurobiology* (Vol. 27, Issue 2, pp. 121–136). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/MN:27:2:121>
- Carr, J. A. (2002). Stress, Neuropeptides, and Feeding Behavior: A Comparative Perspective. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 582–590. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.582>
- Carter, A. M. (1989). Factors affecting gas transfer across the placenta and the oxygen supply to the fetus. In *Journal of Developmental Physiology* (Vol. 12, Issue 6, pp. 305–322). <https://europepmc.org/article/med/2701106>
- Cassaday, H. J., Norman, C., Shilliam, C. S., Vincent, C., & Marsden, C. A. (2003). Intraventricular 5,7-dihydroxytryptamine lesions disrupt acquisition of working memory task rules but not performance once learned. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(1), 147–156. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(02\)00346-9](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(02)00346-9)
- Charil, A., Laplante, D. P., Vaillancourt, C., & King, S. (2010). Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews*, 65(1), 56–79. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2010.06.002>
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol*, 5(2), 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
- Conrad, C. D. (2006). What Is the Functional Significance of Chronic Stress-Induced CA3 Dendritic Retraction Within the Hippocampus? *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 5(1), 41–60. <https://doi.org/10.1177/1534582306289043>
- Cramer, S., Beveridge, M., Kilberg, M., & Novak, D. (2002). Physiological importance of system A-mediated amino acid transport to rat fetal development. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(1), C153–C160. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2002.282.1.C153>
- Dahlin, E., Andersson, M., Thorén, A., Hanse, E., & Seth, H. (2019). Effects of physical exercise and stress on hippocampal CA1 and dentate gyrus synaptic transmission

and long-term potentiation in adolescent and adult Wistar rats. *Neuroscience*, 408, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.046>

- de Catanzaro, D., & Macniven, E. (1992). Psychogenic pregnancy disruptions in mammals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16(1), 43–53. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80050-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80050-8)
- de Kloet, E. R., Karst, H., & Joëls, M. (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: Quick-and-slow. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 29, Issue 2, pp. 268–272). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.10.002>
- de Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease*. *Endocrine Reviews*, 19(3), 269–301. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0331>
- de Weerth, C., Zijl, R. H., & Buitelaar, J. K. (2003). Development of cortisol circadian rhythm in infancy. *Early Human Development*, 73(1–2), 39–52. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(03\)00074-4](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(03)00074-4)
- du Jardin, K. G., Jensen, J. B., Sanchez, C., & Pehrson, A. L. (2014). 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-HT₃ receptor antagonism. *European Neuropsychopharmacology*, 24(1), 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.07.001>
- Durán, F. R. (2011). El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. <https://148.226.24.32/handle/123456789/28908>
- Eichenbaum, H. (2000). A cortical–hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(1), 41–50. <https://doi.org/10.1038/35036213>
- Feldman, R., Meyer, J., Quenzer, L., & Cooper, J. (1997). Principles of neuropsychopharmacology. [https://www.cell.com/trends/neurosciences/pdf/S0166-2236\(97\)85575-0.pdf](https://www.cell.com/trends/neurosciences/pdf/S0166-2236(97)85575-0.pdf)
- Fowden, A. L., Ward, J. W., Wooding, F. P. B., Forhead, A. J., & Constancia, M. (2006). Programming placental nutrient transport capacity. *The Journal of Physiology*, 572(1), 5–15. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.104141>
- Freund, T. F. (1992). GABAergic septal and serotonergic median raphe afferents preferentially innervate inhibitory interneurons in the hippocampus and dentate gyrus. *Epilepsy Research. Supplement*, 7, 79–91. <https://europepmc.org/article/med/1361333>

- Gabrieli, J. D. (1998). Cognitive neuroscience of human memory. *Annual Review of Psychology*, 49, 87–115. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.49.1.87>
- García-Vargas, D., Juárez-Rojas, L., Rojas Maya, S., & Retana-Márquez, S. (2019). Prenatal stress decreases sperm quality, mature follicles and fertility in rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 65(3), 223–235. <https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1567870>
- Gi, H. S., Geum, D., Chung, S., Eun, J. K., Jo, J. H., Kim, C. M., Kun, H. L., Kim, H., Choi, S., Hyun, T. K., Lee, C. J., & Kim, K. (2006). Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 26(12), 3309–3318. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3850-05.2006>
- Gjerstad, J. K., Lightman, S. L., & Spiga, F. (2018). Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. In *Stress* (Vol. 21, Issue 5, pp. 403–416). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1470238>
- Glikmann-Johnston, Y., Saling, M. M., Reutens, D. C., & Stout, J. C. (2015). Hippocampal 5-HT1A receptor and spatial learning and memory. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 289. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00289>
- Glynn, L. M., Schetter, C. D., Wadhwa, P. D., & Sandman, C. A. (2004). Pregnancy affects appraisal of negative life events. *Journal of Psychosomatic Research*, 56(1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(03\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(03)00133-8)
- Glynn, L. M., Wadhwa, P. D., Dunkel-Schetter, C., Chicz-DeMet, A., & Sandman, C. A. (2001). When stress happens matters: Effects of earthquake timing on stress responsivity in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 184(4), 637–642. <https://doi.org/10.1067/mob.2001.111066>
- Gómez Ordóñez, S., María Gutiérrez Álvarez, Á., & Valenzuela Plata, E. L. (2007). Corticoids: 60 Years Later a Pending Subject. In *redalyc.org*. <https://www.redalyc.org/pdf/562/56250306.pdf>
- González-Jiménez, E., & Schmidt Río-Valle, J. (2012). Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético: factores y mecanismos implicados. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1850–1859. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6099>
- Gould, E., Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1991). Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(3), 479–485. <https://doi.org/10.1002/cne.903130308>

- Gray, J. D., Kogan, J. F., Marrocco, J., & McEwen, B. S. (2017). Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 13, Issue 11, pp. 661–673). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.97>
- Griffin, A. L., Eichenbaum, H., & Hasselmo, M. E. (2007). Spatial Representations of Hippocampal CA1 Neurons Are Modulated by Behavioral Context in a Hippocampus-Dependent Memory Task. *Journal of Neuroscience*, 27(9), 2416–2423. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4083-06.2007>
- Grigoryan, G., & Segal, M. (2013). Prenatal stress alters noradrenergic modulation of LTP in hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 110(2), 279–285. <https://doi.org/10.1152/jn.00834.2012>
- Grigoryan, G., & Segal, M. (2016). Lasting Differential Effects on Plasticity Induced by Prenatal Stress in Dorsal and Ventral Hippocampus. *Neural Plasticity*, 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/2540462>
- Grizenko, N., Shayan, Y. R., Polotskaia, A., Ter-Stepanian, M., & Joober, R. (2008). Relation of maternal stress during pregnancy to symptom severity and response to treatment in children with ADHD. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 33(1), 10–16.
- Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., & Joëls, M. (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 350, Issue 2, pp. 299–309). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.020>
- Guan, S.-Zhen., Ji Wen-Jing., Jiang Yu., Ning Li., Lian Yu-Long., & Liu Ji-Wen. (2017). Enriched environment treatment remediated hippocampal monoamine neurotransmitters and emotional deficits in offspring induced by maternal chronic stress rat during pregnancy. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(7), 9963–9975.
- Guerrero-Aguilera, M. de los A., Rubio Osornio, M. del C., Portillo Martínez, W., & Retana-Márquez, S. (2016). Tactile stimulation effects on hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory in prenatally stressed rats. *Brain Research Bulletin*, 124, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2016.03.003>
- Habib, K. E., Gold, P. W., & Chrousos, G. P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30(3), 695–728. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70208-5](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70208-5)

- Hajszan, T., Dow, A., Warner-Schmidt, J. L., Szigeti-Buck, K., Sallam, N. L., Parducz, A., Leranath, C., & Duman, R. S. (2009). Remodeling of Hippocampal Spine Synapses in the Rat Learned Helplessness Model of Depression. *Biological Psychiatry*, 65(5), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.09.031>
- Harker, K. T., & Whishaw, I. Q. (2004). Impaired place navigation in place and matching-to-place swimming pool tasks follows both retrosplenial cortex lesions and cingulum bundle lesions in rats. *Hippocampus*, 14(2), 224–231. <https://doi.org/10.1002/hipo.10159>
- Harris, A., & Seckl, J. (2011). Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and Behavior*, 59(3), 279–289. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2010.06.007>
- Hayashi, A., Nagaoka, M., Yamada, K., Ichitani, Y., Miake, Y., & Okado, N. (1998). Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3–4), 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(98\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(98)00028-8)
- Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Moal, M., & Maccari, S. (1994). Prenatal Stress Increases the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Response in Young and Adult Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 6(3), 341–345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1994.tb00591.x>
- Herman, J. P., Patel, P. D., Akil, H., & Watson, S. J. (1989). Localization and Regulation of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor Messenger RNAs in the Hippocampal Formation of the Rat. *Molecular Endocrinology*, 3(11), 1886–1894. <https://doi.org/10.1210/mend-3-11-1886>
- Holgate, J., & Bartlett, S. (2015). Early Life Stress, Nicotinic Acetylcholine Receptors and Alcohol Use Disorders. *Brain Sciences*, 5(3), 258–274. <https://doi.org/10.3390/brainsci5030258>
- Hosseini-sharifabad, M., & Hadinedoushan, H. (2007). Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anatomical Science International*, 82(4), 211–217. <https://doi.org/10.1111/j.1447-073X.2007.00186.x>
- Hritcu, L., Clicinschi, M., & T Nabeshima. (2007). Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not long-term memory in rats. *Physiology & Behavior*, 91(5), 652–657. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938407001217>
- Huang, Y., Xu, H., Li, H., Yang, H., Chen, Y., & Shi, X. (2012). Pre-gestational stress reduces the ratio of 5-HIAA to 5-HT and the expression of 5-HT1A receptor and

- serotonin transporter in the brain of foetal rat. *BMC Neuroscience*, 13(1), 22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-22>
- Huizink, A. C. (2000). Prenatal stress and its effect on infant development. Doctoral dissertation
- Hurley, L. M., Devilbiss, D. M., & Waterhouse, B. D. (2004). A matter of focus: Monoaminergic modulation of stimulus coding in mammalian sensory networks. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 488–495). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.06.007>
- Huttunen, M. O., & Niskanen, P. (1978). Prenatal Loss of Father and Psychiatric Disorders. *Archives of General Psychiatry*, 35(4), 429–431.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1978.01770280039004>
- Ikemoto, K., Uwano, T., Nishimura, A., Nishi, K., Ono, T., & Nishijo, H. (2015). Prenatal Maternal Stress Due to Repeated Exposure to A Cold Environment Affects Development of Catecholamine Neurons in Rat Offspring: An Immunohistochemical Study. *Journal of Neurology & Neurophysiology*, 06(01).
<https://doi.org/10.4172/2155-9562.1000271>
- Innis, S. M. (2005). Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta*, 26(SUPPL.), S70–S75. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.01.005>
- Ishiwata, H., Shiga, T., & Okado, N. (2005). Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. *Neuroscience*, 133(4), 893–901.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.03.048>
- Ishizuka, N. (2001). Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 435(1), 89–110.
<https://doi.org/10.1002/cne.1195>
- Jia, N., Yang, K., Sun, Q., Cai, Q., Li, H., Cheng, D., Fan, X., & Zhu, Z. (2010). Prenatal stress causes dendritic atrophy of pyramidal neurons in hippocampal CA3 region by glutamate in offspring rats. *Developmental Neurobiology*, 70(2), 114–125.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20766>
- Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16(2), 115–130.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80175-7](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80175-7)
- Jung, M. W., Wiener, S. I., & McNaughton, B. L. (1994). Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *Journal of*

Neuroscience, 14(12), 7347–7356. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-12-07347.1994>

Kapoor, A., Kostaki, A., Janus, C., & Matthews, S. G. (2009). The effects of prenatal stress on learning in adult offspring is dependent on the timing of the stressor. *Behavioural Brain Research*, 197(1), 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.018>

Kapoor, A., Petropoulos, S., & Matthews, S. G. (2008). Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. In *Brain Research Reviews* (Vol. 57, Issue 2, pp. 586–595). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.013>

Karst, H., Berger, S., Turiault, M., Tronche, F., Schütz, G., & Joëls, M. (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19204–19207. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507572102>

King, S., & Laplante, D. P. (2005). The effects of prenatal maternal stress on children's cognitive development: Project Ice Storm. In *Stress* (Vol. 8, Issue 1, pp. 35–45). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/10253890500108391>

King, S., Mancini-Marie, A., Brunet, A., Walker, E., Meaney, M. J., & Laplante, D. P. (2009). Prenatal maternal stress from a natural disaster predicts dermatoglyphic asymmetry in humans. *Development and Psychopathology*, 21(2), 343–353. <https://doi.org/10.1017/S0954579409000364>

Kinney, D. K. (2000). Prenatal Stress and Risk for Schizophrenia. *International Journal of Mental Health*, 29(4), 62–72. <https://doi.org/10.1080/00207411.2000.11449503>

Kinney, D. K., Miller, A. M., Crowley, D. J., Huang, E., & Gerber, E. (2008). Autism prevalence following prenatal exposure to hurricanes and tropical storms in Louisiana. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 38(3), 481–488. <https://doi.org/10.1007/s10803-007-0414-0>

Kloet de, E. R., Otte, C., Kumsta, R., Kok, L., Hillegers, M. H. J., Hasselmann, H., Kliegel, D., & Joëls, M. (2016). Stress and Depression: a Crucial Role of the Mineralocorticoid Receptor. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(8). <https://doi.org/10.1111/jne.12379>

Knipp, G. T., Audus, K. L., & Soares, M. J. (1999). Nutrient transport across the placenta. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38(1), 41–58. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00005-8)

- Kocsis, B., & Vertes, R. P. (1997). Phase relations of rhythmic neuronal firing in the supramammillary nucleus and mammillary body to the hippocampal theta activity in urethane anesthetized rats. *Hippocampus*, 7(2), 204–214. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1997\)7:2<204::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:2<204::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M)
- Koehl, M., & Abrous, D. N. (2011). A new chapter in the field of memory: Adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1101–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07609.x>
- Konishi, N., Otaka, M., Odashima, M., Jin, M., Wada, I., Komatsu, K., Sato, T., Kato, S., Matsushashi, T., & Watanabe, S. (2006). Systemic stress increases serum leptin level. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(7), 1099–1102. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04132.x>
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., & Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Kulla, A., & Manahan-Vaughan D. (2002). Modulation by Serotonin 5-HT₄ Receptors of Long-term Potentiation and Depotentiation in the Dentate Gyrus of Freely Moving Rats. *Cerebral Cortex*, 12(2), 150–162. <https://academic.oup.com/cercor/article-abstract/12/2/150/301069>
- Kuypers, K. P. C., & Ramaekers, J. G. (2005). Transient memory impairment after acute dose of 75 mg 3,4-Methylene-dioxymethamphetamine. *J Psychopharm Journal of Psychopharmacology*, 19(6), 633–639. <https://doi.org/10.1177/0269881105056670>
- Kloet de, E. R., Otte, C., Kumsta, R., Kok, L., Hillegers, M. H. J., Hasselmann, H., Kliegel, D., & Joëls, M. (2016). Stress and Depression: a Crucial Role of the Mineralocorticoid Receptor. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(8). <https://doi.org/10.1111/jne.12379>
- Kwon, E. J., & Kim, Y. J. (2017). What is fetal programming?: A lifetime health is under the control of in utero health. In *Obstetrics and Gynecology Science* (Vol. 60, Issue 6, pp. 506–519). Korean Society of Obstetrics and Gynecology. <https://doi.org/10.5468/ogs.2017.60.6.506>
- Lamprecht, R., & Ledoux, J. (2004). STRUCTURAL PLASTICITY AND MEMORY. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 5. <https://doi.org/10.1038/nrn1301>
- Laplante, D. P., Brunet, A., Schmitz, N., Ciampi, A., & King, S. (2008). Project ice storm: Prenatal maternal stress affects cognitive and linguistic functioning in 5 1/2-year-

- old children. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 47(9), 1063–1072. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e31817eec80>
- Lavenex, P., Lavenex, P. B., & Amaral, D. G. (2007). Spatial relational learning persists following neonatal hippocampal lesions in macaque monkeys. *Nature Neuroscience*, 10(2), 234–239. <https://doi.org/10.1038/nn1820>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2003). Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), 1517–1523. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-04-01517.2003>
- Li, J., Olsen, J., Vestergaard, M., & Obel, C. (2010). Attention-deficit/hyperactivity disorder in the offspring following prenatal maternal bereavement: A nationwide follow-up study in Denmark. *European Child and Adolescent Psychiatry*, 19(10), 747–753. <https://doi.org/10.1007/s00787-010-0113-9>
- Lui, C. C., Wang, J. Y., Tain, Y. L., Chen, Y. C., Chang, K. A., Lai, M. C., & Huang, L. T. (2011). Prenatal stress in rat causes long-term spatial memory deficit and hippocampus MRI abnormality: Differential effects of postweaning enriched environment. *Neurochemistry International*, 58(3), 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.01.002>
- Luine, V., Villegas, M., Martinez, C., & McEwen, B. S. (1994). Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Research*, 639(1), 167–170. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91778-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91778-7)
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434–445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- Mairesse, J., Lesage, J., Breton, C., Bréant, B., Hahn, T., Darnaudéry, M., Dickson, S. L., Seckl, J., Blondeau, B., Vieau, D., Maccari, S., & Viltart, O. (2007). Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(6), E1526–E1533. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00574.2006>
- Mayhew, T. M., Jackson, M. R., & Boyd, P. A. (1993). Changes in oxygen diffusive conductances of human placentae during gestation (10–41 weeks) are commensurate with the gain in fetal weight. *Placenta*, 14(1), 51–61. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(05\)80248-6](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(05)80248-6)
- Meaney, M., Viau, V., Aitken, D., research, S. B.-B., & 1988, undefined. (1998). Stress-induced occupancy and translocation of hippocampal glucocorticoid receptors. Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899388910931>

- Megías, M., Emri, Z., Freund, T. F., & Gulyás, A. I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, 102(3), 527–540. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00496-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00496-6)
- Mengler, L., Khmelinskii, A., Diedenhofen, M., Po, C., Staring, M., Lelieveldt, B. P. F., & Hoehn, M. (2014). Brain maturation of the adolescent rat cortex and striatum: Changes in volume and myelination. *NeuroImage*, 84, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.034>
- Melian, W., Rosado, J., & Aguado, R. (2008). Plasticidad sináptica duradera (LTP): un punto de partida para entender los procesos de aprendizaje y memoria. *Revista Cubana de Información Médica*, 1. http://www.rcim.sld.cu/revista_7/articulo_htm/plasticidad.htm
- Milner, B., Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1998). Cognitive Neuroscience Review and the Study of Memory. In *Neuron* (Vol. 20). [https://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273\(00\)80987-3.pdf](https://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273(00)80987-3.pdf)
- Modir, F., Elahdadi Salmani, M., Goudarzi, I., Lashkarboluki, T., & Abrari, K. (2014). Prenatal stress decreases spatial learning and memory retrieval of the adult male offspring of rats. *Physiology & Behavior*, 129, 104–109. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2014.02.040>
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. In *blocs.xtec.cat*. <https://blocs.xtec.cat/escolamargalloedu/files/2013/06/Apr-y-Mem-RN-20053.pdf>
- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681–683. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
- Mulder, E. J. H., Robles De Medina, P. G., Huizink, A. C., van den Bergh, B. R. H., Buitelaar, J. K., & Visser, G. H. A. (2002). Prenatal maternal stress: Effects on pregnancy and the (unborn) child. In *Early Human Development* (Vol. 70, Issues 1–2, pp. 3–14). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(02\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(02)00075-0)
- Mueller, B. R., & Bale, T. L. (2008). Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *Journal of Neuroscience*, 28(36), 9055–9065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1424-08.2008>
- Muller, R. U., Stead, M., & Pach, J. (1996). The hippocampus as a cognitive graph. *Journal of General Physiology*, 107(6), 663–694. <https://doi.org/10.1085/jgp.107.6.663>

- Muneoka, K., Mikuni, M., Ogawa, T., Kitera, K., Kamei, K., Takigawa, M., & Takahashi, K. (1997). Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 273(5), R1669–R1675. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.5.R1669>
- Murchison, C. F., Zhang, X.-Y., Zhang, W.-P., Ouyang, M., Lee, A., & Thomas, S. A. (2004). A Distinct Role for Norepinephrine in Memory Retrieval. *Cell*, 117(1), 131–143. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00259-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00259-4)
- Myhrer, T. (2003). Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: A meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. In *Brain Research Reviews* (Vol. 41, Issues 2–3, pp. 268–287). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00268-0)
- Nazeri, M., Shabani, M., Ghotbi Ravandi, S., Aghaei, I., Nozari, M., & Mazhari, S. (2015). Psychological or physical prenatal stress differentially affects cognition behaviors. *Physiology & Behavior*, 142, 155–160. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2015.02.016>
- Nikolarakis, K., Almeida, O., research, A. H.-B., & 1986, undefined. (1986). Stimulation of hypothalamic β -endorphin and dynorphin release by corticotropin-releasing factor (in vitro). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899386906104>
- Noorlander, C. W., de Graan, P. N. E., Middeldorp, J., van Beers, J. J. B. C., & Visser, G. H. A. (2006). Ontogeny of hippocampal corticosteroid receptors: Effects of antenatal glucocorticoids in human and mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 499(6), 924–932. <https://doi.org/10.1002/cne.21162>
- O'Donnell, K., O'Connor, T. G., & Glover, V. (2009). Prenatal Stress and Neurodevelopment of the Child: Focus on the HPA Axis and Role of the Placenta. *Developmental Neuroscience*, 31(4), 285–292. <https://doi.org/10.1159/000216539>
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1), 171–175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- Ögren, S. O., Eriksson, T. M., Elvander-Tottie, E., D'Addario, C., Ekström, J. C., Svenningsson, P., Meister, B., Kehr, J., & Stiedl, O. (2008). The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 54–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.023>
- Ohkawa, T., Rohde, W., Takeshita, S., Dörner, G., Arai, K., & Okinaga, S. (1991). Effect of an Acute Maternal Stress on the Fetal Hypothalamo-Pituitary-Adrenal System

in Late Gestational Life of the Rat. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 98(05), 123–129. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211108>

Palacios-Filardo, J., & Mellor, J. R. (2019). Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 54, 37–43. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2018.08.009>

Paxinos G, Halliday, G. , Watson, C. & Kassem, M. S. (2020). Atlas of the developing mouse brain The rat brain in stereotaxic coordinates: hard. Academic Press. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=KDLXDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=+Atlas+of+the+developing+mouse+brain+The+rat+brain+in+stereotaxi&ots=O5rU4Y3BIF&sig=P3WpNPmXQ4ztAz2RtmWLRdHPEzQ#v=onepage&q=Atlas%20of%20the%20developing%20mouse%20brain%20The%20rat%20brain%20in%20stereotaxi&f=false>

Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. El Sevier.

Perez-Garcia, G., & Meneses, A. (2009). Memory time-course: mRNA 5-HT1A and 5-HT7 receptors. *Behavioural Brain Research*, 202(1), 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.027>

Peckett, A. J., Wright, D. C., & Riddell, M. C. (2011). The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. In *Metabolism: Clinical and Experimental* (Vol. 60, Issue 11, pp. 1500–1510). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.06.012>

Peña, C. J., Monk, C., & Champagne, F. A. (2012). Epigenetic effects of Prenatal stress on 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and fetal brain. *PLoS ONE*, 7(6), e39791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039791>

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Domínguez-Salazar, E., Martínez-García, R., & Velázquez-Moctezuma, J. (2003a). Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 28(2), 207–227. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(02\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(02)00017-3)

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., & Martínez-García, R. (2009). Naltrexone effects on male sexual behavior, corticosterone, and testosterone in stressed male rats. *Physiology & Behavior*, 96(2), 333–342. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2008.10.022>

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Martínez-García, R., & Velázquez-Moctezuma, J. (2003b). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male

rats. *Hormones and Behavior*, 44(4), 327–337.
<https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2003.04.001>

Retana-Márquez S., Delgadillo Sánchez J.A., & Keller M. (2012). *Avances en Biología de la Reproducción* (Primera edición). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Reul, J. , & E.d. Kloet. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6), 2505-2511.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505>

Risold, P. Y., Thompson, R. H., & Swanson, L. W. (1997). The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. In *Brain Research Reviews* (Vol. 24, Issues 2–3, pp. 197–254). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00007-6)

Roberts, A. C., Tomic, D. L., Parkinson, C. H., Roeling, T. A., Cutter, D. J., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2007). Forebrain connectivity of the prefrontal cortex in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): An anterograde and retrograde tract-tracing study. *The Journal of Comparative Neurology*, 502(1), 86–112.
<https://doi.org/10.1002/cne.21300>

Rojas Durán, F., Denes, J. M., Soto-Cid, A. H., Aranda-Abreu, G. E., Aguilar, E. J., Alfonso Coria-Ávila, G., Cárdenas, R. T., Locia Espinoza, J., & Elena Hernández Aguilar, M. (2011). The androgen receptor in the prostate physiopathology Contenido. In *Revista eNeurobiología* (Vol. 2, Issue 4).
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4014127>

Rosenfeld, P., van Eekelen, J. A. M., Levine, S., & de Kloet, E. R. (1993). Ontogeny of corticosteroid receptors in the brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 13(4), 295–319. <https://doi.org/10.1007/BF00711575>

Sánchez, M. M., Young, L. J., Plotsky, P. M., & Insel, T. R. (2000). Distribution of corticosteroid receptors in the rhesus brain: Relative absence of glucocorticoid receptors in the hippocampal formation. *Journal of Neuroscience*, 20(12), 4657–4668. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-12-04657.2000>

Sandman, C. A., Glynn, L., Schetter, C. D., Wadhwa, P., Garite, T., Chicz-DeMet, A., & Hobel, C. (2006). Elevated maternal cortisol early in pregnancy predicts third trimester levels of placental corticotropin releasing hormone (CRH): Priming the placental clock. *Peptides*, 27(6), 1457–1463.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.10.002>

Sandman, C. A., Wadhwa, P., Glynn, L., Chicz-Demet, A., Porto, M., & Garite Thomas J. (1999). Corticotrophin-releasing Hormone and Fetal Responses in Human

Pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 897(1 NEUROPEPTIDES), 66–75. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07879.x>

Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions*. In *academic.oup.com*. <https://academic.oup.com/edrv/article/21/1/55/2423840>

Sara, S. J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 10, Issue 3, pp. 211–223). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn2573>

Schimanski, L. A., Ali, D. W., Baker, G. B., & Nguyen, P. v. (2007). Impaired hippocampal LTP in inbred mouse strains can be rescued by β -adrenergic receptor activation. *European Journal of Neuroscience*, 25(5), 1589–1598. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05376.x>

Schmitz, D., Empson, R. M., & Heinemann, U. (1995). Serotonin and 8-OH-DPAT reduce excitatory transmission in rat hippocampal area CA1 via reduction in presumed presynaptic Ca^{2+} entry. *Brain Research*, 701(1–2), 249–254. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01005-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01005-5)

Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the Hippocampal Formation. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 6–17). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000360925>

Seckl, J. R. (2007). Glucocorticoids, developmental ‘programming’ and the risk of affective dysfunction. *Progress in Brain Research*, 167, 17–34. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)67002-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)67002-2)

Shin, B.-C., Fujikura, K., Suzuki, T., Tanaka, S., & Takata, K. (1997). Glucose Transporter GLUT3 in the Rat Placental Barrier: A Possible Machinery for the Transplacental Transfer of Glucose. *Endocrinology*, 138(9), 3997–4004. <https://doi.org/10.1210/endo.138.9.5369>

Siegel, G. J. , M., R. Wayne Alberts, Scott T. Brady, & Donald L. Price. (2006). *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and Medical aspects*. Elsevier Academic Press, 1–1020.

Soares-Cunha, C., Coimbra, B., Borges, S., Domingues, A. V., Silva, D., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2018). Mild Prenatal Stress Causes Emotional and Brain Structural Modifications in Rats of Both Sexes. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 129. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00129>

- Sousa, N., Lukoyanov, N. V., Madeira, M. D., Almeida, O. F. X., & Paula-Barbosa, M. M. (2000). Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, 97(2), 253–266. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00050-6)
- Sunanda, Rao, B. S. S., & Raju, T. R. (2000). Chronic restraint stress impairs acquisition and retention of spatial memory task in rats. In *Current Science* (Vol. 79, pp. 1581–1584). Current Science Association. <https://doi.org/10.2307/24104852>
- Schimanski, L. A., Ali, D. W., Baker, G. B., & Nguyen, P. (2007). Impaired hippocampal LTP in inbred mouse strains can be rescued by β -adrenergic receptor activation. *European Journal of Neuroscience*, 25(5), 1589–1598. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05376.x>
- Sloviter, R. S. (1994). The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, 35(6), 640–654. <https://doi.org/10.1002/ana.410350604>
- Slotkin, T. A., Kreider, M. L., Tate, C. A., & Seidler, F. J. (2006). Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology*, 31(5), 904–911. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300892>
- Spiers, H. J., & Maguire, E. A. (2006). Thoughts, behaviour, and brain dynamics during navigation in the real world. *NeuroImage*, 31(4), 1826–1840. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.01.037>
- Swanson, L. W., & Kohler, C. (1986). Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *Journal of Neuroscience*, 6(10), 3010–3023. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.06-10-03010.1986>
- Szuran, T. F., Pliška, V., Pokorny, J., & Welzl, H. (2000). Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiology & Behavior*, 71(3–4), 353–362. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00351-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00351-6)
- Takahashi, L. K. (1998). Prenatal stress: Consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3–4), 199–207. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(98\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(98)00020-3)
- Tanti, A., & Belzung, C. (2013). Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: Are depression and the action of antidepressants region-specific?

In Neuroscience (Vol. 252, pp. 234–252). Pergamon.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.017>

Taube, J. S. (2007). The Head Direction Signal: Origins and Sensory-Motor Integration. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 181–207.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112854>

Teixeira, C. M., Rosen, Z. B., Suri, D., Sun, Q., Hersh, M., Sargin, D., Dincheva, I., Morgan, A. A., Spivack, S., Krok, A. C., Hirschfeld-Stoler, T., Lambe, E. K., Siegelbaum, S. A., & Ansorge, M. S. (2018). Hippocampal 5-HT Input Regulates Memory Formation and Schaffer Collateral Excitation. *Neuron*, 98(5), 992–1004.e4. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.04.030>

Vegiopoulos, A., & Herzig, S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 275, Issues 1–2, pp. 43–61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.05.015>

Viltart, O., & Vanbesien-Mailliot, C. C. A. (2007). Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. In *TheScientificWorldJournal* (Vol. 7, pp. 1493–1537). <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.204>

Ward, I. L., & Weisz, J. (1984). Differential Effects of Maternal Stress on Circulating Levels of Corticosterone, Progesterone, and Testosterone in Male and Female Rat Fetuses and Their Mothers. *Endocrinology*, 114(5), 1635–1644.
<https://doi.org/10.1210/endo-114-5-1635>

Watson, J. B., Mednick, S. A., Huttunen, M., & Wang, X. (1999). Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Development and Psychopathology*, 11(3), 457–466. <https://doi.org/10.1017/S0954579499002151>

Weinstock, M. (2005). The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. In *Brain, Behavior, and Immunity*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.09.006>

Weinstock, M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1073–1086.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2008.03.002>

Weinstock, M. (2017). Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiology of Stress*, 6, 3–13. <https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2016.08.004>

Welberg, L. A. M., Seckl, J. R., & Holmes, M. C. (2001). Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience*, 104(1), 71–79.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00065-3)

- Welberg, L. A. M., Thrivikraman, K. v., & Plotsky, P. M. (2005). Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *Journal of Endocrinology*, 186(3), R7–R12. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06374>
- Witter, M. P., & Groenewegen, H. J. (1990). The subiculum: Cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex. *Progress in Brain Research*, 83(C), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61240-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61240-6)
- Woodward, C. J. H., & Emery, P. W. (1987). Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 419, 280–284. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(87\)80287-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(87)80287-6)
- Yamamori, E., Iwasaki, Y., Taguchi, T., Nishiyama, M., Yoshida, M., Asai, M., Oiso, Y., Itoi, K., Kambayashi, M., & Hashimoto, K. (2007). Molecular mechanisms for corticotropin-releasing hormone gene repression by glucocorticoid in BE(2)C neuronal cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1–2), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.11.001>
- Zohar, I., & Weinstock, M. (2011). Differential Effect of Prenatal Stress on the Expression of Corticotrophin-Releasing Hormone and its Receptors in the Hypothalamus and Amygdala in Male and Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(4), 320–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02117.x>
- Zhu, Z., Li, X., Chen, W., Zhao, Y., Li, H., Qing, C., Jia, N., Bai, Z., & Liu, J. (2004). Prenatal stress causes gender-dependent neuronal loss and oxidative stress in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 78(6), 837–844. <https://doi.org/10.1002/jnr.20338>
- Zuena, A. R., Mairesse, J., Casolini, P., Cinque, C., Alemà, G. S., Morley-Fletcher, S., Chiodi, V., Spagnoli, L. G., Gradini, R., Catalani, A., Nicoletti, F., & Maccari, S. (2008). Prenatal Restraint Stress Generates Two Distinct Behavioral and Neurochemical Profiles in Male and Female Rats. *PLoS ONE*, 3(5), e2170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002170>

RESEARCH PAPER

Acta Neurobiol Exp 2020, 80
DOI: 10.21307/ane-2020-037



Serotonin and noradrenaline content and release in the dorsal hippocampus during learning and spatial memory in prenatally stressed rats

Diana Méndez Guerrero¹, Felipe de Jesús Jiménez Vásquez¹, Moisés Rubio Osornio², María del Carmen Rubio Osornio², Sandra Orozco Suárez³ and Socorro Retana-Márquez^{4*}

¹ Postgraduate in Experimental Biology, Autonomous Metropolitan University, Iztapalapa Unit (UAM-I), Mexico,

² National Institute of Neurology and Neurosurgery (INNN), Mexico,

³ Neurological Disease Research Unit, Specialty Hospital, C.M.N. 100th Century, Mexico,

⁴ Department of Biology of Reproduction, Autonomous Metropolitan University, Iztapalapa, Mexico,

*Email: rems@xanum.uam.mx

Prenatal stress causes learning and spatial memory deficits in adulthood by modifying hippocampal function. The dorsal hippocampus contains serotonergic and noradrenergic neuron terminals, which are related to cognitive processes. It is currently unknown whether prenatal stress modifies serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) content and their release in the hippocampus during cognitive performance. Therefore, we measured these variables in the dorsal hippocampus of prenatally stressed males during spatial learning and memory tests. Cognitive tests were performed in 3-month-old control and prenatally stressed male rats in the Morris water maze. After cognitive tests, the dorsal hippocampus was dissected to quantify 5-HT and NA content. In other males, 5-HT and NA release in the dorsal hippocampus was assessed by microdialysis, before and after cognitive tests. Prenatally stressed males showed longer latencies to reach the platform, compared to control animals. Hippocampal 5-HT content decreased during learning and memory tasks in both groups, while NA content was not modified in prenatally stressed males neither before, nor after learning and memory tests. 5-HT and NA release were significantly lower in prenatally stressed animals during spatial learning and memory tasks. Corticosterone response was greater in prenatally stressed animals compared to controls. These results show that cognitive disruption caused by prenatal stress is related to decreased 5-HT and NA release, and to higher adrenal axis response in prenatally stressed animals.

Key words: learning, spatial memory, prenatal stress, serotonin, noradrenaline, dorsal hippocampus

INTRODUCTION

In rodents, maternal stress during pregnancy can cause psychopathologies in the offspring, such as anxiety and depressive-like behaviors, as well as cognitive deficits (Weinstock, 2017). Also, alterations in development and maturation of brain structures, such as the hippocampus, have been reported (Fujioka et al., 2006). The dorsal hippocampus is involved in spatial learning and memory processes in rats and primates

(Bannerman et al., 2004; Tanti and Belzung, 2013; Grigoryan and Segal, 2016), specifically, regions CA1, CA3 and the dentate gyrus (DG) (Griffin et al., 2007). Lesions of this brain structure (Lee and Kesner, 2003) or prenatal stress (Aleksandrov et al., 2001; Akatsu et al., 2015; Guerrero et al., 2016; Weinstock, 2017) cause deficits in learning and in short-term spatial memory in adult rodents. The hippocampus contains dense noradrenergic fibers (Vizi and Kiss, 1998) coming from the locus coeruleus (LC) which are located in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus (Palacios-Filardo

Received 20 February 2020, accepted 8 September 2020



and Mellor, 2019). Prenatal stress by exposure to a cold environment decreases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in LC neurons of young rats, thus disturbing the development of noradrenergic neurons (Bock et al., 2015; Ikemoto et al., 2015). It has been reported that noradrenaline (NA) is important for hippocampus-dependent memory retrieval, but not for acquisition and short-term memory in the Morris water maze (MWM). These effects of NA are mediated by β_1 -adrenergic receptors (Murchinson et al., 2004; Schimanski et al., 2007). Prenatal stress by malnutrition (Flores et al., 2011) or immobilization (Grigoryan and Segal, 2013) down regulates β -adrenergic receptors and decreases the affinity of β receptors to noradrenergic agonists in the dorsal hippocampus of rats (Grigoryan and Segal, 2013). Furthermore, NA content decreases in the hippocampus of offspring prenatally stressed by chronic unpredictable mild stress (Guan et al., 2017). Serotonin (5-HT) is another neurotransmitter involved in learning and memory processes (Killa and Manahan-Vaughan, 2002), and is found in large quantities in the hippocampus (Glikman-Johnston et al., 2015), mainly in CA1, CA2, CA3 and DG regions (Moore and Halaris, 1975). The serotonergic system also plays a role in learning and memory with four 5-HT receptor subtypes: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, and 5-HT_{2A}, located along the dorsal-ventral axis of the hippocampus (Tanaka et al., 2012), and disruption of spatial learning in the offspring caused by prenatal stress is related to decreased mRNA expression of those same receptors in the hippocampus (Akastu et al., 2015). The increase of extracellular 5-HT concentration, either by pharmacologically stimulating its release or by blocking its reuptake, improves or maintains memory performance, while reduced 5HT levels impair spatial memory in rats (Glikman-Johnston et al., 2015). Optogenetic activation of serotonergic terminals in the hippocampal pyramidal neurons of the CA1 region potentiates excitatory transmission at CA3-to-CA1 synapses and enhances spatial memory. In contrast, optogenetic silencing of CA1 5-HT terminals inhibits spatial memory in mice (Teixeira et al., 2018). Regarding hippocampal 5-HT content, the results are contradictory, for example, some studies report decreased 5-HT content in the offspring of dams exposed to stress by crowding (Hayashi et al., 1998) or chronic unpredictable mild stress (Guan et al., 2017) during pregnancy, with higher levels of its metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), and increased metabolic rate (Hayashi et al., 1998). However, other studies did not find changes in hippocampal 5-HT content in offspring from mothers stressed by restraint (Gammel et al., 2016). Another study, reports increased 5-HT content in the hippocampus of fetuses from dams stressed by chronic unpredictable stress,

decreased 5-HIAA, 5-HIAA-5-HT ratio, 5-HT transporter, and 5-HT_{1A} (Huang et al., 2012). Nonetheless, 5-HT and 5-HIAA content assessment does not necessarily reflect what is really happening with the release of neurotransmitters, and it is not clear whether the alterations in learning and memory processes in prenatally stressed animals are related to changes in the release of NA and 5-HT. Therefore, the objective of this study was to evaluate the content and release of 5-HT and NA in the dorsal hippocampus during learning and spatial memory in adult prenatally stressed rats. Baseline activity of the adrenal axis and its response to learning and spatial memory tests were also evaluated.

METHODS

Subjects

Three-month-old female Wistar rats, weighing 200-250 g obtained from the vivarium of the Autonomous Metropolitan University were kept under controlled temperature conditions (23±2°C) with an inverted light-dark cycle, 12/12 (lights off at 9:00 am), with water and food *ad libitum*. Pregnant females were randomly assigned to control (n=20) or maternal stress (n=20) groups (Fig. 1). Control females remained unaltered during pregnancy, except for daily weighing. The experimental procedures were carried out in accordance with Mexican Official Regulations (NOM-062-ZOO-1999) and the guidelines for ethical research, teaching and dissemination of the Biological Sciences Division of the Autonomous Metropolitan University, Iztapalapa. This study was approved by the Ethics Commission of the Biology and Health Sciences Division of the Autonomous Metropolitan University.

Stress procedure

Pregnant females assigned to maternal stress were exposed to stress by cold water immersion twice a day (9:00 a.m. and 15:00 p.m.), during the last week of gestation (day 15 to 21). Dams were placed in tanks filled with water at 15°C, 15 cm depth, for 15 min. Once this time elapsed, rats were picked out from water, dried with a towel and returned to their individual cages (Retana-Márquez et al., 2009). Exposure to the stressor was performed in a room other than the housing room.

After birth, litters from each experimental group were homogenized in number, sexed, and weighed. On postnatal day 22, offspring were weaned and males from both groups were separated from females. About 50 % of descendants in both groups were males, which were

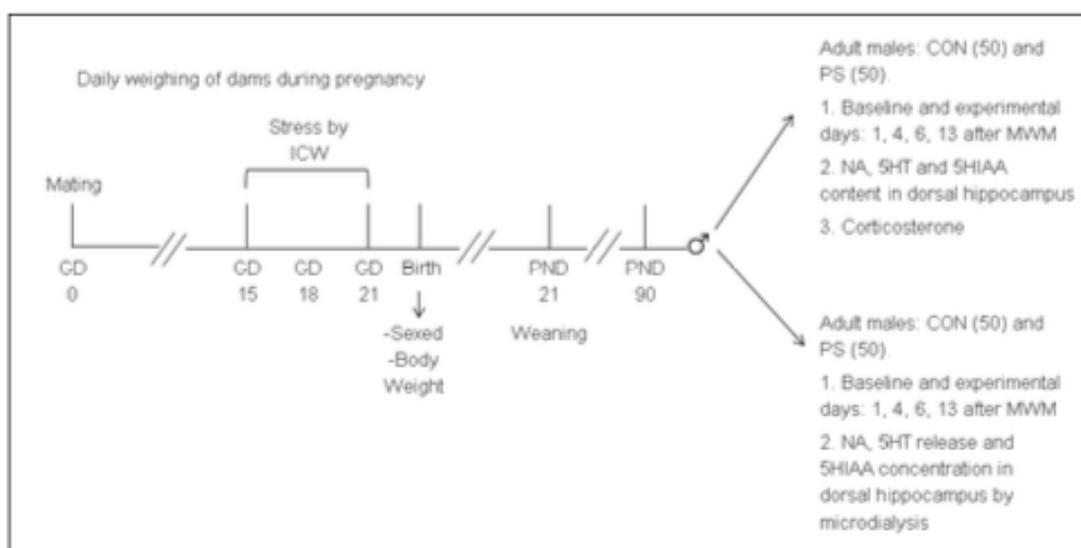


Fig. 1. Timeline of experimental design. Females were stressed by immersion in cold water (ICW) from gestational days (GD) 15-21. Weaning occurred at postnatal day (PND) 21. Serotonin (5-HT) and its metabolite, 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), as well as noradrenaline (NA) were assessed in control (CON) and prenatally stressed (PS) males at baseline and after the Morris water maze (MWM) in homogenates and dialysates on days 1, 4, 6, and 13.

used for this study. In order to avoid litter effects, one rat from each of twenty litters per group was tested in each experimental day, which is appropriate for studies using mammals that have litters (Holson and Pearce, 1992; Williams et al, 2017). Therefore, 10 (non-siblings) prenatally stressed or control males were used separately for each analyzed day.

Behavioral tests

Spatial learning and memory tests were performed using the MWM in adult (3 months) control and prenatally stressed ($n=50$; baseline and experimental days: 1, 4, 6, 13, $n=10$, each group) male offspring. A circular pool (170 cm in diameter and 70 cm in height) was used; water height 30 cm, temperature $22\pm 2^\circ\text{C}$. Four imaginary quadrants (NE, NW, SE, and SW) divided the pool, and subjects were released from different starting points in each trial and each day. Three contrasting figures used as spatial cues were placed on the white walls surrounding the pool. A transparent acrylic platform (18 cm \times 18 cm) was placed inside the pool, in one of the quadrants 2 cm below the surface of the water. The behavioral parameter analyzed was escape latency: time the rat takes to find the submerged platform in the learning phase (days 1-4), and in the memory phase (days 6 and 13) (Kapoor et al, 2009; Nazeri et al, 2015;

Guerrero et al, 2016). During learning sessions (days 1 - 4), four trials per session were performed. For the first trial on day 1, if a rat did not find the platform within a 60 s period, the experimenter guided the rat to the platform and left it on the platform for 30 s (Kapoor et al, 2009). When rats found the platform within the 60 s period, they were left there for 30 s. For memory sessions, a single trial was carried out and latencies were recorded (Guerrero et al, 2016).

5-HT, 5-HIAA, and NA hippocampal content

Immediately after behavioral tests, control and prenatally stressed males were euthanized by decapitation on days 1, 4 (learning), 6, and 13 (memory). The right dorsal hippocampus was dissected and frozen (-83°C) until evaluation. 300 μL of perchloric acid (0.1 M) were added to thawed samples, homogenized with a plunger, kept on ice and covered, to prevent degradation due to light. Samples were centrifuged for 15 min at 8000 rpm at 4°C . The supernatant was filtered with MFTM nitrocellulose membranes (Millipore, Merck, Ireland), 0.45 μm pore, and 10 μL of the filtered sample were injected to a high-performance liquid chromatography system with electrochemical detection (HPLC-ED). Trunk blood was also collected for serum corticosterone quantification.

Microdialysis procedure

In other control and prenatally stressed males ($n=50$, each), stereotaxic surgeries were performed. Rats were anesthetized with ketamine (PISA® S.A. DE C.V. Mexico, 8 mg/kg, i.p.) and xylazine (PISA® S.A. DE C.V. Mexico, 20 mg/kg, i.m.). A guide cannula was directed to the right dorsal hippocampus: antero/posterior (A/P) -5.3 mm from bregma, medial/lateral to midline (M/L) -5.2 mm, and dorsal/ventral from dura (D/V) -3.0 mm (Paxinos and Watson, 2007). Four stainless steel screws were placed on the skull and the implant was fixed with dental acrylic. The animals were allowed to recover for 10 days after surgery. Immediately after behavioral tests on days 1, 4, 7 and 13, the microdialysis probe (polyacrylonitrile membrane, pore size: 40,000 D), was introduced, protruding 3 mm below the guide cannula, in the dorsal hippocampus, and fixed to the skull with dental acrylic. Ringer's solution was used (0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate) and dialysates were collected every hour to obtain an adequate volume (30 μL , each). Two dialysates were collected from each rat. Samples (10 μL) were injected to the HPLC-ED. At the end of microdialysis, brains were obtained, and cannula position was verified. No misplaced cannula was found; therefore, no male was excluded.

Biochemical procedures

Amine detection

Samples were injected into the HPLC-DE chromatographic system with a Rheodyne (Waters Corp., Milford, MA, USA). A precolumn (Symmetry C18, particle size 3.5 μm), 2.1 \times 10 mm Waters Corp., Milford, MA, USA) was used. Analytes were separated in a Symmetry C18 column (particle size 5 μm) 2.1 \times 150 mm (Waters Corp., Milford, MA, USA). Phosphate mobile phase (pH=3.1) at a flow of 0.2 mL/min was delivered with a 515 pump (Waters Corp., Milford, MA, USA). Analytes were detected with an electrochemical detector 2465 (Waters Corp., Milford, MA, USA) at a sensitivity of 5 nA and +800 mV power. The results were analyzed with the Millennium 32 program (Waters Corp., Milford, MA, USA).

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). Body weight gain in pregnant females was analyzed by linear regression. Body weight of male pups, litter size and number of male descendants were ana-

lyzed with Student's t-test. Data from MWM, serum corticosterone levels, 5-HT, 5-HIAA, NA content and release were analyzed by two-way ANOVA (condition and days as factors) followed by Tukey's *post hoc* test. Correlations for arrival latencies in the MWM vs. the content, amine release and corticosterone were analyzed by Pearson's test. The differences between the groups were considered significant when $P<0.05$. GraphPad PRISM version 6.01 statistical software (GraphPad Software Inc., USA) was used for statistical analysis.

Corticosterone assessment

Trunk blood samples were taken from all the subjects for corticosterone liquid-liquid extraction (Woodward and Emery, 1987) and quantification at baseline and after behavioral tests. For steroid extraction, serum (1 mL) was mixed with 100 μL of a solution of 19-nortestosterone (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in water/methanol) as an internal standard. A mixture of diethyl ether-dichloromethane (5 mL, 60:40 v/v) was used for corticosterone extraction, vortexed for 1 min and centrifuged for 5 min at 800 rpm. The organic phase was obtained and mixed with 1 mL of HPLC-grade water, stirred for 1 min and centrifuged for 5 min. The organic phase was obtained (3 mL) and evaporated at room temperature. The residue was re-dissolved in 100 μL of methanol-water (60:40 v/v). Corticosterone was separated and detected in a HPLC-UV system with a precolumn (Symmetry C18, particle size 3.5 μm , 2.1 \times 10 mm (Waters Corp., Milford, MA, USA). The separation was made at 40°C in a Waters Symmetry C18 column (particle size 5 μm) 2.0 \times 150 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA with a water-acetonitrile mixture, HPLC grade (65:35 v/v), at a flow rate of 0.4 mL/min. A 600-MS controller system was used for the mobile phase and the steroids were detected with a UV detector (model 486, Waters Corp., Milford MA at a 250 nm wavelength.) The results were analyzed using the Millennium 32 program (Waters Corp., Milford, MA, USA).

RESULTS

Body weight gain in pregnant females

Average body weight gain in stressed mothers was lower than in control dams ($t_{13}=4.59$, $P=0.0059$). The correlation coefficient (r^2) for the control curve was 0.9970, and r^2 for stressed dams was 0.9898. The slopes of the curves were different ($P=0.01891$) (Fig. 2). Birth weights of prenatally stressed male offspring were lower than those of control offspring ($t_{11}=3.628$; $P=0.0005$).

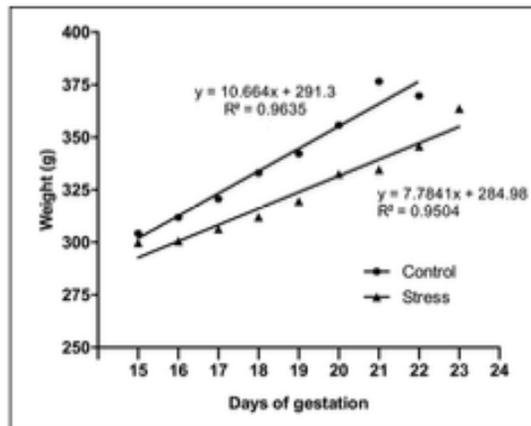


Fig. 2. Body weight of pregnant females on gestational days 15 to 24. The linear regression analysis shows differences between the slopes of the control group vs. the stress group $p=0.01891$. Correlation coefficient for control curve: 0.9970. Correlation coefficient for PS curve: 0.9898. The slopes indicate the average increase in body weight per day; the weight of the stressed dams was significantly lower than that of control dams ($p<0.01$, $n=10$ per group).

No differences were observed in litter size or in average number of females and males in both groups.

Spatial learning and memory

Arrival latencies to the platform in MWM decreased progressively during learning days (1-4) in

control animals, and remained low on days 6 and 13 of memory evaluation. In contrast, prenatally stressed subjects showed higher arrival latencies than those in the control group on all test days [$F_{4,90}=21.244$; $P=0.007$], (Fig. 3A). The average escape latencies in prenatally stressed males were significantly higher than those in the control group [$t_{88}=10.90$; $P=0.0001$] (Fig. 3B).

5-HT, 5HIAA content and release in the dorsal hippocampus

Baseline content of 5-HT in the dorsal hippocampus of prenatally stressed animals was similar to control, and decreased in both groups during learning (1-4) and memory (7 and 13) days [$F_{4,90}=28.25$; $P=0.0001$] (Fig. 4A). Baseline 5-HIAA content and after learning and memory tests were also similar in both groups, and it also decreased in both groups during learning and memory days [$F_{4,90}=16.85$; $P=0.0001$] (Fig. 4B).

Baseline 5-HT release in the dorsal hippocampus of prenatally stressed rats was lower than in control males. On learning days (1 and 4), 5-HT release in the dorsal hippocampus of control animals increased about 6.5 times over its baseline and remained high after memory tests. In contrast, during learning and memory tests, 5-HT release increased slightly in prenatally stressed males, but to a lesser degree than in control males [$F_{4,90}=434.8$ $P=0.0001$] (Fig. 5A). With respect to extracellular 5-HIAA, baseline levels were similar in both groups. After learning and

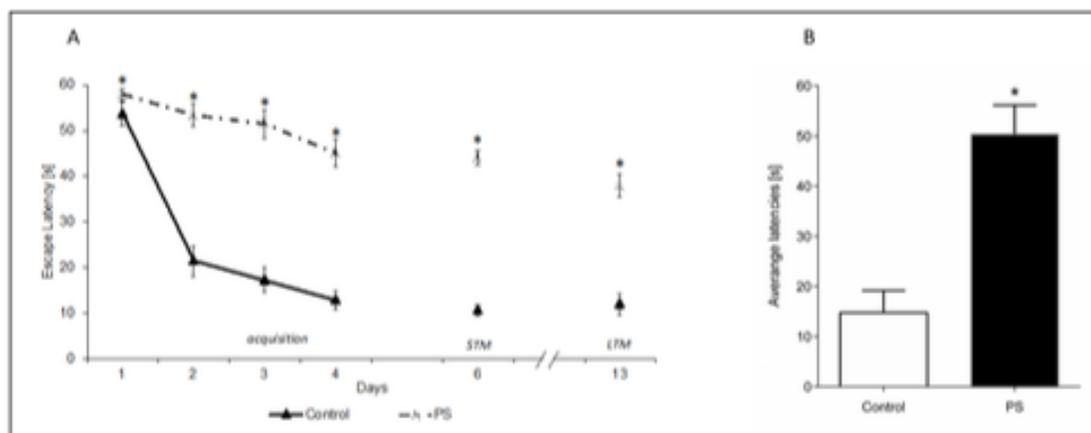


Fig. 3. (A) Escape latencies in the Morris water maze (MWM). Prenatally stressed animals showed higher arrival latencies than control animals on all days of evaluation of the spatial learning and memory tests. Repeated measures ANOVA, * $p=0.007$ compared to control group. (B) Average escape latencies in control and prenatally stressed animals. PS subjects had higher latencies than control males. Data shown as Mean \pm S.E.M. t-student * $p=0.04$ compared with control. STM: short-term memory; LTM: long term memory.

memory tests, extracellular 5-HIAA increased in the dorsal hippocampus of control rats, but there were no changes in prenatally stressed rats [$F_{4,30}=64.06$;

$P=0.0091$] (Fig. 5B). 5-HT release during learning correlated negatively with arrival latencies in the control rats in the MWM ($r=-0.9789$, $P=0.001$). In prenatal-

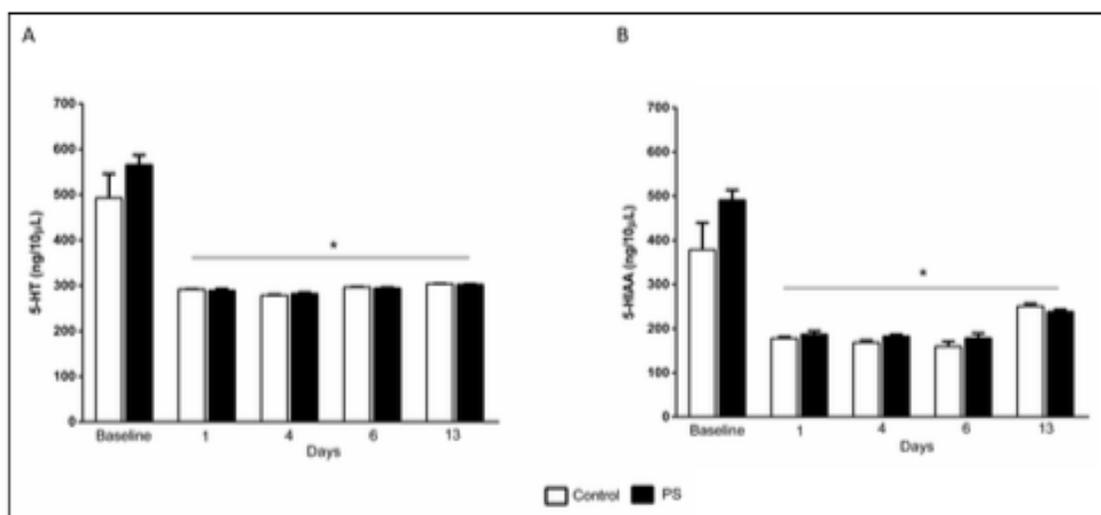


Fig. 4. (A) 5-HT content in the dorsal hippocampus in control and prenatally stressed males. (A) Baseline 5-HT concentrations were similar in both groups and decreased similarly after learning (days 1-4), short (day 7), and long term (day 13) memory tests. (B) 5-HIAA content was also similar in both groups and decreased in the same way on the days of learning and memory assessment. Data shown as Mean \pm S.E.M. Two-way ANOVA ($p=0.0001$). * $p=0.0003$ compared with baseline content from both groups. Control group: $n=10$, each day. Prenatally stressed males: $n=10$ each day.

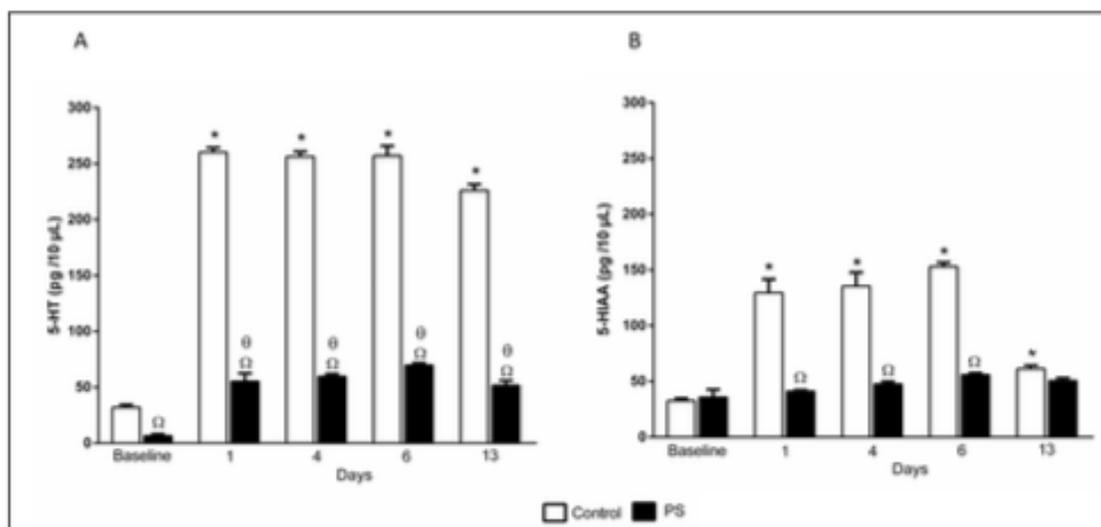


Fig. 5. 5-HT release at baseline and after learning tests (Days 1 and 4) and after short- (day 7) and long-term (day 13) memory tests. 5-HT release in the hippocampus of prenatally stressed rats was lower than in the controls both at baseline and during learning and memory tests. (B) Baseline extracellular 5-HIAA and after learning and memory tests in the dorsal hippocampus of control and prenatally stressed rats. The baseline concentrations were similar in both groups, but after the learning and memory tests, the metabolite concentrations increased in the control group only. Data shown as Mean \pm S.E.M. Two-way ANOVA, * $p=0.005$ compared with control baseline; Ω $p=0.046$ compared with control of each day; ϕ $p=0.001$ compared with the PS baseline. Control group: $n=10$, each day. Prenatally stressed males: $n=10$ each day.

ly stressed rats, a negative correlation was observed between arrival latencies in the MWM during learning and 5-HT release ($r=-0.8940$, $P=0.01$). In addition, baseline 5-HT release correlated negatively with baseline corticosterone concentrations in prenatally stressed rats ($r=-0.9884$, $P=0.001$). Similarly, the increase in corticosterone during learning ($r=-0.7576$, $P=0.05$) and memory ($r=-0.9487$, $P=0.001$) in the MWM correlated negatively with low 5-HT release in prenatally stressed rats.

NA content and release in the dorsal hippocampus

Baseline NA content was significantly lower in the dorsal hippocampus of prenatally stressed animals, compared to controls. During learning and memory tests, NA content decreased significantly in the control subjects, with respect to baseline levels ($F_{4,50}=32.44$; $P=0.0010$). In contrast, no changes in NA content were observed in prenatally stressed males after learning, short- and long-term memory (Fig. 6).

Baseline release of NA in the dorsal hippocampus was lower in prenatally stressed rats compared to controls. After learning and memory tests, NA release increased significantly in control rats with respect to

baseline levels ($F_{4,50}=60.88$; $P=0.0001$), but not in prenatally stressed rats, in which no change in NA release was observed, neither after learning nor after memory tests (Fig. 7).

The release of NA in the control group correlated negatively with arrival latencies in the long-term memory test ($r=-0.9121$, $P=0.01$). On the other hand, arrival latencies in prenatally stressed rats in the MWM correlated negatively with the release of NA ($r=-0.9361$, $P=0.01$). In a similar way to 5-HT, corticosterone concentrations correlated negatively with NA release, both on learning days ($r=-0.9961$, $P=0.001$) and on long-term memory days ($r=-0.9999$, $P=0.001$).

Corticosterone levels

Baseline serum corticosterone concentrations in prenatally stressed animals were significantly higher than those in the control animals. After learning and memory tests in the MWM, corticosterone levels increased significantly in both groups, but were higher in prenatally stressed animals [$F_{4,50}=19.48$; $P=0.0001$] (Fig. 8). High corticosterone levels in prenatally stressed males correlated positively with their arrival latencies in the MWM on days 1 and 13 ($r=0.9754$, $P=0.01$; $r=0.8904$, $P=0.001$, respectively).

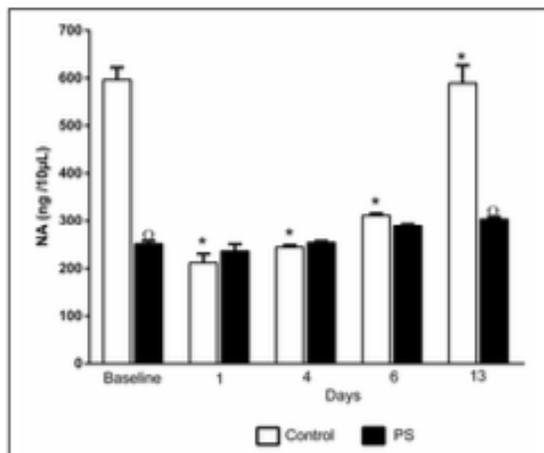


Fig. 6. NA content in the dorsal hippocampus of control and prenatally stressed animals. NA content was significantly lower in prenatally stressed males compared with control in baseline conditions and on day 13 (long-term memory), when NA content increased in control rats. No changes in dorsal hippocampus NA were observed in prenatally stressed rats. Data shown as Mean \pm S.E.M. Two-way ANOVA, $p=0.0004$. * $p=0.003$ compared to baseline control; $\circ p=0.003$ compared to each day control. Control group: $n=10$, each day. Prenatally stressed males: $n=10$ each day.

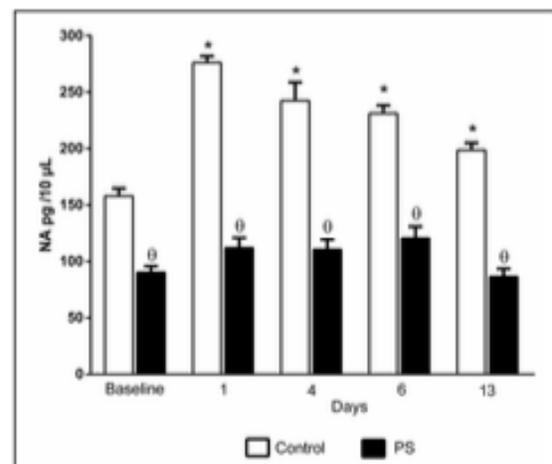


Fig. 7. NA release in the dorsal hippocampus, baseline and after the MWM. NA release in control males was higher both in baseline conditions and after learning (days 1 and 4) and memory (days 7 and 13) tests. NA release in prenatally stressed rats did not change with spatial learning and memory tests. Data shown as Mean \pm S.E.M. Two-way ANOVA. * $p=0.019$ compared to baseline control; * $p=0.006$ compared to baseline of prenatal stress group. Control group: $n=10$, each day. Prenatally stressed males: $n=10$ each day.

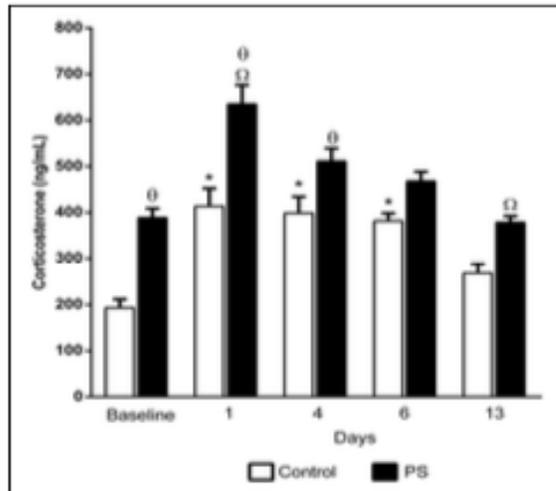


Fig. 8. Serum corticosterone concentrations in control and prenatally stressed (PS) male offspring. Baseline corticosterone concentrations in the prenatally stressed group were higher than those in the control animals. Higher corticosterone levels were observed before and after learning (days 1 and 4) and long-term memory (day 13) in prenatally stressed males. Data shown as Mean \pm S.E.M. Two-way ANOVA. * $p=0.0003$ compared with baseline control group; $^{\circ}p=0.002$ compared with the control group of each day; $^{\#}p=0.001$ compared to baseline of prenatal stress group. Control group: $n=10$, each day. Prenatally stressed males: $n=10$ each day.

DISCUSSION

The results of this study show that cognitive deficiencies in spatial learning and memory, caused by prenatal stress, are related to a decrease in 5-HT and NA release.

Low weight gain observed in pregnant stressed females is consistent with other reports, despite differences in the stress method used (Amugongo and Hlusko, 2014; Van den Hove et al., 2014; Franko et al., 2017). This can be explained by CRH release during the stress response, which also has anorexic effects, decreasing food intake in stressed rats (Carr, 2002; González-Jiménez and Schmidt Río-Valle, 2012). CRH mediates the effects of leptin, which also increases by cold water immersion stress (Konishi et al., 2006) and, together with insulin, they reduce food intake and increase energy expenditure (González-Jiménez and Schmidt Río-Valle, 2012).

The decreased body weight at birth observed in prenatally stressed rats differs from other studies (Abe et al., 2007; Zohar and Weinstock, 2011; Amugongo and Hlusko, 2014), which did not find changes in offspring weight. The differences could be explained by the type of stressor used. Low birth weight can be due to maternal glucocorticoids released during stress, as was demonstrated by the administration of dexamethasone

during the last third of gestation (Welberg et al., 2001). The increased concentration of maternal glucocorticoids could alter glucose transport to fetuses, as prenatal stress causes a decrease in the expression of placental GLUT1, GLUT3 and GLUT4 glucose transporters (Knipp et al., 1999; Mairesse et al., 2007; O'Donnell et al., 2009), thus resulting in low birth weight.

Concerning spatial learning and memory, the results of this study confirm that prenatal stress has deleterious effects, shown by longer arrival latencies. These results are consistent with other studies in which higher arrival latencies are observed in prenatally stressed male rats (Szuran et al., 2000; Weinstock, 2008; Modir et al., 2014). Other studies however, report decreased escape latencies in the MWM (Aleksandrov et al., 2001; Zuena et al., 2008) or no differences in spatial learning performance (Hayashi et al., 1998). The different results can be explained by the type of stressor used during pregnancy. In this study, cold water immersion stress was used, which has been proven to cause a more intense hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis response when applied acute or chronically, inducing prolonged activation of the adrenal axis in comparison with other stressors (Retana-Márquez et al., 2003). Immersion in cold water induces very high (more than 200%) concentrations of maternal glucocorticoids (Guerrero et al., 2016; García-Vargas et al., 2019). High concentrations of maternal corticosterone cause neuronal degeneration in the hippocampus (Sousa et al., 2000) and induce the loss of hippocampal neurons (Zhu et al., 2004), disrupt fetal hippocampus development as well as neurogenesis in adult life in males and females (Guerrero et al., 2016), retraction and atrophy of dendrites in the CA3 pyramidal neurons of the hippocampus (Conrad, 2006; Hosseini-Sharifabad and Hadinoushan, 2007), leading to cognitive deficiencies in adulthood (Luine et al., 1994; Sunanda et al., 2000). In addition to the above evidence, the results of the present study show that prenatal stress also alters 5-HT and NA during cognitive processes.

Baseline 5-HT and its metabolite (5-HIAA) content in the dorsal hippocampus were similar in control and in prenatally stressed rats. These results differ from other studies, in which prenatally stressed rats had lower 5-HT content compared to control animals (Hayashi et al., 1998; Soares-Cunha et al., 2018). This might be due to differences in the type of stressor used (crowding and saline injection, chronic unpredictable mild stress vs. immersion in cold water in the present study), activating the HPA axis differently, causing different maternal corticosteroid release, 60 ng/mL (Soares-Cunha et al., 2018) vs. 600 ng/mL by immersion in cold water (Guerrero et al., 2016) in the dark phase of cycle. Another important difference is

the age of rats at which 5-HT was evaluated: 3 weeks or 2 months in those studies, 3 months in the present study. Possibly, 5-HT turnover rate differs with age, which remains to be proven. The results of this work agree with those observed in studies in which prenatal dexamethasone exposure did not modify 5-HT content with respect to controls at 3 months of age (Muneoka et al., 1997), despite the fact that 5-HT and its metabolite were quantified in the whole hippocampus, and not in the dorsal hippocampus, which has been directly related to cognitive processes (Bannerman et al., 2004; Tanti and Belzung, 2013; Lee and Kessner, 2003; Eichenbaum, 2000). This evidence supports the idea that increased glucocorticoid levels during pregnancy could directly influence the development of central noradrenergic and serotonergic systems (Muneoka et al., 1997). Despite similarities in baseline content of 5-HT and 5-HIAA in both groups, baseline 5-HT release in the dorsal hippocampus of prenatally stressed rats was significantly lower than in control rats. In addition, baseline extracellular 5-HIAA was higher than 5-HT in prenatally stressed rats, indicating that 5-HT is metabolized to a greater degree in prenatally stressed animals. The decrease of 5-HT and its metabolite content in hippocampal homogenates of control and prenatally stressed males suggests the release of 5-HT in the dorsal hippocampus of both groups in response to the cognitive tests. This was confirmed by microdialysis data. During learning, short- and long-term memory, 5-HT release and its metabolite increased in control rats. In comparison, 5-HT was released in the dorsal hippocampus of prenatally stressed males, although to a lesser degree than in controls. The low extracellular concentrations of the metabolite in dialysates of prenatally stressed males suggest that 5-HT could have been recaptured, instead of metabolized. Probably, the hippocampal serotonin transporter is increased in prenatally stressed rats, as has been reported for prenatally stressed rats (Belay et al., 2011) and mice (Bielas et al., 2014). These data support the notion that the release of 5-HT in the dorsal hippocampus is important for learning processes and spatial memory. In prenatally stressed rats, low 5-HT release at baseline and during learning and memory tests, indicates that deficiencies in spatial cognitive performance are related to low 5-HT release, as indicated by correlation tests. These results are consistent with those reported in other studies, in which pharmacologically induced 5-HT release improves spatial memory (Glikmann-Johnston et al., 2015), while decreased release impairs it (Kuypers and Ramaekers, 2015).

Regarding NA, lower baseline content in the dorsal hippocampus of prenatally stressed rats was observed.

These results are similar to those obtained in rats from mothers in which dexamethasone was administered during pregnancy, showing lower levels of NA in the hippocampus (Muneoka et al., 1997). These alterations can be related to high maternal corticosterone release during maternal stress (Guerrero et al., 2016; García-Vargas et al., 2019), which can disrupt noradrenergic neurons in the dorsal hippocampus of fetal brains, leading to cognitive deficits in adulthood (Muneoka et al., 1997). The low content of NA observed in prenatally stressed rats at baseline, as well as during learning and spatial memory tests was related to its low release in the dorsal hippocampus, as microdialysis results showed. The increase in NA content on day 13 aside from its high release in control males could be due to the fact that NA facilitates long term potentiation (LTP) modulating synaptic plasticity (Palacios-Filardo and Mellor, 2019) and memory retrieval (Murchinson et al., 2004), mainly through the signaling of the adrenergic receptor $\beta 1$ (Schimanski et al., 2007; Grigoryan and Segal, 2016). NA enhances NMDA and AMPA glutamatergic receptor phosphorylation by PKA, thus modulating LTP (Palacios-Filardo and Mellor, 2019).

NA release correlated negatively with corticosterone during learning and memory processes. These data indicate that, in addition to 5-HT, NA release is also important for learning and memory processes, as the correlation between NA release and escape latencies during learning and memory tests shows. As far as we know, this is the first study showing that cognitive spatial deficiencies caused by prenatal stress are related to low 5-HT and NA release.

The higher baseline levels of corticosterone, as well as the higher response of HPA axis to MWM observed in prenatally stressed rats could contribute to alterations in the serotonergic and noradrenergic systems in the dorsal hippocampus, since both the MR, involved in baseline regulation of glucocorticoids (de Kloet et al., 2005; Seckl, 2007; Lupien et al., 2009) and the GR, related to the attenuation of the stress response (Groeneweg et al., 2012) are present in the hippocampus, which may interfere with acquisition and consolidation of information, reflecting low cognitive performance (Ishiwata et al., 2005; Guerrero et al., 2016).

CONCLUSIONS

Deficiencies in learning, short- and long-term spatial memory in adult prenatally stressed males are related to decreased 5-HT and NA release in the dorsal hippocampus. The high baseline levels of corticosterone, and the higher response of adrenal axis to MWM can contribute to cognitive deficits caused by prenatal stress.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors express their gratitude to Edith Monroy for her advice on the language of the text.

REFERENCES

- Abe H, Hidaka N, Kawagoe C, Odagiri K, Watanabe Y, Ikeda T, Ishizuka Y, Hashiguchi H, Takeda R, Nishimori T, Ishida Y (2007) Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurosci Res* 59: 145–151.
- Akatsu S, Ishikawa C, Takemura K, Ohtani A, Shiga T (2015) Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice. *Neurosci Res* 101: 15–23.
- Aleksandrov AA, Polyakova ON, Batuev AS (2001) The effects of prenatal stress on learning in rats in a Morris maze. *Neurosci Behav Physiol* 31: 71–74.
- Amugongo SK, Hlusko LJ (2014) Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. *Aging Dis* 5: 1–16.
- Bannerman D, Rawlins JN, McHugh S, Deacon RM, Yee B, Bast T, Zhang W-N, Pothuizen HH, Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus – memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 273–283.
- Belay H, Burton CL, Lovic V, Meaney MJ, Sokolowski M, Fleming AS (2011) Early adversity and serotonin transporter genotype interact with hippocampal glucocorticoid receptor mRNA expression, corticosterone, and behavior in adult male rats. *Behav Neurosci* 125: 150–160.
- Bielas H, Arck P, Bruenahl CA, Walitza S, Grünblatt E (2014) Prenatal stress increases the striatal and hippocampal expression of correlating c-FOS and serotonin transporters in murine offspring. *Int J Dev Neurosci* 38: 30–35.
- Bock J, Wainstock T, Braun K, Segal M (2015) Stress in utero: prenatal programming of brain plasticity and cognition. *Biol Psychiatry* 78: 315–326.
- Carr JA (2002) Stress, neuropeptides, and feeding behavior: a comparative perspective. *Integr Comp Biol* 42: 582–590.
- Conrad CD (2006) What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the Hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev* 5: 41–60.
- de Kloet ER, Otte C, Kumsta R, Kok L, Hillegerms MHJ, Hasselmann H, Kliegel D, Joëls M (2016) Stress and depression: a crucial role of the mineralocorticoid receptor. *J Neuroendocrinol* 28: 1–12.
- Eichenbaum H (2000) Cortical–hippocampal system for declarative memory. *Nat. Rev Neurosci* 1: 41–50.
- Flores O, Pérez H, Vaillades L, Morgan C, Gatica A, Burgos H, Olivares R, Hernández A (2011) Hidden prenatal malnutrition in the rat: role of β 1-adrenoceptors on synaptic plasticity in the frontal cortex. *J Neurochem* 119: 314–323.
- Franko KL, Forhead AJ, Fowden AL (2017) Effects of stress during pregnancy on hepatic glucogenic capacity in rat dams and their fetuses. *Physiol Rep* 5: e13293.
- Fujioka A, Fujioka T, Ishida Y, Maekawa T, Nakamura S (2006) Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience* 141: 907–915.
- García-Vargas D, Juárez-Rojas L, Rojas Maya S, Retana-Márquez S (2019) Prenatal stress decreases sperm quality, mature follicles and fertility in rats. *Syst Biol Reprod Med* 65: 223–235.
- Griffin AL, Eichenbaum H, Hasselmo ME (2007) Spatial representations of hippocampal CA1 neurons are modulated by behavioral context in a hippocampus-dependent memory task. *J Neurosci* 27: 2416–2423.
- Gemmel M, Rayen I, Lotus T, van Donkelaar E, Steinbusch HW, De Lallec S, Kokras N, Dalla C, Pawluski JL (2016) Developmental fluoxetine and prenatal stress effects on serotonin, dopamine, and synaptophysin density in the PFC and hippocampus of offspring at weaning. *Dev Psychobiol* 58: 315–327.
- Grigoryan G, Segal M (2013) Prenatal stress alters noradrenergic modulation of LTP in hippocampal slices. *J Neurophysiol* 110: 279–285.
- Glikmann-Johnston Y, Saling MM, Reutens DC, Stout JC (2015) Hippocampal 5-HT1A receptor and spatial learning and memory. *Front Pharmacol* 6: 289.
- González-Jiménez E, Schmidt Rio-Valle J (2012) Regulation of food intake and energy balance: factors and mechanisms involved (Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético: factores y mecanismos implicados). *Nutr Hosp* 27: 1850–1859.
- Grigoryan G, Segal M (2016) Lasting differential effects on plasticity induced by prenatal stress in dorsal and ventral hippocampus. *Neural Plast* 2016: 2540462.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol* 350: 299–309.
- Guan S-Z, Ji W-J, Jiang Y, Ning L, Lian Y-L, Liu J-W (2017) Enriched environment treatment remediated hippocampal monoamine neurotransmitters and emotional deficits in offspring induced by maternal chronic stress rat during pregnancy. *Int J Clin Exp Med* 10: 9963–9975.
- Guerrero MA, Rubio MC, Portillo W, Retana-Márquez S (2006) Tactile stimulation effects on hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory in prenatally stressed rats. *Brain Res Bull* 124: 1–11.
- Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N (1998) Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci* 16: 209–216.
- Holson RR, Pearce B (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol Theratol* 14: 221–228.
- Hosseini-Sharifabad M, Hadededoushan H (2007) Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anat Sci Int* 82: 211–217.
- Huang Y, Xu H, Li H, Yang H, Chen Y, Shi X (2012) Pre-gestational stress reduces the ratio of 5-HIAA to 5-HT and the expression of 5-HT1A receptor and serotonin transporter in the brain of foetal rat. *BMC Neurosci* 13: 22–33.
- Kuyppers KPC, Ramaekers JG (2005) Transient memory impairment after acute dose of 75mg 3,4-Methylene-dioxymethamphetamine. *J Psychopharmacol* 19: 633–639.
- Ikemoto H, Uwano K, Nishimura T, Nishi A, Ono K, Nishijo T (2015) Prenatal maternal stress due to repeated exposure to a cold environment affects development of catecholamine neurons in rat offspring: an immunohistochemical study. *J Neurol Neurophysiol* 6: 271–274.
- Ishiwata H, Shiga T, Okado N (2005) Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. *Neuroscience* 133: 893–901.
- Kapoor A, Kostaki A, Janus C, Matthews SG (2009) The effects of prenatal stress on learning in adult offspring is dependent on the timing of the stressor. *Behav Brain Res* 197: 144–149.
- Knipp GT, Audus KL, Soares MJ (1999) Nutrient transport across the placenta. *Adv. Drug Deliv Rev* 38: 41–58.
- Konishi N, Otaka M, Odashima M, Jin M, Wada I, Komatsu K, Sato T, Kato S, Matsuhashi T, Watanabe S (2006) Systemic stress increases serum leptin level. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1099–1102.
- Kulla A, Manahan-Vaughan D (2002) Modulation by serotonin 5-HT4 receptors of long-term potentiation and depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Cereb Cortex* 12: 150–162.
- Lee I, Kesner RP (2003) Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J Neurosci* 23: 1517–1523.
- Luiñe V, Villegas M, Martínez C, McEwen BS (1994) Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res* 639: 167–170.

- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10: 434-445.
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O (2007) Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *Am J Physiol Metab* 292: E1526-E1533.
- Modir F, Salmani ME, Goudarzi I, Lashkarboluki T, Abrari K (2014) Prenatal stress decreases spatial learning and memory retrieval of the adult male offspring of rats. *Physiol Behav* 129: 104-109.
- Moore RY, Halaris AE (1975) Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *J Comp Neurol* 164: 171-183.
- Muneoka K, Mikuni M, Ogasawa T, Kitera K, Kamei K, Takigawa M, Takahashi K (1997) Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 273: R1669-R1675.
- Murchison C.F, Zhang J-Y, Zhang W-P, Ouyang M, Lee A, Thomas SA (2004) Distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117: 131-143.
- Nazeri M, Shabani M, Ravandi SG, Aghaei I, Nozari M, Mazhari S (2015) Psychological or physical prenatal stress differentially affects cognition behaviors. *Physiol Behav* 142: 155-160.
- O'Donnell K, O'Connor TG, Glover V (2009) Prenatal stress and neurodevelopment of the child: focus on the HPA axis and role of the placenta. *Dev Neurosci* 31: 285-292.
- Palacios-Filardo J, Mellor JR (2019) Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 54: 37-43.
- Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press.
- Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Domínguez-Salazar E, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J (2003) Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 28: 207-227.
- Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Martínez-García R (2009) Naltrexone effects on male sexual behavior, corticosterone, and testosterone in stressed male rats. *Physiol Behav* 96: 333-342.
- Schimanski LA, Ali DW, Baker GB, Nguyen PV (2007) Impaired hippocampal LTP in inbred mouse strains can be rescued by β -adrenergic receptor activation. *Eur J Neurosci* 25: 1589-1598.
- Seckl JR (2007) Glucocorticoids, developmental 'programming' and the risk of affective dysfunction. *Prog Brain Res* 167: 17-34.
- Soares-Cunha C, Coimbra B, Borges S, Domingues AV, Silva D, Sousa N, Rodrigues AJ (2018) Mild prenatal stress causes emotional and brain structural modifications in rats of both sexes. *Front Behav Neurosci* 12: 129-144.
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OFX, Paula-Barbosa MM (2000) Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97: 253-266.
- Sunanda S, Shankaranarayana Rao BS, Rao Raju TR (2000) Chronic restraint stress impairs acquisition and retention of spatial memory task in rats. *Curr Sci* 79: 1581-1584.
- Szuran TF, Piška V, Pokorný J, Welzl H (2000) Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol Behav* 71: 353-362.
- Tanaka KF, Samuels BA, Hen R (2012) Serotonin receptor expression along the dorsal-ventral axis of mouse hippocampus. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 367: 2395-2401.
- Tanti A, Belzung C (2013) Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: Are depression and the action of antidepressants region-specific. *Neuroscience* 252: 234-252.
- Teixeira CM, Rosen ZB, Suri D, Sun Q, Hersh M, Sargin D, Dincheva I, Morgan AA, Spivack S, Krok AC, Hirschfeld-Stoler T, Lambe EK, Siegelbaum SA, Ansorge MS (2018) Hippocampal 5-HT input regulates memory formation and Schaffer collateral excitation. *Neuron* 98: 992-1004.
- Van den Hove DLA, Leibold NK, Strackx E, Martínez-Clarios M, Lesch KP, Steinbusch HWM, Schruers KRJ, Prickaerts J (2014) Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *Eur Neuro-psychopharmacol* 24: 595-607.
- Vizi ES, Kiss JP (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: Synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus* 8: 566-607.
- Weinstock M (2008) The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1073-1086.
- Weinstock M (2017) Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiol Stress* 6: 3-13.
- Welberg LA, Seckl J, Holmes M (2001) Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience* 104: 71-79.
- Williams DR, Carlsson R, Bürkner P-C (2017) Between-litter variation in developmental studies of hormones and behavior: Inflated false positives and diminished power. *Front Neuroendocrinol* 47: 154-166.
- Woodward CJH, Emery PW (1987) Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 419: 280-284.
- Zohar I, Weinstock M (2011) Differential effect of prenatal stress on the expression of corticotrophin-releasing hormone and its receptors in the hypothalamus and amygdala in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 23: 320-328.
- Zuena AR, Mairesse J, Casolini P, Cinque C, Alemà GS, Morley-Fletcher S, Chiodi V, Spagnoli LG, Gradini R, Catalani A, Nicoletti F, Maccari S (2008) Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PLoS One* 3: e2170.
- Zhu Z, Li X, Chen W, Zhao Y, Li H, Qing C, Jia N, Bai Z, Liu J (2004) Prenatal stress causes gender-dependent neuronal loss and oxidative stress in rat hippocampus. *J Neurosci Res* 78: 837-844.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00127

Matrícula: 2143800928

SEROTONINA Y NORADRENALINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y SU RELACIÓN CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA ESPACIAL. PARTICIPACIÓN DE LA CORTICOSTERONA.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 13:00 horas del día 11 del mes de junio del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ
DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ
DR. MOISES RUBIO OSORNIO
DRA. MARIA DEL CARMEN RUBIO OSORNIO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: DIANA MENDEZ GUERRERO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIANA MENDEZ GUERRERO
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ

VOCAL

DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

VOCAL

DR. MOISES RUBIO OSORNIO

SECRETARIA

DRA. MARIA DEL CARMEN RUBIO OSORNIO

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella