Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Alteraciones del sistema glutamatérgico en un modelo de estrés prenatal

Adrover, Ezequiela

2015-06-11

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

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

Cita tipo APA:
Adrover, Ezequiela. (2015-06-11). Alteraciones del sistema glutamatérgico en un modelo de estrés prenatal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Adrover, Ezequiela. "Alteraciones del sistema glutamatérgico en un modelo de estrés prenatal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-06-11.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"Alteraciones del sistema glutamatérgico en un modelo de estrés prenatal"

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

Lic. Ezequiela Adrover

Directora de tesis: Dra. Marta Cristina Antonelli

Consejero de estudios: Dr. Osvaldo Utchitel

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (CONICET)

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 11 de Junio de 2015

SINOPSIS

RESUMEN

"Alteraciones del sistema glutamatérgico en un modelo de estrés prenatal"

El estrés experimentado durante la gestación tiene un gran impacto sobre el desarrollo del sistema nervioso fetal. Esta situación altera la capacidad del organismo para enfrentar estímulos estresantes y lo hace más vulnerable a expresar trastornos comportamentales y neuropsiquiátricos como el desorden de ansiedad, la depresión y la auto-administración de drogas. La mayoría de estas alteraciones han sido atribuidas a desbalances en los sistemas de neurotransmisión del cerebro.

En los mamíferos, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central y participa en el desarrollo neuronal, en la integración de las funciones, promueve la plasticidad de las conexiones sinápticas y participa en los procesos de memoria y aprendizaje. En el sistema glutamatérgico la síntesis de glutamato, la regulación de los niveles de los receptores, la función de los transportadores y el control de la función sináptica en su conjunto dependen de la interacción entre las neuronas y las células gliales. Las alteraciones en el funcionamiento de los distintos componentes de la sinapsis glutamatérgica han sido asociadas con el desarrollo de desórdenes neurológicos como los déficits cognitivos, las psicosis, desordenes de aprendizaje y memoria, así como también con la esquizofrenia. Los estudios retrospectivos y prospectivos con humanos, al igual que las investigaciones con animales de experimentación han señalado que la exposición temprana a eventos adversos puede alterar la bioquímica del sistema glutamatérgico, así como también el comportamiento de los individuos en la edad adulta. Para evaluar el efecto del estrés prenatal sobre el metabolismo, la liberación y la captación del glutamato, se sometieron a estrés por inmovilización a ratas preñadas en su última semana de gestación. Se extrajo el cerebro de la cría adulta y se utilizaron la corteza frontal y el hipocampo para medir la síntesis de glutamato, los niveles de los receptores y de los transportadores del sistema y su función. Los resultados de los ensayos, que se exponen en este trabajo, indicaron que el estrés gestacional afecta los niveles de expresión de los trasportadores de glutamato en el cerebro de las crías macho, aumentando la cantidad de vGluT-1 en la corteza frontal y elevando el ARN mensajero y la proteína de GLT1 en el hipocampo. Paralelamente se registró en estos individuos un aumento de la recaptación de glutamato en la corteza frontal efecto que

no se observó en el hipocampo. Estos cambios demuestran que la influencia del estrés gestacional es específica para cada área del cerebro y que produce cambios a largo plazo que alteran el sistema de neurotransmisión glutamatérgica.

Palabras claves: estrés prenatal, sistema glutamatérgico, transportadores de glutamato, ratas Wistar.

ABSTRACT

"Impairment of the glutamatergic system in a prenatal stress model"

Prenatal stress exerts a strong impact on fetal brain development in rats impairing adaptation to stressful conditions, subsequent vulnerability to anxiety, altered sexual function, and enhanced propensity to self-administer drugs. Most of these alterations have been attributed to changes in the brain neurotransmitter systems.

Glutamate is the principal excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system, participating in the integration of brain function and in synaptic plasticity, memory and learning processes. The glutamatergic normal function depends on the interactions between neurons and surrounding astroglia. This relationship is necessary for the synthesis of the amino acid, the regulation of the receptors and transporters levels and for the control of synaptic transmission. Due to this particular characteristic this brain system is considered a tri-partite synapse. Dysfunction of different components of the glutamatergic system, such as receptors, transporters and glutamate levels have been associated with development of several neurological disorders, e.g. cognitive deficits, psychosis, memory and learning problems, and schizophrenia. Evidences provided by animal research, as well as retrospective and prospective studies in humans, pointed out that exposure to adverse events in early life can alter adult behaviors and neurochemical indicators of glutamate activity, suggesting that the development of the glutamatergic system is sensitive to disruption by exposure to early stressors. To study the effect of prenatal stress on the glutamate metabolism, release and uptake pregnant rats were subjected to restrain stress during the last week of gestation. Brains of the adult offspring were used to assess glutamate synthesis and levels, as well as expression and function of glutamate receptors and transporters. While glutamate metabolism was not affected it was found that prenatal stress changed the expression of the transporters, thus, producing a higher level of vesicular vGluT-1 in the frontal cortex and elevated levels of GLT1 protein and messenger RNA in the hippocampus of adult male prenatally stressed offspring. In these animals, we also observed increased uptake capacity for glutamate in the frontal cortex. On the other hand, no such changes were observed in the hippocampus brain area. The results show that changes mediated by gestational stress on the adult glutamatergic system are brain region specific. Overall, prenatal stress produces long-term changes in this system that altered the synaptic transmission of the adult brain.

Key words: prenatal stress, glutamatergic system, glutamate transporters, Wistar rat.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me acompañaron en este camino y que, de distintas maneras, me ayudaron a llegar hasta aquí, gracias! En especial, muchas gracias a:

- La Dra. Marta Cristina Antonelli, por haberme recibido en tu laboratorio y por estar presente en cada pasó de esta tesis. Por abrir, para mí, un montón de puertas y oportunidades profesionales.

- María Eugenia Pallares, mi hermana del alma… por ser mi mano derecha, por contagiarme tu inagotable perseverancia y tu excelencia profesional. Por tu empuje y tu aliento constantes. Por sostener mi mano en los tiempos difíciles, por ser mi confidente y por celebrar conmigo los buenos momentos. Por tu amistad incondicional te voy a estar por siempre agradecida.

- Susana Buglione, por ser una excelente profesional pero por sobre todo, por tu compañerismo incondicional en cada momento, en cada charla, mi inagotable intermediaria. Por tu paciencia y tus consejos de madre, por hacer de este grupo una hermosa familia.

- Javier Baier, por ser tan excelente maestro. Por tus infinitas ideas, soluciones y recomendaciones. Por el aguante y por hacer tan, pero tan divertido nuestro tiempo en el labo. Por tu amistad y las risas, gracias amigo!

- María Rosa Katunar, mi primer compañera… gracias por tu ayuda y por compartir conmigo tu experiencia. Por estar junto a mí en esos primeros experimentos, por tus enseñanzas y por alentarme siempre!

- Viviane Link, por tus buenas ideas, por tu alegría y por las charlas compartidas. Por estar siempre presente, aunque fuese desde lejos.

- Los profesionales que brindaron su apoyo para realizar este trabajo:

  - A Martin Brahamian, por tu compañerismo y por tanto esfuerzo para cuidar de nuestros animales. Por tu gran aporte a este estudio, gracias!

  - A todos los integrantes del IQUFIB, por brindarme un espacio de trabajo durante toda esta tesis. En especial a Roció y Vicky, por toda la buena onda y ayuda a lo largo de todo este tiempo.

  - A Arne Schousboe, Helle Wagepetersen, Karsen Mansen, Lene Vigh y Kamilla Pajecka por recibirme en su laboratorio. Por su calidez, su apoyo y todas las enseñanzas que aportaron a la realización de este trabajo.

  - A Marcela Brocco y Melisa Monteleone por su gran colaboración y tanta ayuda en los experimentos.

  - A Alicia Brusco por darnos un espacio en su instituto y por estar siempre presente para colaborar con nuestro laboratorio. Y a los técnicos de microscopia electrónica, Sabrina y Carlos, por las horas de fotos!

  - A Ricardo Cabrera, Fernando Giulliani y a todos los chicos del labo en Mendoza, por haberme recibido como una integrante más del equipo. Por todo su entusiasmo por enseñarme y toda la ayuda prestada para mis experimentos.

  - A Mario Herrera Masconavich y a Paola Morales, por recibirme en su laboratorio y aportar tanta experiencia a mi formación.

  - A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA por mi formación en biología y en el ámbito de la ciencia.

- Mi familia y amigos:

    - A José Luis y Norma, mis papás, por su amor y su apoyo incondicional. Por educarme para elegir libremente pero acompañándome en cada paso de mi vida. Por siempre, GRACIAS! A mis hermanos Mari, Vero y Luis por ser tan buenos compañeros de vida, por el ejemplo y el amor, por estar siempre a mi lado. A *Chacha*, la mejor abuela que pude elegir, por tantos mimos y amor. A Marian, mi amiga incondicional, por tu apoyo constante y por tantas palabras de aliento, por tantas horas de charlas y tantas aventuras de vida, por tanto cariño. A Luke, mi compañero del alma, por tu fe en mí desde el primer día, por animarme siempre a hacer lo que quiero, por bancarme cada día, cada momento, por hacerme mejor persona con tanto amor, gracias por ser mi mejor viaje!

    - A Juan, Sol Y Yoyo, por sus consejos y por su amistad. Por tantas horas de estudio y tantos momentos de apoyo que hicieron posible que llegara hasta acá.

ÍNDICE

SINOPSIS

Resumen **I**

Abstract **III**

AGRADECIMIENTOS **V**

ÍNDICE **1**

ABREVIATURAS **4**

INTRODUCCIÓN

1. Sistema nervioso 6
   - 1.1. Características del sistema nervioso 6
   - 1.2. Componentes del sistema nervioso 8
   - 1.3. Células del sistema nervioso 8
   - 1.3.1. Neuronas 8
   - 1.3.2. Glía 10
   - 1.4. Neurotransmisores 12
   - 1.5. Áreas del sistema nervioso 14
   - 1.5.1. Corteza 14
   - 1.5.2. Hipocampo 16
2. Sistema glutamatérgico 18
   - 2.1. El glutamato 18
   - 2.2. Receptores glutamatérgicos 21
   - 2.3. Transportadores de glutamato 24
   - 2.3.1. Transportadores de la vesícula sináptica 24
   - 2.3.2. Transportadores glutamatérgicos de membrana plasmática 25
3. Fisiología del estrés 29
   - 3.1. Estrés prenatal 33
   - 3.2. El estrés prenatal en estudios con humanos 34
   - 3.3. El estrés prenatal en modelos animales 36
   - 3.3.1. Efectos del estrés gestacional sobre parámetros conductuales 37
   - 3.3.2. Efectos del estrés prenatal sobre la morfología y función del sistema nervioso 38

OBJETIVOS **42**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales utilizados 44
1.1. Drogas y reactivos 44
1.2. Anticuerpos 45
1.3. Equipos 45
2. Métodos empleados 45
2.1. Modelos de estrés prenatal 45
2.1.1. Preparación de los animales experimentales 45
2.1.2. Estrés por inmovilización 46
2.2. Cromatografía liquida y espectrometría de masa 47
2.3. Método de superfusión 48
2.3.1. Preparación de las áreas cerebrales 48
2.3.2. Superfusión 48
2.4. Expresión de proteínas y niveles de ARN mensajero 49
2.4.1. Western blot 49
I. Electroforesis 49
II. Marcación para receptores glutamatérgicos 50
III. Marcación para glutamina sintetasa 50
IV. Marcación para transportadores glutamatérgicos 50
2.4.2. Método de Bradford 50
2.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa con trascripción reversa, método cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR) 52
2.4.4. Inmunohistoquímica 54
I. Preparación del tejido 54
II. Inmunomarcación 55
III. Inmunofluorescencia 56
IV. Inmunomarcación para microscopia electrónica de transmisión 56
2.5. Captación de glutamato 58
2.5.1. Preparación de gliosomas y sinaptosomas 58
2.5.2. Medición de glutamato capturado 59
2.5.3. Método de Lowry 60
3. Análisis estadístico 60

RESULTADOS

1. El metabolismo del glutamato en el modelo de estrés gestacional 62
2. Liberación evocada del neurotransmisor glutamato en las crías EP adultas 65
3. Efecto del estrés gestacional sobre el transportador vesicular, vGluT-1 67
   3.1 Morfología de la sinapsis glutamatérgica 71
4. Los receptores NMDA y AMPA en las crías EP adultas 74
5. Los transportadores glutamatérgicos gliales y la enzima glutamina sintetasa en el modelo EP 76
   5.1. Niveles de la enzima glutamina sintetasa 76
   5.2. Efectos del EP sobre GLT1 Y GLAST 78
6. Efecto del EP sobre la función de los transportadores glutamatérgicos en las crías adultas 81

DISCUSIÓN

1. Estudio del metabolismo glutamatérgico en el modelo de estrés prenatal 85
2. Efecto del estrés gestacional sobre el transportador vGluT-1 y la liberación del neurotransmisor glutamato. 87
3. Evaluación de los receptores glutamatérgicos en las crías EP 89
4. El estrés prenatal genera cambios en los niveles de los transportadores gliales y en su función 92
5. Crías machos y hembras en el modelo de estrés gestacional 94

CONCLUSIÓN **96**

BIBLIOGRAFÍA **98**

ABREVIATURAS

11β-HSD: 11β- hidroxiesteroide deshidrogenasa
µM: micro molar
^{13}C: 13-carbono
5-HT: serotonina
ACTH: hormona corticotrofina
Ach: acetilcolina
ADN: ácido desoxirribonucleico
AMPA: α-amino-3-hidroxi-5-metillisoxazol-4-propionato
AMPc: 3'5'- monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA: análisis de la varianza
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
BRK: buffer Krebs-Ringer
C: control
CA: *cornu ammonis*
CAM: quinasa calcio calmodulina
CF: corteza frontal
col: colaboradores
CREB: elemento de unión por respuesta a AMPc
CRH: hormona liberadora de corticotrofina
CRHp: hormona liberadora de corticotrofina placentaria
DA: dopamina
DHDA: desorden de hiperactividad y déficit de atención
DHK: dihidrocainato
DPN: día postnatal
DO: densidad óptica
DOR: densidad óptica relativa
EAAC: transportador de aminoácidos
EAAT: transportados de aminoácidos excitatorios
ECL: reactivo de quimioluminiscencia enzimática
EP: estrés prenatal
GABA: ácido γ-aminobutírico
GC: glucocorticoides

GD: giro dentado
GLAST: transportador de glutamato/ aspartato
Gln: glutamina
GLT1: transportador de glutamato 1
Glu: glutamato
GS: glutamina sintetasa
HHA: hipotálamo hipofisario adrenal
HPC: hipocampo
KA: kainato
LTD: depresión de largo termino
LTP: potenciación de largo termino
mA: miliamperios
MAP: proteína activada por mitógenos
MC: mineralocorticoide
NA: noradrenalina
NMDA: N-metil-D-aspartato
NT: neurotransmisor
PAG: glutaminasa
PBS: buffer fosfato salino
PKA: proteína quinasa A
PKC: proteína quinasa C
SDS: dodecilsulfato sódico
SFB: suero fetal bovino
SN: sistema nervioso
SNA sistema nervioso autónomo
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
TBOA: DL-treo-β-benziloxiaspartato
TBS: buffer tris-salino
TCA: ácido tricarboxílico
UV: ultravioleta
V: volts
VGluT: transportador vesicular de glutamato
VSP: vasopresina

INTRODUCCIÓN

1. Sistema nervioso

Toda la información referente al mundo que nos rodea es conducida hacia el cerebro por un complejo sistema sensorial. La atención, la conciencia, la experiencia emocional son funciones del sistema nervioso (SN). La memoria, el pensamiento, la capacidad de crear son funciones neuronales superiores, así como también lo son el control de la actividad motora, visceral, endócrina y somática. Diversas clases de receptores actúan como transductores de los estímulos físicos y químicos del ambiente, transformándolos en impulsos nerviosos que el cerebro interpreta y da significado. La capacidad de discriminar entre estímulos de diferentes modalidades es la base del aprendizaje (Carpenter, 1985).

1.1. Características del sistema nervioso

La función nerviosa en los animales es tan primitiva como los Cnidarios, quienes presentan una sola neurona multifuncional que capta y procesa las señales ejerciendo control y coordinación sobre el organismo. Esto otorgó a los animales pluricelulares la capacidad de interactuar eficazmente con su medio ambiente. Posteriormente surgieron dos tipos neuronales: las neuronas aferentes y las eferentes. Con el cambio evolutivo se fueron agregando intermediarios entre estos dos grupos, como las interneuronas y los circuitos plásticos, dando base a la formación de un SN con cefalización en el cual los componentes del sistema se concentraron en puntos estratégicos del organismo. Este rasgo evolutivo, que comenzó en los platelmintos, potenció la capacidad integradora del sistema y dio origen al SN central como se presenta en los vertebrados (Netter y Brass, 1994, Hill y col., 2004).

En los mamíferos, el SN se compone de dos estructuras mayores bien diferenciadas: el sistema nervioso periférico (SNP) y el sistema nervioso central (SNC). Ambos sistemas se diferencian anatómicamente, pero funcionan de forma integrada. El SNP está constituido por los nervios espinales y craneales que conectan al SNC con los diferentes sistemas de órganos y con las extremidades del cuerpo. Mediante este conjunto de nervios el sistema regula e integra la información sensorial con las respuestas motoras y controla las funciones autónomas del cuerpo, como la actividad de los músculos lisos, la función de músculos cardiacos y la función visceral (Kandel, 2000).

Por sus características anatómicas el SNC se puede separar en dos componentes: la medula espinal y el encéfalo. La medula espinal recibe y procesa la información sensorial, controla el movimiento del tronco y se comunica con el tallo cerebral.

Por su parte, el encéfalo se compone de tres partes fundamentales:

1. El romboencéfalo o cerebro posterior, constituido por el bulbo raquídeo, la protuberancia y el cerebelo. El bulbo raquídeo contiene centros de funciones autónomas, la protuberancia reúne información sobre movimiento que llega desde el telencéfalo y por último el cerebelo modula la fuerza, el movimiento, y coordina el aprendizaje de actividades motoras (Jessel, 1997).

2. El mesencéfalo o cerebro medio, está situado por encima de la protuberancia. Controla varias funciones sensoriales y motoras, como los movimientos oculares y los movimientos de los músculos esqueléticos. También funciona como una estación de relevo de señales auditivas y visuales. (Jessel, 1997).

3. El prosencéfalo o cerebro anterior, formado por el diencéfalo y los hemisferios cerebrales (telencéfalo). El diencéfalo está integrado por el hipotálamo y el tálamo, que a su vez están conectados entre sí. Ambos, regulan funciones endocrinas procesan información de todo el SNC: el tálamo distribuye información motora y sensorial hacia la corteza cerebral, mientras que el hipotálamo regula al SN autónomo y la secreción hormonal de la hipófisis. Los hemisferios se definen por una capa externa de circunvalaciones que constituyen la corteza cerebral y por una capa profunda donde se encuentran los ganglios básales, el hipocampo y la amígdala. Los hemisferios están separados por un surco fronto-dorsal que los determina como izquierdo y derecho en forma especular. Cada lado tiene funciones especializadas pero siguen asociados para la regulación de funciones motoras y cognitivas. Los ganglios básales participan en la regulación motora extra-piramidal. El hipocampo es fundamental en los procesos de memoria y aprendizaje, mientras que la amígdala coordina respuestas autónomas y endocrinas ante estímulos emocionales. Por último, la corteza cerebral interviene en una gran variedad de procesos sensoriales, motores y cognitivos (Estrada Flores y Uribe Aranzábal, 2002).

1.2. Componentes del sistema nervioso

El SN se compone de diferentes grupos celulares y un sistema vascular especializado. Los grupos celulares se pueden dividir en neuroglia y neuronas. La neuroglía reúne a los astrocitos, oligodendrocitos y la microglía ubicadas en el SNC mientras que en el SNP se encuentran las células de Schwann y las de Müller. Las neuronas, por su parte, son células especializadas que extienden sus procesos formando una compleja red. Las células gliales rodean y asisten a las neuronas pero también responden a señales e interactúan con las mismas. Por la disposición de las células, el SNC se caracteriza por tener dos áreas tisulares: hacia la periferia del órgano, en su parte más externa, se distingue la presencia de núcleos neuronales y glía que se designan como sustancia gris, por su coloración más oscura. Por debajo y hacia el interior del cerebro se extienden los axones que recubiertos por mielina (componente lipídico externo a la membrana plasmática) dan un color blanco al tejido y conforman la sustancia blanca del cerebro. A lo largo del eje nervioso, en la médula espinal la disposición del tejido se invierte, siendo la sustancia blanca quien queda externamente delimitando a la sustancia gris (Siegel y Agranoff, 1999).

Independientemente de cómo se lo divida para su conocimiento, el SN trabaja como un conjunto donde diferentes regiones están especializadas en diferentes funciones y paralelamente varias de estas funciones sensoriales, motoras y cognitivas son sostenidas por conjuntos de vías nerviosas. Esta forma de organización, hoy se conoce como el principio de “procesamiento de distribución paralela” e implica que cuando una región o vía neuronal se dañe, otras podrán compensar parcialmente su función. Esta compensación en los sistemas podría evitar cambios fisiológicos o comportamentales que pongan en riesgo la supervivencia del organismo (McClelland, 1994).

1.3. Células del sistema nervioso

1.3.1. Neuronas

Este tipo de células son las unidades básicas del encéfalo y dado que son las más variables del organismo, desafían las clasificaciones en morfología, locación y función. Pueden tener funciones sensoriales, motoras o secretoras, y sus efectos pueden ser excitatorios, inhibitorios y/o moduladores. Son influenciadas por una

variedad de factores químicos, como neurotransmisores y hormonas, al igual que por factores físicos como los contactos célula a célula. Estas características especiales en conjunto con la influencia de los factores externos durante el desarrollo, determinan su crecimiento, sus conexiones y la formación de una compleja red de transmisión de información (Siegel y Agranoff, 1999).

La descripción morfológica básica de una neurona incluye cuatro regiones diferenciadas de la célula: el soma, las dendritas, el axón y sus terminales sinápticas. El soma es el centro metabólico celular y contiene al acido desoxirribonucleico (ADN) que codifica la información genética de la célula. Desde el soma se proyectan las dendritas proporcionando la vía de entrada de las señales que llegan a la neurona. También, desde esta estructura principal, se forma el axón que constituye la vía de salida de las señales desde el cuerpo celular. Esta extensión se puede contactar con fibras de tejidos, glándulas o con otras neuronas y en este último caso el contacto se denomina sinapsis.

Las neuronas se diferencian de otras células por su excitabilidad, es decir, pueden experimentar cambios transitorios en la permeabilidad de la membrana plasmática que generan un cambio del potencial eléctrico. El potencial de membrana es producido por la diferencia en la concentración de los iones que están a ambos lados de la misma y por su permeabilidad selectiva. En el caso de una célula inactiva el potencial de la membrana es de valor negativo y cuando una señal estimula la neurona, se abren canales iónicos que generan un cambio en el potencial volviéndolo positivo y despolarizando la célula rápidamente. Este cambio de polaridad es la base para la generación de un potencial de acción, que es la forma de transmisión de impulsos utilizada por las neuronas. Cuando los canales iónicos se inactivan la membrana vuelve a su potencial de reposo y la transmisión de la señal finaliza (Schwartz, 1997, Kandel y Siegelbaum, 1997).

La célula que trasmite la señal se denomina célula presináptica, y la que recibe la señal célula postsináptica. Las terminales presinápticas se acercan a las dendritas de la neurona postsináptica sin contactarlas, dejando un espacio de separación entre las dos células denominado espacio sináptico. En las sinapsis químicas no hay continuidad estructural entre las neuronas. Las neuronas presinápticas, sirven como lugar físico para la transmisión y es en sus terminales donde la señal eléctrica se transforma en química. Las terminales presinápticas contienen conjuntos de vesículas con un alto número de moléculas específicas denominadas neurotransmisores, que

actúan como agentes químicos de la transmisión. Ante la llegada del impulso eléctrico las vesículas liberan sus neurotransmisores al espacio sináptico, como respuesta al flujo aumentado de iones de calcio (Ca^{2+}) que se produce como consecuencia del potencial de acción (Kandel y Siegelbaum, 1997).

1.3.2. Glía

En el SNC de los vertebrados la proporción entre neuronas y glía es de 1 a 10 células, respectivamente y puede alcanzar una relación de hasta 1 a 50. La glía sigue un desarrollo ontogénico diferente al de las neuronas y permanecen menos diferenciadas conservando una gran capacidad mitótica. Sus funciones varían en un amplio rango, desde dar sostén físico y apoyo nutricional a las neuronas hasta participar activamente en la neurotransmisión de señales.

Las células gliales se clasifican en dos grandes grupos: microglía y macroglía. La microglía controla el tejido mediante señales neuronales y conforma el principal inmunocomponente del SN. Está constituida por fagocitos que participan en la conservación de la homeostasis y son los que actúan luego de una injuria, infección, o enfermedad. La macroglía está conformada por tres tipos de células: las células de Schwann en la periferia, los oligodendrocitos y los astrocitos en el SNC. Las células de Schwann se ubican en el SNP, rodeando los axones que conforman los nervios periféricos. Estas células cumplen múltiples funciones: protección, soporte metabólico, regeneración de lesiones y principalmente son las productoras de la mielina que funciona como un aislante eléctrico para los nervios y facilita la rápida transmisión de impulso nervioso entra ellos (Welsch, 2008). Los oligodendrocitos se encuentran en el SNC, presentan cuerpos celulares pequeños y prolongaciones delgadas. Se disponen mayormente en hileras a lo largo de los axones neuronales y son responsables de la formación de la vaina de mielina sobre estos. También rodean cuerpos neuronales dando sostén a las células. Por último, los astrocitos son los principales componentes de la glía, son células ectodérmicas derivadas de la glía radial y se producen en las primeras etapas del desarrollo. Presentan cuerpos celulares estrellados e irregulares y prolongaciones relativamente largas que forman los llamados pies terminales. Estas prolongaciones se sitúan sobre la superficie de nervios del encéfalo y de la medula espinal, pueden contactar los vasos sanguíneos y establecer uniones estrechas con las células endoteliales como ocurre, por ejemplo, en la barrera hematoencefálica

(Kandel, 1997). La posición estratégica de los astrocitos, ubicados entre los elementos vasculares y las neuronas, les permite vehiculizar nutrientes, lo que les otorga una función nutricional, pueden entrelazarse con las neuronas proporcionando soporte estructural, y se encargan de la detoxificación de los fluidos del cerebro (Raviola y Mazzarello, 2011). En la actualidad se conoce que los astrocitos también cumplen con las siguientes funciones: a) guían la migración de las neuronas y orientan el crecimiento de sus prolongaciones durante la ontogénesis (Hatten, 1985, 1990), b) se vuelven fagocíticos en respuesta al trauma cerebral, c) pueden proliferar e hipertrofiarse en respuesta a una injuria (Brusco y col., 1997), d) proveen factores tróficos para las neuronas (Schwartz y Mishler, 1990), e) almacenan glucógeno como una reserva de energía en el cerebro (Magistretti, 1988), f) re-captan y liberan sustancias neuroactivas (Kimelberg y Katz, 1985), y h) participan en la respuesta inmunológica del cerebro (Giulian y Lachman, 1985). El uso de cultivos primarios ha puesto en evidencia que estas células tienen el potencial para realizar diversidad de funciones y que probablemente presentan la capacidad de cambiar de función según las variaciones que sufra su entorno. Por ejemplo, durante el desarrollo, los precursores de los astrocitos son células con prolongaciones largas que forman fibras radiales que guían a las neuronas durante la migración, luego, retraen sus procesos y se desarrollan como astrocitos protoplasmáticos (Culican y col., 1990). En el cerebro adulto, la morfología de la astroglía puede sufrir cambios marcados en respuesta a injurias neuronales (Gomez y col., 1990).

Los cambios en la funcionalidad de la astroglía influyen sobre la función de las neuronas que se encuentran a su alrededor. La principal actividad de las células astroglíales se centra en su capacidad para censar el comportamiento neuronal a través de cambios en el medio extracelular y responder a estos cambios de manera tal que se mantenga una homeostasis que permita la normal actividad neuronal (Tsacopoulos y Magistretti, 1996). Esta característica de los astrocitos se debe a la presencia de una diversidad de receptores en su membrana como los receptores asociados a proteína G (van Calker y col., 1980) que utilizan como segundos mensajeros al 3'5'- monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) y al Ca^{2+} (McCarthy y de Vellis, 1978, McCarthy y Salm, 1991). La activación de receptores astroglíales puede conducir a cambios en la morfología (Kimelberg y col., 1978) en la expresión de genes tempranos (Arenander y col., 1989), en la regulación del contenido de glucógeno y de enzimas metabólicas (Magistretti, 1988), en la liberación de factores neurotróficos y

transmisores (Schwartz y Mishler, 1990, Schwartz y col., 1992) y en la proliferación celular (Ashkenazi y col., 1989).

1.4. Neurotransmisores

Los neurotransmisores (NT) son biomoléculas, generalmente de bajo peso molecular, que son liberados selectivamente por una terminal neuronal. Se descargan en el espacio sináptico y son capaces de combinarse con sitios especializados de las neuronas postsináptica denominados receptores. Los NT son sintetizados en el soma neuronal y transportados a las terminales axónicas o pueden sintetizarse en las mismas terminales de las neuronas por la acción de enzimas específicas y en algunos casos con participación incluso de las células gliales. Son almacenados en vesículas denominadas vesículas sinápticas y permanecen en ellas hasta la llegada de un estímulo señal que promueva su liberación. Generalmente la liberación es por exocitosis dependiente de Ca^{2+}. El calcio aumenta en respuesta al estímulo y activa la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática. Este proceso es posible gracias a la acción conjunta de proteínas especializadas como la enzima calmodulina, que activada por el catión Ca^{2+} fosforila a sinapsina I que desde la membrana vesicular se une a los filamentos de actina en el citoplasma permitiendo el traslado de la vesícula. Luego el complejo SNARE (conjunto de proteínas como la sinaptobrevina, la sinaptofisina y sintaxina) se encarga de la fusión entre las membranas, liberando el NT al espacio extracelular (Davidsson y col., 1999). El contenido de las vesículas sinápticas es cuántico y en el caso de algunos NT hay una liberación basal constitutiva de este contenido, por ejemplo en el sistema glutamatérgico. Esta liberación no es suficiente para activar a la postsinapsis por lo que no hay transmisión de impulsos nerviosos en este proceso (Meldrum, 2000).

Cuando los NT activan a sus receptores específicos, inician una cascada de señales que genera una respuesta en la neurona postsináptica, mediante modificación de canales iónicos o la activación de segundos mensajeros. Esta respuesta puede ser excitatoria produciendo una despolarización de la postsinapsis o inhibitoria promoviendo una hiperpolarización de la neurona. De esta manera el efecto del NT no depende de las propiedades químicas de la molécula transmisora, sino más bien de las propiedades de los receptores que la reconocen (Kandel y Siegelbaum, 1997) que transformarán al mensaje codificado por la molécula de neurotransmisor en una

respuesta fisiológica específica (Estrada Flores y Uribe Aranzábal, 2002). Así el gran número de neuronas que se encuentran en el SN puede diferenciarse, no solo por su morfología y sus contactos sinápticos, sino también por los NT que sintetizan y por los receptores específicos que se encuentran en la membrana neuronal (De Robertis y col., 1996). Cuando el NT activa sus receptores postsinápticos, también se activan, en paralelo, auto-receptores y transportadores neuronales y gliales que lo re-capturan desde el espacio sináptico. A su vez, también se activan enzimas extracelulares que degradan o inactivan las moléculas libres de NT. Este proceso permite rápidamente terminar con la neurotransmisión permitiendo que otro estímulo pueda activar nuevamente al sistema.

En los humanos, se ha comprobado que las alteraciones en la síntesis, almacenamiento, liberación o inactivación de los NT, así como las variaciones en sus receptores pueden modificar la neurotransmisión podrían ser la base de diversos trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, la depresión y el síndrome de ansiedad, entre otros (Pasquini y col., 2014).

Los principales NT en el cerebro son:

- Acetilcolina (Ach): integra el sistema colinérgico. Se localiza principalmente en las neuronas motoras que integran la unión neuromuscular, pero también en la corteza cerebral y en neuronas pre-ganglionares del sistema simpático y parasimpático. Entre sus funciones regula la actividad cardiovascular y pulmonar, también aumenta la secreción glandular en el tracto gástrico y a nivel cutáneo (Contestabile, 2011).

- Noradrenalina (NA): Es el principal neurotransmisor de las neuronas postganglionares simpáticas. Se encuentra en el sistema límbico, en el hipotálamo y también en la corteza cerebral. Participa en el desarrollo del cerebro y es clave en las funciones de vigilia y la respuesta a situaciones de estrés (Norton y col., 2002).

- Dopamina (DA): Es el neurotransmisor del sistema dopaminérgico. Se encuentra en las neuronas que forman la substancia *nigra* y el área tegmental ventral principalmente, y en el hipotálamo. Su principal función es la regulación de las respuestas a situaciones emocionales, pero también participa en el circuito de recompensa, en la formación de memoria y el aprendizaje, entre otras (Giardino y col., 1998).

- Serotonina (5-HT): Se encuentra en las neuronas serotoninérgicas de la protuberancia cerebral y el mesencéfalo, principalmente. Tiene un papel principal en la regulación del apetito y la actividad motora, en las funciones de percepción y

cognitivas. También actúa a nivel periférico controlando el sistema intestinal (Olivier y col., 1998).

- Glutamato (Glu): es un NT excitatorio. Está presente en todas las áreas del cerebro principalmente en la corteza, el hipocampo y el cerebelo. También actúa en el SNP a nivel de la medula espinal y en diversos órganos. Entre sus funciones principales se encuentran la formación de la memoria y la modulación del aprendizaje (Meldrum, 2000).

- Ácido γ-aminobutírico (GABA): Es el principal NT inhibitorio del SNC. Se encuentra en interneuronas corticales y vías de proyecciones largas, pero su mayor concentración se encuentra en el cerebelo. Actúa en etapas tempranas del desarrollo en la proliferación y maduración de sinapsis (Owens y Kriegstein, 2002).

1.5. Áreas del sistema nervioso central

1.5.1. Corteza

La corteza cerebral es la porción de sustancia gris que cubre los hemisferios del cerebro (figura 1). La ontogénesis neuronal de la corteza sigue una precisa secuencia de eventos. Todas las neuronas se generan a lo largo de la superficie ventricular, en la zona marginal y migran, luego de varias divisiones mitóticas, a la placa cortical donde se organizan desde el interior hacia el exterior y maduran en ese mismo sentido. El proceso de formación y desarrollo de la corteza empieza tempranamente en el embrión pero continúa posnatalmente, incluso hasta la adultez, por lo que perturbaciones en distintas etapas del desarrollo cerebral, podrían inducir alteraciones en los patrones cerebrales y sus funciones. La densidad de contactos sinápticos aumenta progresivamente con el desarrollo llegando hasta la infancia, mientras que durante el periodo de adolescencia la cantidad de sinapsis disminuye drásticamente en un proceso madurativo llamado poda o *pruning* (por su término en inglés). Durante este período se eliminan sinapsis poco activas como un refuerzo madurativo para darle lugar al mantenimiento de sinapsis maduras que formaran patrones de conectividad más precisos (Nelson y Luciana, 2001).

Las células nerviosas de la corteza se disponen en seis capas, siendo las neuronas más superficiales las ultimas en establecer sus funciones. Histológicamente se distinguen cinco tipos celulares en la corteza: neuronas piramidales, células granulosas, células fusiformes, células de Cajal y las células de Martinotti, que se

organizan y disponen específicamente formando seis capas bien diferenciadas: la molecular, la granular externa, la piramidal externa, la granular interna, la ganglionar y la multiforme.

La organización funcional de la corteza no muestra una simetría como su parte anatómica. Cada hemisferio muestra variaciones funcionales y en cada una de sus capas la corteza recibe aferencias de otras estructuras del cerebro como, el tálamo, el hipocampo e incluso desde otras capas corticales. También envía eferentes a distintos puntos de SN como los ganglios básales, otras capas corticales y a la medula espinal. La organización en capas de la corteza le provee eficiencia en el procesamiento de los impulsos nerviosos y el intercambio de información con todo el cerebro, es por esta organización que se produce una subdivisión de la corteza en campos de sistemas neuronales que funcionan como mapas de las funciones cognitivas y motoras. La superficie de la corteza es especie-específica y varia, no solo con el tamaño del cerebro sino que también cambia con la presencia de adaptaciones específicas, donde se incrementa la complejidad del mapa neuronal y su correspondiente sistema sensorial (Takahashi y col., 2001).

Anatómicamente esta área cerebral se divide en cuatro lóbulos: el frontal, el lóbulo parietal, el lóbulo occipital y el temporal. Particularmente, en los mamíferos, la corteza frontal (CF) participa en procesos de pensamiento y razonamiento, en la planificación de comportamientos cognitivos complejos y en la toma de decisiones. Esta área se especializa en la regulación de “acciones”, como el movimiento ocular, la expresión de emociones, el razonamiento y el habla y cada una de estas acciones está representada en forma de un mapa neuronal. Toda su función se basa en la cooperación con otras partes de la corteza, posee extensas conexiones recíprocas con el tálamo, el sistema límbico y el hipotálamo, con áreas subcorticales y áreas del sistema autónomo. A medida que los organismos fueron evolucionando, la CF sufrió un incremento en su área relativa y este cambio no ocurrió de forma homogénea: la porción lateral, esencial para las funciones cognitivas, se desarrolló en mayor grado que la parte orbital, necesaria para la formación de emociones. La CF es la parte de la corteza cerebral que puede establecer configuraciones temporales que permiten adquirir nuevas secuencias comportamentales coordinando experiencias previas (Fuster, 2001). Una de las principales funciones de esta área se define como memoria ejecutiva que involucra tareas como el planeamiento y la toma de decisiones, más la actividad de la memoria de trabajo que es necesaria para la organización y realización

de acciones en el plazo inmediato (Miller y Cohen, 2001). Para el cumplimiento de estas operaciones la CF se conecta con otras áreas del cerebro y recibe señales de las mismas que activan los distintos sustratos neuronales del área. También hay inhibición de circuitos que traen nuevas señales externas o internas impidiendo que se interrumpa la ejecución del comportamiento inmediato lo que permite la atención hacia el objetivo (Fuster, 2008).

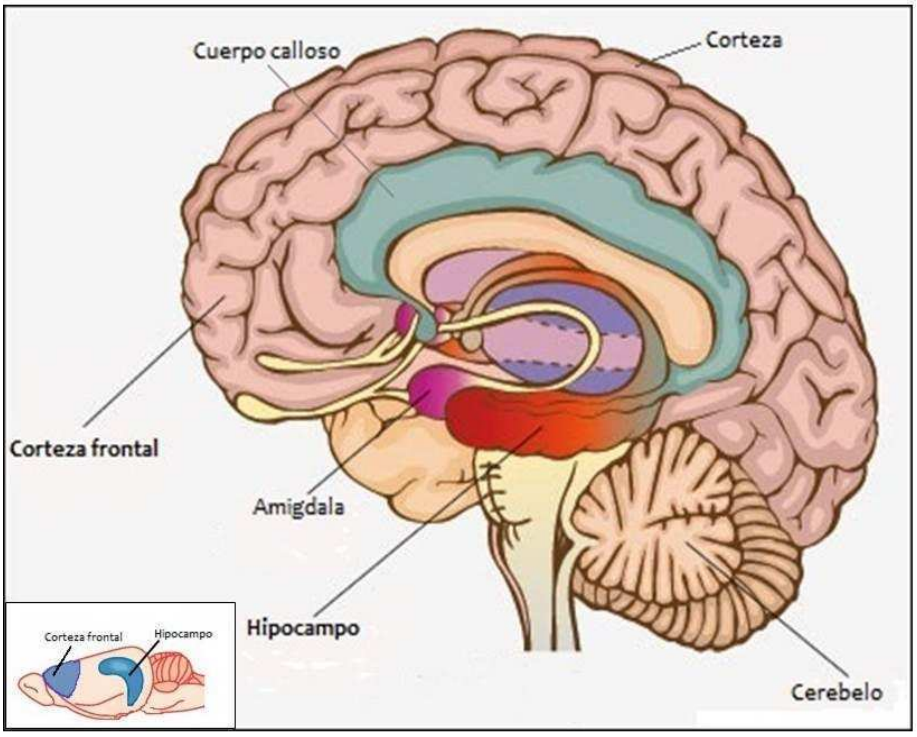


Figura 1. Esquema del cerebro humano. Se destaca la ubicación las áreas de interés: el hipocampo y la corteza frontal. El recuadro interior muestra el encéfalo de la rata con las 2 áreas destacadas. (Fuente: www.healthfavo.com).

1.5.2. Hipocampo

El hipocampo (HPC) propiamente dicho forma parte de una estructura mayor denominada formación hipocampal. Esta estructura se encuentra posicionada en la línea media del cerebro, sobre el tálamo y dentro del lóbulo temporal. En los mamíferos el tejido esta densamente empaquetado en forma de tubo curvado y

elongado hacia la parte rostral (figura 1). Esta forma típica varía entre especies, por ejemplo en los primates es una estructura lineal sobre el piso del lóbulo temporal.

La formación hipocampal se compone de 6 partes: la corteza entorinal*, parasubiculum, presubiculum, subiculum*, giro dentado (GD) y el hipocampo que se subdivide en 3 áreas: *cornu ammonis* (CA)1, CA2 y CA3. Estas seis regiones están conectadas en forma unidireccional por fibras neuronales. La corteza entorinal es considerada el inicio de la red de conexiones intrínsecas de la formación hipocampal. Las neuronas de este área proyectan al giro dentado y conforman la vía perforante. Los axones de las células granulosas del GD dan origen a las fibras musgosas que se conectan con las neuronas piramidales de la región CA3. Por su parte, las neuronas piramidales, son las mayores aferentes de la región CA1 y forman la vía colateral de Schaffer que llegan como conexiones excitatorias de la zona del *subiculum* y también a la CE, cerrando así el circuito de conexiones hipocampales. Las tres vías descriptas (la perforante, las fibras musgosas y la colateral de Schaffer) forman el circuito excitatorio unidireccional más importante de la transición de información en la estructura hipocampal. Fuera de estas vías intrínsecas, hay conexiones asociadas que la contactan con el resto del encéfalo. Las tres más estudiadas son: el haz angular, que conecta la corteza entorrinal con otras áreas de la estructura por fuera del circuito interno, la *fiambria-formix* que interconecta el HPC con el cerebro anterior, el hipotálamo y el tallo encefálico; la tercera conexión comprende las comisuras ventral y dorsal por las cuales se conectan las estructuras hipocampales de cada hemisferio (O'Keefe y Nadel, 1978).

Las diferentes partes del área hipocampal muestran también diferencias en sus funciones, una de las más importantes funciones del HPC es el almacenamiento de información que puede ser conectada a otras memorias dando como resultado acciones declarativas (Andersen, 2007). La porción más dorsal del área es responsable de la memoria espacial y la navegación, contiene gran cantidad de neuronas de posición que forman una representación topográfica del espacio en el cerebro y se activan cuando el individuo atraviesa una zona específica de su entorno (Pothuizen y col., 2004), La zona ventral actúa en el procesamiento de emociones, en estudios con ratas se observó que lesiones en esta área alteran el condicionamiento al miedo debido a una interrupción en la conexión con la amígdala (Anagnostaras y col., 2002). La memoria hipocampal es crítica en la consolidación de novedades, en las respuestas emocionales, para los mapas cognitivos, para la navegación espacial y en

la formación de memorias de corto y de largo plazo. En el hipocampo el almacenamiento de memorias permanentes se produce mediante un mecanismo de acción conocido como: potenciación de largo termino (LTP, por su sigla en inglés: long term potentiation) que ocurre mediado por la activación de receptores del sistema de neurotransmisión glutamatérgica (Smith y McMahon, 2006).

2. Sistema glutamatérgico

El sistema glutamatérgico es el sistema de neurotransmisión excitatoria por excelencia, está ampliamente distribuido por todo el cerebro y en órganos periféricos. Entre las principales funciones del sistema se encuentran la regulación de los procesos de plasticidad sináptica y el procesamiento cognitivo. Su neurotransmisor es el glutamato que tiene un papel principal en el desarrollo del SN, en la migración celular y en la regulación de la formación y eliminación de sinapsis. Las neuronas glutamatérgicas extienden su acción a lo largo del eje encéfalo-medular y al menos dos tercios de las neuronas aferentes de la corteza cerebral son glutamatérgicas. Las fibras que llegan a la corteza frontal especialmente y las fibras de la formación hipocampal forman una de las vías más ricas en neuronas glutamatérgicas. En los últimos años, las alteraciones de la transmisión glutamatérgica han sido relacionadas con una gran variedad de neuropatologías como la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer y el Parkinson, así como también en los desórdenes asociados al abuso de drogas (Fonnum, 1984, Medina Marin y Escobar Betancourth, 2002),

2.1. El glutamato

Esta molécula define al sistema glutamatérgico y es considerado el neurotransmisor de sus neuronas debido a que cumple con los criterios de esta denominación: 1) está almacenado en vesículas dentro de las neuronas presinápticas, 2) se libera en respuesta a una despolarización de ésta célula, 3) presenta receptores específicos en neuronas postsinápticas y 4) es metabolizado en el espacio sináptico. El glutamato, es un aminoácido no esencial lo cual significa que es sintetizado in vivo y en las células éste puede ser generado a través de dos vías (figura 2): a partir del α-cetoglutarato durante el ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico (TCA por su sigla del inglés: tricarboxilic acid) por acción de aminotranferasas y de la enzima glutamato deshidrogenasa. La ruta metabólica que determina la síntesis de glutamato comienza

con la oxidación de la glucosa, dando moléculas de acetil CoA que al llegar a la mitocondria inician el ciclo TCA con la formación de citrato. Por descarboxilación oxidativa, el citrato forma α-cetoglutarato y en una reacción de oxidación catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa, el α-cetoglutarato da glutamato por una reacción en equilibrio constante. Este glutamato abandona la mitocondria y puede formar parte de la síntesis de proteínas como aminoácido estructural o ser transportado y almacenado en vesículas sinápticas. La segunda vía de síntesis para glutamato se origina por la entrada de acetato al ciclo TCA que es convertido, al igual que el piruvato, en acetil CoA para ingresar a la mitocondria. También se puede sintetizar a partir de otros aminoácidos como la arginina, la prolina, la histamina y la glutamina (Gln). La Gln es precursora de diversos aminoácidos y forma parte de las proteínas. Su síntesis, en los astrocitos, requiere grupos amonio que provienen de las neuronas y que se transportan a la glía o llegan del ciclo de alanina-lactato (Bak y col., 2006).

En el denominado ciclo de glutamina-glutamato, el glutamato capturado por los transportadores gliales desde el espacio extracelular es transformado por acción de la glutamina sintetasa (GS), especifica de glía, en Gln. Como tal es liberada por los astrocitos y captada por las neuronas en donde vuelve a ser transformada a glutamato por la enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG, de su sigla en inglés: phosphate activated glutaminase) (Brosnan y Brosnan, 2013). Este funcionamiento particular del sistema glutamatérgico, donde el Glu liberado es reciclado mediante su pasaje por las células gliales dio fundamento a la hipótesis de las sinapsis tripartitas (definidas por la comunicación bidireccional entre las neuronas y los astrocitos) (Araque y col., 1999, Santello y col., 2012). La producción de glutamato en el cerebro esta compartimentalizada, lo que es necesario debido a las diversas funciones de este aminoácido. Existen dos compartimentos bien definidos, el mayor consiste casi totalmente de estructuras neuronales y tiene entre el 85 y 98 % del glutamato total en el cerebro, en este espacio hay casi síntesis nula de Gln y la síntesis de Glu se produce a partir del metabolismo de la glucosa (Cremer y col., 1975). En el compartimento menor hay gran contenido de astrocitos con presencia de GS y piruvato carboxilasa, por lo cual hay alta síntesis de Gln y también en bajos niveles hay síntesis de glutamato que proviene mayoritariamente del metabolismo del acetato (Machiyama y col., 1970). Diversos estudios sobre compartimentalización del metabolismo celular han mostrado que la administración de los dos precursores

generales, glucosa y acetato, resulta en la incorporación de su esqueleto carbonado tanto en Glu como en la Gln. Cuando se usan precursores marcados, como por ejemplo con carbono 13 (^{13}C), se puede distinguir que la glucosa da un porcentaje bajo de Gln marcada, en comparación al porcentaje de Glu marcado que se obtiene y lo opuesto se cumple cuando se usa el acetato como precursor. Esto muestra que los dos precursores son metabolizados en circuitos diferentes, al igual que ambos aminoácidos (Fonnum, 1984). La Gln es el precursor más importante de la fracción de Glu con función de NT y también de GABA. La GS es regulada por sus productos por lo cual estos son los principales factores de control de la síntesis (Kvamme y Olsen, 1980). El Glu como aminoácido puede formar parte de la estructura de proteínas o puede ser captado por el transportador vesicular, almacenarse en las vesículas sinápticas y así formar su reserva como neurotransmisor. Cuando pasa al espacio sináptico estimula a sus receptores o puede ser recapturado por transportadores específicos de aminoácidos excitatorios tanto en astrocitos como en la neurona presináptica (Shank y Campbell, 1982).

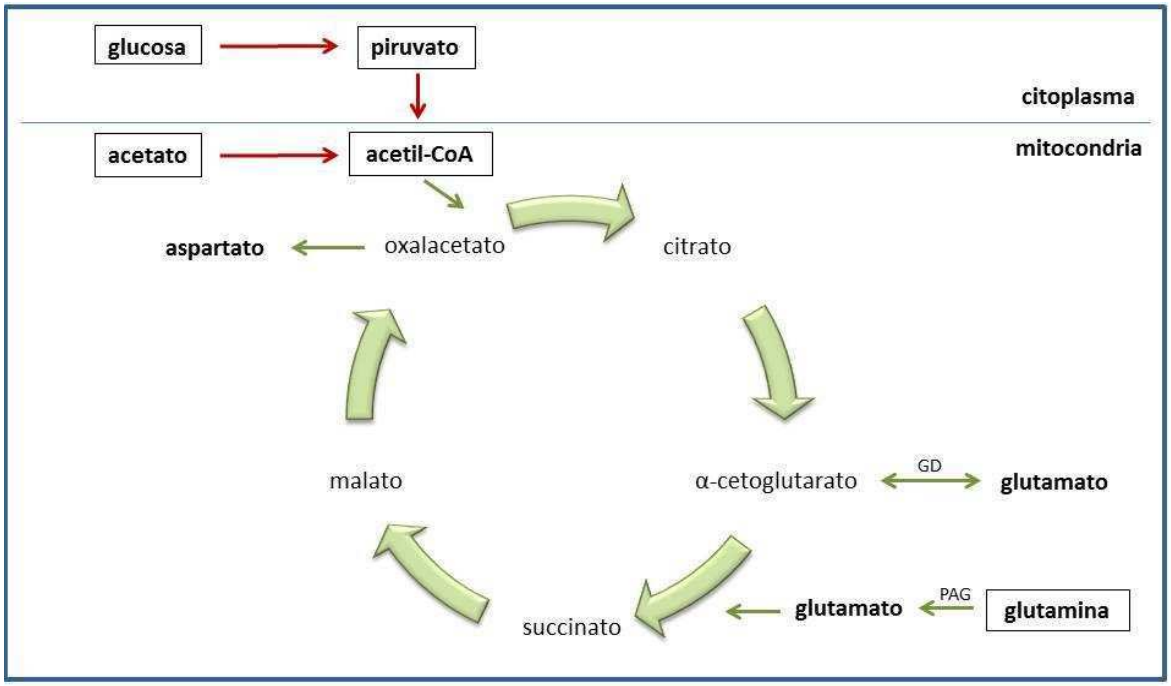


Figura 2. Esquema de la síntesis de glutamato a partir de la glucosa y el ciclo tricarboxílico (TCA, o ciclo de Krebs) que ocurre dentro de la mitocondria. Enzimas GD: glutamato deshidrogenasa, PAG: glutaminasa.

2.2. Receptores glutamatérgicos

Los receptores de glutamato son los responsables de producir la excitación de las neuronas postsinápticas por la llegada de un impulso nervioso, interviniendo de esta manera en procesos de regulación, comunicación, aprendizaje y formación de la memoria. Tienen un rol central en la modulación de la plasticidad sináptica, en el control de la citotoxicidad del glutamato y participan en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Debanne y col., 2003).

Se pueden distinguir dos grupos de receptores glutamatérgicos debido a estrategia de señalización: los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos. Los ionotrópicos son canales iónicos dependientes de ligando que son activados por agonistas selectivos entre los cuáles se encuentra el aminoácido Glu. Por su condición de canal, la señal que transmiten es rápida y provocan corrientes postsinápticas excitatorias que pueden producir una despolarización de la membrana plasmática suficiente como para generar un potencial de acción (Palmada y Centelles, 1998). Existen tres clases de receptores ionotrópicos, que deben su nombre a los agonistas específicos que los activan: N-metil-D-aspartato denominado receptor NMDA, α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico llamado receptor AMPA y el receptor de kainato (KA). Cada receptor está conformado por 4 subunidades variables, que contiene sitios de unión al ligando y forman el canal iónico. En la actualidad se conocen en total seis familias de genes que codifican las subunidades. Tres de estos grupos de genes codifican subunidades del receptor NMDA, cuya conformación requiere de una subunidad NR1 obligatoria y otras tres subunidades que pueden variar entre NR 2A, 2B, 2C, 2D, 3A y 3B con una distribución área específica en el cerebro (Dingledine y McBain, 1999). Presentan seis sitios de unión a ligando endógeno de alta especificidad para su activación y el agonista más específico para este receptor es el glutamato, que lo activa con una potencia aproximada de 1 µM y requiere como mínimo cuatro moléculas de agonista. El receptor NMDA es básicamente un detector de coincidencia entre la liberación de Glu y la despolarización de la membrana. La activación del canal iónico tiene una dependencia dual: por un lado depende de la unión del ligando y por otro del potencial de membrana. Cuando el ligando se une al canal, mientras la célula tiene un potencial de reposo, el receptor NMDA permanece bloqueado por acción de un modulador alostérico, el Mg^{2+} que impide su activación. Cuando la concentración del NT es suficiente y se activa el receptor AMPA, entonces

la célula se despolariza, el NMDA pierde el Mg^{2+} y se produce el pasaje de iones por el canal.

Por su parte, el receptor AMPA puede estar constituido por cuatro tipos de subunidades: GluR 1 a 4, codificadas por cinco familias de genes. Este receptor presenta una menor afinidad por el glutamato endógeno, por lo cual tiene una pronta desactivación y genera corrientes excitatorias postsinápticas rápidas. La cinética de los receptores AMPA dependerá de las subunidades que lo compongan. Por ejemplo, los que presentan GluR4 se desactivan cinco veces más rápido que las demás clases de receptores. El receptor KA tiene cinco tipos de subunidades GluR 5 a 7, KA-1 y KA-2 que se ensamblan para formar receptores funcionales. La combinación de subunidades determina la afinidad del receptor por el ligando, por ejemplo los receptores KA homoméricos de KA-1 o 2 no son funcionales y se considera a estas subunidades como regulatorias. Este grupo de receptores presenta las mismas características cinéticas que los AMPA y comparten la mayoría de los ligandos endógenos. La mayor diferencia entre estos dos tipos de receptores es que los KA se desensibilizan de forma diez veces más lenta que los AMPA pero ambos son considerados como mediadores de la transmisión sináptica rápida.

Cuando se produce la activación de los receptores ionotrópicos los cationes extracelulares comienzan a filtrar y se produce la entrada de Ca^{2+}. El flujo de Ca^{2+} dispara una variedad de reacciones en cascada que modulan la función de diversas enzimas, la expresión de genes y finalmente la respuesta neuronal (Dingledine y McBain, 1999). Una de las funciones asociadas a estos receptores es la LTP que promueve una intensificación duradera de la transmisión de señales entre neuronas y aquellas sinapsis en donde se produce este fenómeno quedan conectadas a largo plazo. Por esta característica se propone al LTP como uno de los mecanismos de formación de la memoria de largo plazo. La fuerza del potencial de membrana postsináptico determina si se inicia un LTP o no, mientras que la posterior entrada de Ca^{2+} y la activación de los sistemas de segundos mensajeros permitirán que se complete su fase de finalización (Cooke y Bliss, 2006). Las sinapsis excitatorias pueden regular dinámicamente a sus receptores en la postsinapsis e incluso pueden agregar receptores a la membrana para modular la fuerza de la señal. Los niveles de expresión de los receptores ionotrópicos son regulados por el balance entre la transcripción, la traducción, la degradación de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la degradación de proteínas, como las subunidades. Otros procesos como el

ensamblaje de los receptores y su inserción en la membrana tienen mecanismos adicionales de control. La expresión de los receptores es dinámica y célula-específica, varía durante el desarrollo y en respuesta a factores ambientales. Las modificaciones postraduccionales como la fosforilación tienen un rol principal en la regulación del tráfico, la inserción y la localización sináptica. La mayoría de las subunidades de los receptores ionotrópicos son fosforiladas por enzimas como la PKA, PKC (por sus siglas en inglés: protein kinasa A o C, respectivamente) o la quinasa calcio calmodulina (CAM). Por ejemplo, la fosforilación de GluR1 por PKA lleva a la inserción del receptor en membrana y aumenta su probabilidad de apertura. La actividad de la sinapsis promueve la desfosforilación de GluR4 lo que lleva a su inserción en la superficie de la neurona. En el caso de NMDA la fosforilación dual por PKA/ PKC genera la salida de la subunidad NR1 del retículo endoplasmático y la acción de la CAM quinasa II sobre receptores que presentan NR2B modifica la conformación rápidamente ante la entrada de Ca^{2+} (Myers y col., 1999, Traynelis y col., 2010).

El segundo grupo de receptores de glutamato, los metabotrópicos son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Son estructuras proteicas con tres regiones diferenciadas como extracelular, transmembrana e intracelular. La porción externa tiene el sitio de unión al ligando, la sigue una estructura que atraviesa la membrana siete veces (región transmembrana) que desemboca en una porción que interacciona físicamente con la proteína G y la activa. Hay ocho genes que codifican subunidades de esta familia de receptores denominadas mGlu 1 a 8. Estas subunidades se separan en tres subgrupos de receptores clasificados por su estructura primaria: grupo I, II y III. El grupo mGluR I está integrado por las subunidades mGlu 1 y 5, trabaja asociado a proteína G que activa la fosfolipasa C e inositol trifosfato promoviendo la liberación de Ca^{2+} intracelular. El grupo mGluR II formado por mGlu 2 y 3, funciona con la proteína Gi, inhibiendo a la adenilato ciclasa y la formación de AMPc. El grupo mGluR III está integrado por mGlu 4, 6, 7 y 8, actúan también con proteína Gi y más precisamente su acción inhibe canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Rodriguez y col., 2012). Los receptores metabotrópicos participan en diversas funciones, regulan la actividad de canales iónicos, facilitan la liberación de transmisores y controlan el tráfico de los receptores ionotrópicos. También son mediadores del desarrollo neuronal, de sinapsis de transmisión lenta del sistema glutamatérgico e intervienen en la inducción de LTP y en el proceso de formación de

memoria. Se ha detectado su participación en desórdenes como trastornos de ansiedad, convulsiones y estrés post-traumático.

Estos receptores se localizan en diversas áreas del cerebro y en diferentes puntos de las membranas tanto en neuronas como en células gliales (figura 3). La distribución más estudiada incluye presencia de mGluR I en bulbo olfatorio, substancia *nigra*, hipocampo y en la corteza, mayoritariamente en las neuronas postsináptica. Los integrantes del grupo II, se distribuyen en el cerebelo y el bulbo olfatorio, tanto en neuronas como en la glía. Por su parte los mGlu3 están presentes en la presinapsis de sinapsis de la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado, por lo que se estima que cumplen un rol de auto-receptores.

La expresión de todos los metabotrópicos varía durante el desarrollo, algunos como mGlu2 aumentan su expresión durante la vida postnatal mientras que los mGlu3 se encuentran elevados durante el desarrollo prenatal y declinan en concentración durante el periodo perinatal (Ferraguti y Shigemoto, 2006). La activación de estos receptores está ligada a la regulación de genes a nivel de transcripción y de la traducción. Entre los genes regulados por la función de los mGluR a nivel de la glía, se encuentran los genes de los transportadores glutamatérgicos. Es posible asumir que la liberación de glutamato regula, en las células, los patrones de expresión de sus propios receptores y transportadores, controlando también la interacción glía - neurona (Niswender y Conn, 2010, Bellamy y Ogden, 2006).

2.3. Transportadores de glutamato

De acuerdo a su ubicación los transportadores de glutamato se pueden separar en dos superfamilias: los transportadores de vesículas sinápticas o transportadores vesiculares y los transportadores de membrana plasmática (figura 3).

2.3.1. Transportadores de la vesícula sináptica

En las terminales neuronales del sistema glutamatérgico, el glutamato es acumulado en las vesículas sinápticas por acción de proteínas transportadoras. Los transportadores vesiculares de Glu (vGluTs, del inglés: vesicular glutamate transporters) no dependen del gradiente electroquímico de Na^+ para hacer el pasaje de Glu al interior vesicular si no que utilizan un gradiente de protones (H^+). Presentan una menor afinidad por el aminoácido en comparación a otros transportadores de Glu,

pero son más específicos ya que transportan únicamente esta molécula (Liguz-Lecznar y Skangiel-Kramska, 2007a). En la actualidad hay tres isoformas descriptas para este grupo de transportadores: vGlut-1, 2 y 3. Los tres conservan alta homología en los dominios de membrana pero no en los extremos C y N terminales, lo que determinaría su especialización funcional. vGlut-1 y vGluT-2 se expresan casi exclusivamente en neuronas glutamatérgicas y se presentan alternadamente en diferentes áreas del cerebro. La isoforma 1 se localiza principalmente en la neocorteza, hipocampo, amígdala y el subiculum. En el cerebelo sólo ocupa las fibras paralelas. Por otra parte, vGluT-2 se encuentra en el bulbo olfatorio, la capa 4 de la corteza en el giro dentado (capa granular), tálamo, hipotálamo, el tallo cefálico y también se localiza en las células de Purkinje del cerebelo (Fujiyama y col., 2001, Herzog y col., 2001). Además de una diferencia en su ubicación, estos transportadores presentan una diferenciación funcional ya que se ha observado que vGlut-1 se encuentra en sinapsis glutamatérgicas de baja probabilidad de liberación, aquellas que producen LTP, mientras que la isoforma vGlut-2 está presente mayoritariamente en sinapsis de alta probabilidad de liberación, las cuales generan depresión de largo término (LTD, del inglés: long term depression) (Marini y col., 1998).

Durante el desarrollo de los organismos, la expresión de estas proteínas también varía diferencialmente, vGluT-1 aparece en bajas concentraciones durante el periodo prenatal y aumenta con la maduración postnatal. vGluT2 también aumenta a lo largo de vida en ciertas áreas cerebrales y deja de expresarse en otras, como en el cerebelo. Esto último también se observa en la actividad de vGluT3. Los axones del sistema que expresan el transportador tipo 2 alcanzan su forma madura y funcional más rápido que los que expresan la tipo 1. Posteriormente en el desarrollo hay un reemplazo de isoformas, de la 2 por la 1, que podría estar asociado a la forma madura final de la neurona (Liguz-Lecznar y Skangiel-Kramska, 2007b).

2.3.2. Transportadores glutamatérgicos de membrana plasmática

En la actualidad se conocen cinco transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs, del inglés: excitatory amino acid transporter) diferentes que se activan con Glu. El transportador de glutamato/ aspartato (GLAST, siglas en inglés para glutamate/ aspartate transporter o en humanos EAAT1), el transportador de glutamato 1 (GLT1, del inglés glutamate tranporter o EAAT2 en humanos), el transportador de

aminoácidos excitatorios (EAAC, del inglés excitatory amino acid carrier o EAAT3) y los transportadores de aminoácidos excitatorios 4 y 5 (EAAT4 y EAAT5). Todos los transportadores son homo-oligómeros de subunidades unidas no covalentemente. Los EAATs son Na^+/ K^+ dependientes, el transporte de una molécula de glutamato esta acoplado al transporte de tres moléculas de Na^+ extracelulares que se intercambian por una de K^+ intracelular. Estas moléculas no son solo co-transportadas, sino que el Na^+ es requerido para la unión del Glu al transportador. Si bien los EAATs presentan una alta especificidad por el glutamato, ésta no es absoluta ya que también puede haber transporte de otras sustancias, como el aspartato, una característica que ha sido ampliamente usada para el estudio del sistema de captación. También hay una amplia variedad de inhibidores del transporte, entre los que figuran el dihidrocainato (DHK) que bloquea específicamente al transportador GLT1 y el DL-treo-β-benziloxiaspartato (TBOA) inhibidor competitivo no transportable que bloquea a todos los transportadores de glutamato.

GLAST y GLT1 son los dos transportadores glutamatérgicos más ampliamente distribuidos en el SNC y sus niveles de concentración varían dependiendo del área y el tipo celular donde se analicen. GLT1 es predominante en casi todas las áreas del SNC pero se expresa en mayor concentración en corteza, hipocampo, el tálamo y bulbo olfatorio. A nivel subcelular esta proteína se expresa como proteína funcional exclusivamente en astrocitos y se concentra en la porción de la membrana del astrocito que enfrenta a los neuropilos. Se ha encontrado presencia de ARNm de GLT1 en neuronas y estas pueden llegar a expresar la proteína ante una situación patológica o por manipulaciones experimentales (Lehre y col., 1995).

GLAST se encuentra altamente concentrado en el cerebelo y en la retina, aunque en distintas proporciones en cada área y también se puede co-expresar con GLT1. Se lo encuentra en astrocitos exclusivamente y no ha sido detectado en neuronas. Este transportador se ubica en el cuerpo y los procesos astrocitarios por igual, siendo el lado que enfrenta a los neuropilos el que presenta una mayor aglomeración de transportadores. GLAST es regulado por distintos factores, como por ejemplo quinasas y factores de crecimiento (Chaudhry y col., 1995).

Por su parte, el transportador neuronal EAAC se encuentra altamente concentrado en los ganglios básales, hipocampo y cerebelo pero comparado con los transportadores gliales su concentración en el SNC es extremadamente baja y difícil de detectar con métodos de inmunomarcación. EAAT4 se ha detectado en alta

concentración en la membrana de las células de Purkinje y en neuronas de la corteza en forma intermitente durante el desarrollo. Su función la realiza en la zona extrasináptica y sobre todo en las espinas dendríticas (van Landeghem y col., 2001, Gou y col., 2012).

La función más importante de este grupo de proteínas transportadoras es, sin duda, la captación del glutamato luego de su liberación al espacio sináptico durante la transmisión de señales. La concentración de Glu en el SNC es relativamente alta y luego de ser liberado por las neuronas, el Glu difunde rápidamente hacia el espacio extra-sináptico. El transporte del neurotransmisor por parte de los EAAT evita su difusión y de esta manera impide el efecto citotóxico del aminoácido. Los transportadores son los únicos que realizan este control de la difusión, de la activación de componentes extra-sinápticos y de la cantidad de glutamato que llega a sus receptores durante la transmisión nerviosa, evitando conjuntamente una sobre activación de los receptores y participando indirectamente en la regulación de la liberación del neurotransmisor (Danbolt, 2001).

La captación de glutamato varía durante el desarrollo de los organismos. En los mamíferos, el nivel de re-captación es bajo durante el periodo perinatal y aumenta en las primeras semanas de vida, correlacionándose con el período de la sinaptogénesis (Fonnum y col., 1992). Los transportadores GLT1 y GLAST están presentes desde etapas tempranas en el desarrollo, aunque en muy bajas concentraciones. Aumentan durante la etapa de formación de sinapsis que tiene lugar durante la segunda semana postnatal, alcanzando niveles estables alrededor de los 35 días postnatales. Además de sus niveles de expresión, los transportadores varían su localización durante el crecimiento. Inicialmente GLT1 se detecta en células indiferenciadas y GLAST en la glía radial, luego ambos co-localizan en los astrocitos. Posteriormente, desde el día postnatal 6 y en adelante, estas dos proteínas funcionan exclusivamente en las células de la glía (Northington y col., 1998). La captación de Glu tiene puntos de regulación a lo largo de todo el sistema, empezando en la transcripción del ADN y en la traducción de los ARNm, siguiendo por la síntesis de los transportadores, hasta su activación en la membrana. Uno de los más importantes controles de la expresión de GLT1 lo ejercen las neuronas. Los factores neuronales promueven la llegada del transportador a la membrana del astrocito pero no activan su función y tienen poca influencia en la expresión de otros transportadores como GLAST. Uno de los candidatos más estudiados, mediante la utilización de cultivos puros de astrocitos o condicionados con

medios neuronales, es la tirosina quinasa, que activa MAP (de las siglas en inglés mitogen-activated protein) quinasas y el factor CREB (del inglés: cAMP-responsive element binding protein) de transcripción (Gegelashvili y col., 2000). El polipéptido pituitario activador de adenilato ciclasa (PACAP, por su sigla en inglés: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) promueve la expresión de GLT1 y GLAST, por medio de la activación de PKC y PKA.

La expresión de GLAST aparenta ser constitutiva y sus niveles pueden aumentar a través de la activación de los receptores de Glu y por presencia del propio aminoácido. Por el contrario GLT1 parece requerir la acción de factores neuronales para su expresión y mantenimiento (Munir y col., 2000).

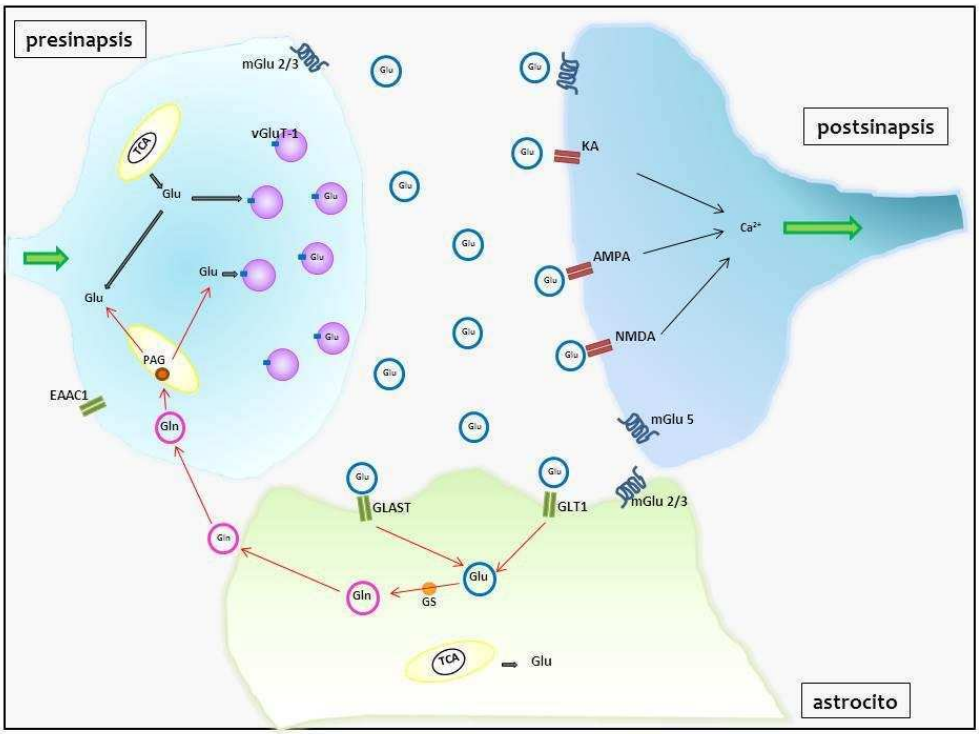


Figura 3. Esquema de la sinapsis glutamatérgica tripartita. Las flechas rojas indican el camino del glutamato (Glu) en el ciclo de glutamina (Gln)- Glu. Paralelamente se diagrama la función de la sinapsis ante la llegada de un estímulo. TCA: ciclo del ácido tricarboxílico; PAG: enzima glutaminasa vGluT-1: transportador glutamatérgico vesicular; NMDA, KA, AMPA, mGlu 2/3 y 5: receptores de glutamato; GLT1, GLAST y EAAC1: transportadores glutamatérgicos; GS: enzima glutamina sintetasa; círculos amarillos: mitocondrias.

3. Fisiología del estrés

El término “estrés” proviene de la física, donde hace referencia a la presión que un cuerpo ejerce sobre otro, siendo el que recibe más presión el más vulnerable a romperse. Esta definición fue adoptada por la psicología y dio origen a la primera definición aplicada de estrés tal cual la conocemos hoy en día. Fue Walter Cannon, a principios del siglo XX, quien describió la influencia de los factores emocionales sobre la secreción de AD y posteriormente desarrolló el concepto de "reacción de lucha o huida". Durante el desarrollo de su trabajo también describió el término homeostasis, refiriéndose al conjunto de procesos fisiológicos que mantienen a un organismo en equilibrio, regulando las señales del medio externo y de las acciones del sistema interno (Cannon, 1935). Posteriormente Hans Selye describió el "síndrome general de adaptación" donde planteó que el estrés es el estado en el cual un organismo se encuentra luego de someterse a cualquier demanda inespecífica del ambiente (Selye, 1976). De esta manera, definió al síndrome general de adaptación como un proceso de tres etapas (figura 4):

1. reacción de alarma: cuando el organismo detecta el estímulo externo de estrés
2. adaptación: cuando el cuerpo toma contramedidas defensivas hacia el agente estresante
3. agotamiento: cuando comienzan a decaer las defensas del organismo contra el estimulo

Así el estrés, según Selye, incluye dos situaciones diferentes: el distrés, cuando hay consecuencias negativas para el sujeto y el eustrés, cuando no hay consecuencias (o pueden generarse situaciones benéficas) para el organismo estresado (Selye, 1936). Actualmente la Organización Mundial de la Salud define el estrés como "el conjunto de reacciones fisiológicas que preparan al organismo para la acción" y la definición más actualizada explica que estrés es una consecuencia de la interacción de los estímulos ambientales y la respuesta del organismo que los percibe. Por lo tanto, en este trabajo vamos a tomar al estrés como una condición donde se perturba el balance fisiológico del organismo y se desencadena una respuesta del mismo para reestablecerlo. Mientras que un agente de estrés es el evento que desafía a la homeostasis.

Las situaciones de estrés son diferencialmente percibidas por los distintos individuos. Dependiendo de la resistencia o vulnerabilidad de cada uno, el estrés

dejará secuelas permanentes en el individuo o será superada sin consecuencias. En el caso de un organismo vulnerable, con estrategias inapropiadas para enfrentar factores que generan estrés, el efecto de esta situación será permanente mientras que los organismos capaces de enfrentar adversidades con respuestas adecuadas percibirán el factor de estrés como una mínima amenaza que superarán sin perturbación permanente. Estas variaciones en las respuestas al estrés dependen de las experiencias pasadas, del género y la edad de los individuos, así como también de su estructura genética (Franklin y col., 2012). El manejo de la situación de estrés es esencial para minimizar su impacto. La estrategia de enfrentamiento a los agentes de estrés varía entre los organismos y depende fundamentalmente de como el sistema neuroendocrino e inmunológico responde a esta condición (Zozulya y col., 2008, Mason, 1971).

Múltiples actores del sistema neuroendocrino son activados por acción de los factores del estrés. Entre estos, el SN autónomo (SNA) y el eje hipotálamo-hipofisario adrenal (HHA), son los más estimulados. El SNA regula la homeostasis del organismo, cuando el estímulo estresante es percibido el SNA promueve la liberación de catecolaminas desde la glándula adrenal, mediante la activación del sistema simpático. Las catecolaminas como la AD y la NA, tienen efecto glucogenolítico, promueven el aumento de la frecuencia respiratoria, del ritmo cardiaco y de la presión arterial, como también fomentan la irrigación de los órganos vitales (Arnsten, 1997). Paralelamente, en el SNC, el hipotálamo comienza a liberar desde su núcleo paraventricular la hormona liberadora de corticotrofina (CRH, de su sigla en inglés: corticotropin releasing hormone) y desde la eminencia media libera vasopresina (VSP). Estos actúan en la hipófisis promoviendo la síntesis y liberación de la hormona coticotrofina (ACTH, de sus siglas en inglés: adrenocoticotropic hormone). Una vez liberada al sistema circulatorio la ACTH llega a su órgano blanco, la glándula adrenal, donde estimula la liberación de corticoides en sus dos formas, mineralocoticoides (MC) y glucocorticoides (GC) (Axelrod y Reisine, 1984). El más importante de los GC entre los mamíferos es la corticosterona (en los humanos es el cortisol) que tienen múltiples funciones en todo el organismo. Por ejemplo: disminuyen la respuesta inflamatoria, regulan la excreción de agua, controlan la síntesis de proteínas, influyen sobre la neurotransmisión en diversos sistemas y puede inhibir su propia secreción por retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis, regulando su propia respuesta. Todas estas hormonas se conocen como las hormonas de estrés y son las

encargadas de preparar al organismo para la lucha o la huida (Cahill y McGaugh, 1998, Chrousos y Gold, 1992).

Por otro lado, el estrés tiene un marcado efecto sobre los distintos sistemas de transmisión que integran el SNC. Tanto el estrés como los glucocorticoides, directamente, pueden afectar desde la liberación de NT, la función de los receptores, la re-captación de moléculas, hasta la formación o depleción de contactos sinápticos. Los efectos del estrés sobre el SN varían según el agente de estrés percibido: el estrés físico activa el tallo cerebral y regiones del hipotálamo, mientras que el estrés de tipo emocional actúa sobre la amígdala, el hipocampo y la corteza frontal, entre otros. Esto conlleva cambios en los procesos de memoria, de aprendizaje, de toma de decisiones y finalmente modifica el comportamiento del organismo (McEwen, 2007). La duración temporal del agente de estrés influye directamente sobre la respuesta del SN, los agentes agudos activan respuestas rápidas, sistemas que permitan un retorno a la homeostasis en corto plazo. Entre estos sistemas se encuentran las monoaminas, como la AD, la DA y la 5-HT cuya liberación se activa durante la etapa de evaluación del evento estresante. Su acción es rápida y activan al HPC, a la amígdala, a la CF y al núcleo *accumbens*. La DA promueve el procesamiento sensorial, la evaluación del riesgo y el desarrollo de estrategias de acción, su actividad deprime las conexiones glutamatérgicas entre la amígdala y la CF, dos importantes áreas en el procesamiento de emociones. Por su parte la 5-HT reduce los comportamientos en la instancia de post-estrés. En el hipocampo la NA promueve la actividad sináptica, que también es controlada por el rápido aumento de GC. Por otro lado, en esta área, el estrés aumenta la liberación de 5-HT y el aumento de GC afecta la liberación de Glu (Joels y Baram, 2009). Se ha demostrado que, la actividad de los receptores, AMPA y NMDA, se potencia separadamente en la CF mientras que en el HPC la potenciación de NMDA es dependiente de AMPA para la generación de LTP en situaciones de estrés. En el HPC los aminoácidos excitatorios y los GC en niveles normales aumentan la función sináptica y promueven formación de memoria, mientras que cuando están elevados tienen la influencia opuesta.

Los agentes de estrés crónico, permanecen en el tiempo y generan niveles de GC altos y sostenidos. Esto tiene como efecto la reducción de las dendritas, la retracción de conexiones sinápticas y la supresión de la neurogénesis. En la CF, entre los efectos del estrés crónico, se ha observado un decaimiento del eflujo de Glu y de las arborizaciones dendríticas. También se encontraron altos niveles de los receptores

AMPA y NMDA (McEwen, 1999). Se ha demostrado que los GC regulan procesos cognitivos a través de la regulación de los receptores de Glu. En forma aguda pueden facilitar la memoria de trabajo (dependiente de la CF) y la declarativa (en el HPC) pero en una condición crónica o de niveles de GC muy elevado, interrumpen esta función en ambas áreas (Henckens y col., 2011). Resulta claro entonces que la combinación de la diversidad de agentes de estrés, el contexto del hábitat, la base genética del organismo, el género, la edad y el estado fisiológico (como el ritmo circadiano) del individuo que está sometido a estrés, crean una compleja matriz de efectos y respuestas ante la situación.

Todos los cambios, hasta hoy registrados, que genera el estrés se evaluaron utilizando diversos modelos de experimentación. Debido a que muchas de las problemáticas de la sociedad moderna se basan en las consecuencias que la exposición al estrés crónico generan sobre el individuo, se han desarrollado algunos estudios con humanos que consisten en la recopilación de información retrospectiva y datos prospectivos sobre los individuos que pasaron por situaciones estresantes. Aun así, la mayor parte de los estudios para evaluar al estrés se basan en la experimentación con modelos animales que han permitido la identificación de actores, mecanismos y daños generados por el estrés y que facilitaron la base de posibles terapias para el tratamiento o prevención de sus efectos. Los modelos de estrés más aplicados en experimentación se basan en:

1- Modelos de estrés físico: son los que aplican agentes como temperatura baja, inmersión en agua, aplicación de corriente eléctrica y el estrés por inmovilización.

2- Modelos de estrés psicológico: aplican agentes como aislamiento social, presencia de predadores, cambios de ritmo circadiano,

3- Modelos de estrés variables: usan agentes de mediana intensidad que se aplican en forma impredecible (variada en el tiempo). Usan estrés físico y emocional en forma combinada y disminuyen la posibilidad de habituación o resistencia al agente de estrés.

Todos estos modelos se aplican en diferentes animales de experimentación y en diferentes etapas del desarrollo del organismo como puede ser en la etapa prenatal, en la infancia, en la adolescencia y en la adultez, dependiendo del objetivo de estudio (Bhatia y col., 2011).

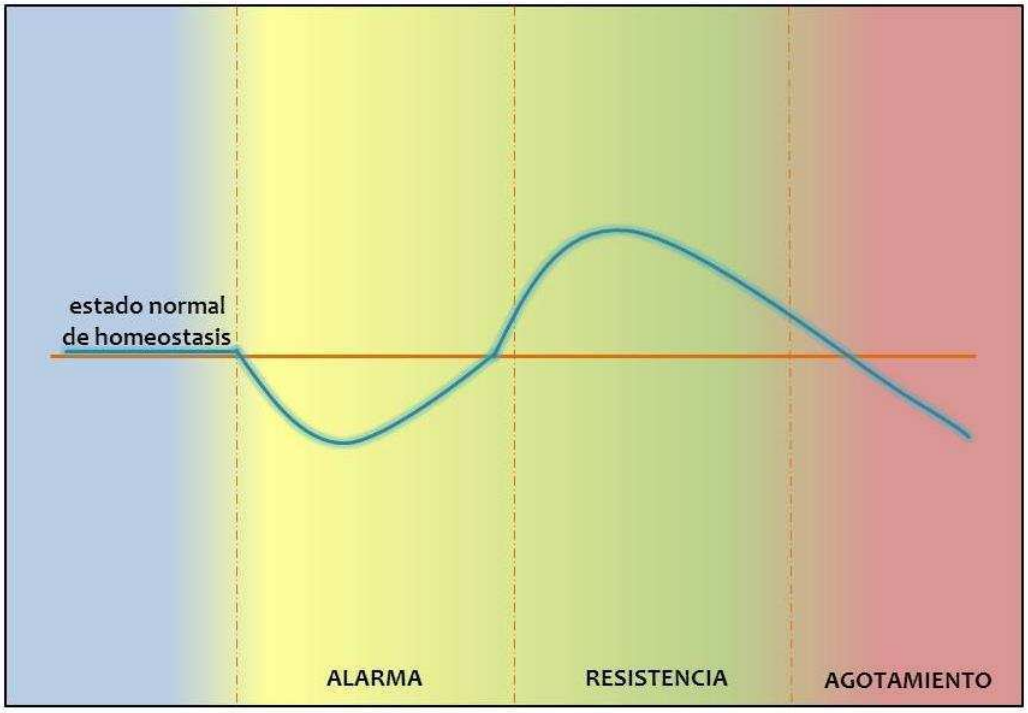


Figura 4. Esquema de las fases del estrés. Se puede observar cómo reacciona un organismo ante un estímulo estresante (línea azul)

3.1. Estrés prenatal

Los eventos adversos durante períodos críticos del desarrollo pueden afectar diversas funciones fisiológicas como el metabolismo, el crecimiento y la reproducción de los organismos, y también su comportamiento. Los agentes de estrés pueden tener efectos a largo plazo y promover variaciones permanentes en todas estas funciones. Uno de los periodos críticos del desarrollo de un organismo es la vida fetal o el estadio prenatal. Durante esta etapa todos los sistemas se encuentran en formación, con una alta tasa de división celular por lo que son especialmente vulnerables a insultos que podrían programar o desviar algunas funciones de su desarrollo normal dando como resultando un organismo susceptible a futuras condiciones adversas durante la vida postnatal. También pueden ser influenciados otros periodos críticos del desarrollo, como la etapa perinatal y la adolescencia donde el sistema continúa siendo lábil y reprogramable en sus funciones por el efecto de los factores ambientales.

Empleando distintos modelos de experimentación numerosos estudios han concluido que el estrés prenatal (EP) afecta a largo plazo la función neuronal normal y

aumenta la posibilidad de desarrollar desordenes comportamentales y emocionales en la vida adulta. Pero también se han observado cambios inmediatos, como por ejemplo la alta secreción de glucocorticoides, en las ratas, como reflejo de la hiperactivación del eje HHA. Este aumento se ha convertido en un marcador del paradigma de estrés gestacional (Maccari y Morley-Fletcher, 2007). Así mismo, en los humanos, el bajo peso en los neonatos es considerado como un índice de estrés durante la gestación (Wainstock y col., 2014).

Durante la gestación de los mamíferos, la placenta expresa genes para la síntesis de CRH placentaria (CRHp) la cual aumenta con el transcurso de la preñez. Esta forma de la hormona se comporta diferente a la CRH hipotalámica debido a la expresión de diferentes factores y co-activadores en los diferentes tejidos. Por otra parte, la enzima placentaria 11β- hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β-HSD), que inactiva a los GC, evitando su paso a través de la placenta, también aumenta durante la preñez. Todos estos factores, en niveles normales, son necesarios para la maduración del feto pero si los niveles se elevan por encima de sus niveles fisiológicos, como ocurre en situaciones de estrés, se puede alterar el desarrollo del feto. La producción de GC en esta situación promueve la producción de CRHp que genera a su vez una retroalimentación positiva sobre la producción de CRH, ACTH y corticosterona/ cortisol, al mismo tiempo que reduce la síntesis y actividad de la 11β-HSD, permitiendo un mayor pasaje de GC a través de la placenta. Conjuntamente este cambio promueve una reducción en la expresión de receptores de GC en el hipocampo del feto, lo que lleva a interrumpir la comunicación con el hipotálamo y aumenta la actividad de HPA. Así, el feto recibe una mayor cantidad de corticoides en su sistema, lo que afecta la trayectoria de su desarrollo (Beydoun y Saftlas, 2008, Sandman y col., 2011).

3.2. El estrés prenatal en estudios con humanos

La expresión de diversas patologías que comprometen tanto la función motora como la cognitiva ha sido relacionada al estrés durante la gestación. Las consecuencias del estrés prenatal que han sido observadas con una mayor incidencia son los nacimientos prematuros, neonatos de bajo peso, retrasos en el inicio del habla y en el inicio de las actividades locomotoras de los infantes. También se encontraron correlaciones con la incidencia de trastornos comportamentales como el déficit de

atención y trastornos en la memoria y en el aprendizaje. Se ha podido comprobar que los sujetos, cuyas madres sufrieron estrés durante el embarazo, presentan una alta vulnerabilidad a desarrollar enfermedades cardiovasculares, desórdenes metabólicos y trastornos psiquiátricos del tipo de la esquizofrenia, la depresión y los desórdenes de ansiedad, así como una propensión al consumo de drogas de abuso (Beijers y col., 2014).

Los efectos del estrés gestacional en los seres humanos han sido evaluados mediante dos tipos de estudios, los retrospectivos y prospectivos. Los estudios retrospectivos evaluaban madres que asumen haber sufrido algún tipo de estrés durante sus embarazos como pueden ser los periodos de guerra, presenciar desastres naturales o algún trauma emocional significativo. Los estudios prospectivos se realizan con mujeres embarazadas recientemente expuestas a algún tipo de agente de estrés que se determina durante el estudio y realizan también el seguimiento del neonato durante distintos periodos de crecimiento. Estos estudios han arrojado diversos resultados que apoyan la relación entre el estrés prenatal y la expresión de psicopatologías en humanos (Graignic-Philippe y col., 2014).

Algunos de los estudios retrospectivos más representativos han mostrado que, al evaluar a niños de diez años de edad cuyas madres dijeron haber sufrido ansiedad durante su embarazo, estos presentaban altos niveles de cortisol. Paralelamente los mismos niños mostraban una correlación positiva entre el EP y la presencia del desorden de hiperactividad y deficiencia de atención (DHDA) (van den Bergh y col., 2006). Otro estudio revelo que las mujeres que presentaban estrés post-traumático y que habían cursaron su embarazo durante la época del holocausto y la segunda guerra mundial, tenían hijos que no presentaban desordenes emocionales o cognitivos pero que mostraban altos niveles de cortisol en sangre y alteraciones metabólicas (Yehuda, 2002). Opuesto a estos resultados, un estudio con mujeres embarazadas durante el atentado al Word Trade Center en Nueva York en 2001, también diagnosticadas con estrés post-traumático, demostró que sus hijos, al año de edad, presentaban una disminución en los niveles de cortisol (Yehuda y col., 2005). El proyecto *Ice storm* es uno de los primeros estudios prospectivos que se enfocó en un grupo de 100 infantes cuya gestación ocurrió durante el desastre natural ocurrido en Quebec en 1998, que dejo a gran parte de la población sin electricidad durante 6 semanas en el mes más frió del año. Hasta la fecha el análisis de los resultados sigue en proceso, pero las primeras evaluaciones indicaron que los niños, presentan una

función cognitiva y lingüística más pobre que los controles (niños de madres embarazadas posterior a la tormenta) y déficit en actividades de juego (King y Laplante, 2015). Otros estudios demostraron que altos niveles de ansiedad y depresión durante la gestación producen infantes con alteraciones en la expresión del comportamiento ante el miedo. Así mismo se correlacionó en forma positiva, que los hijos de madres que padecieron ansiedad durante el primer trimestre de embarazo presentan una reducción en el volumen de la sustancia gris en áreas cerebrales como la CF, el cerebelo y el hipocampo, que se saben involucradas en funciones cognitivas como el razonamiento, la atención, la memoria de trabajo, el lenguaje y el aprendizaje (Sandman y col., 2011).

3.3. El estrés prenatal en modelos animales

A pesar de la relevancia de realizar estudios en humanos para poder determinar las consecuencias del EP directamente sobre esta población y sobre todo poder evitar las dificultades y riesgos de realizar extrapolaciones de resultados entre especies, este grupo de estudio presentas serias limitaciones. Uno de los mayores retos de los estudios prospectivos ha sido poder encontrar mujeres embarazadas que hayan sufrido eventos verdaderamente independientes y que no sean consecuencia de rasgos de personalidad relacionados con la herencia y el medio donde se desarrollaron. Así mismo una gran limitación de los estudios retrospectivos es evitar las subjetividades de quienes relatan una historia de vida y el impedimento de realizar mediciones fisiológicas durante la exposición al estímulo estresante. Es por estas razones que la mayoría de los trabajos sobre los efectos del estrés gestacional se han realizado empleando modelos animales. Estos modelos ofrecen la ventaja de realizar experimentos con individuos distribuidos al azar y controlar el tipo de estímulo estresante en términos de su intensidad, duración y el momento en que se aplica. También se puede evaluar las consecuencias sobre las crías en diferentes etapas, lo que permite un seguimiento y determinaciones más precisas. Así los experimentos con modelos animales nos permiten entender los mecanismos por los cuales el EP afecta el desarrollo del SNC y sus consecuencias, al mismo tiempo que se pueden realizar hipótesis sobre este procesos para ser evaluadas en los humanos (Charil y col., 2010, Weinstock, 2001).

Los protocolos que se emplean para el estudio del EP en modelos animales de experimentación son de diversos tipos. En general, varían en el tipo de estrés aplicado, en el tiempo de aplicación, en el momento del desarrollo en que se estudia y en la especie de animal que se emplea (Huizink y col., 2004). Independientemente del tipo de paradigma de estrés utilizado, la mayoría de estos estudios coinciden en que las crías sometidas a EP presentan variaciones en la función del eje HHA, disrupción de las funciones neuronales, repuestas exacerbadas a situaciones de estrés y desordenes comportamentales (Maccari y Morley-Fletcher, 2007). Uno de las consecuencias del EP mejor descripta es la alteración del eje HHA la cual se basa en una caída de los niveles de los receptores de GC en el HPC del feto, lo cual promueve una disminución en la señal de retroalimentación negativa del eje, llevando a un aumento de los GC en circulación en el feto. El exceso de los corticoides en este período del desarrollo produce cambios en el metabolismo, en el sistema cardiovascular y desbalances en el SN entre otros efectos a largo plazo (Cottrell y Seckl, 2009).

3.3.1. Efectos del estrés gestacional sobre parámetros conductuales

La mayoría de los cambios emocionales y de comportamiento que se encuentran estandarizados en el humano para detectar síntomas de diversas condiciones neuropsiquiatrícas no son posibles de evaluar en los modelos animales. Por esta razón, los estudios comportamentales en experimentación básica miden parámetros de comportamientos en contextos controlados que emulan aquellos medidos en los humanos, por ejemplo: la pérdida de interacción social, cambios en el manejo de situaciones de estrés, la aparición de anhedonia y ansiedad entre otros. A lo largo del tiempo se ha desarrollado una importante batería de pruebas para evaluar estos parámetros, que se valen de las respuestas de los individuos de experimentación a estímulos artificiales para promover esos comportamientos. Aplicando estas pruebas, diversos estudios han demostrado que las crías de ratas y ratones sometidas a EP permanecen inmóviles por más tiempo que los controles en el test de nado forzado, observándose que las hembras permanecen inmóviles por un tiempo aún más prolongado que los machos. Esto indica que las hembras EP tienen un menor manejo de las situaciones estresantes lo cual también coincide con sus altos niveles de anhedonia (Keshet y Weinstock, 1995, Alonso y col., 2000). Otra prueba

muy utilizada en la evaluación de la ansiedad y de reacción al miedo es el laberinto en cruz elevado, donde se mide el tiempo en que los animales pasan recorriendo los brazos abiertos de la cruz o los brazos cerrados. En el caso de ratas EP, estas permanecen menor tiempo en espacios abiertos, lo cual indica un aumento en el comportamiento ansioso comparado con las ratas controles (Vallee y col., 1997).Tanto las hembras como los machos EP jóvenes muestran un comportamiento inadecuado en el test de suspensión por la cola, ya que permanecen inmóviles por más tiempo cuando se los suspende y les toma mayor cantidad de tiempo reaccionar ante el mismo estimulo, lo que coincide con una respuesta de tipo depresiva (Zhang y col., 2013). En test de evaluación de la memoria y el aprendizaje, como el laberinto de agua, las ratas EP muestran un menor puntaje que las controles ya que no aprenden a relacionar las claves para completar el aprendizaje durante la prueba y también expresan déficits en el reconocimiento de objetos novedosos lo cual demuestran deficiencia en la memoria, un síntoma típico del estrés postraumático, de la depresión y de otros desordenes neurofisiológicos (Lemaire y col., 2000). En las pruebas de evaluación de síntomas relacionados con la esquizofrenia y otros trastornos psiquiátricos, las ratas EP muestran una reducción en el tiempo de respuesta lo cual indica una menor reacción sensomotora (Koenig y col., 2005). Los individuos de los modelos de EP muestran sensibilidad elevada a anfetaminas, normalmente usadas en la evaluación de psicosis y en los desórdenes de personalidad (Wilson y Terry, 2013).

3.3.2. Efecto del estrés prenatal sobre la morfología y función del sistema nervioso

Las estructuras cerebrales, como la CF y el HPC, intervienen en los procesos de aprendizaje, de memoria y de respuesta al estrés. Debido a que las perturbaciones comportamentales observadas en individuos EP están directamente relacionadas con estos procesos, es que gran porcentaje de los estudios sobre los efectos fisiológicos del estrés gestacional se enfocan en la CF y en el HPC (Weinstock, 2011, Huizink y col., 2004). Se ha comprobado que las ratas expuestas a EP tiene una reducción en el tamaño del HPC concomitantemente con pérdida de neuronas. En particular, el estrés por inmovilización aplicado en la última semana de gestación resulta en una menor proliferación celular en el área del giro dentado en las crías machos y una disminución de la cantidad de espinas dendríticas en las células piramidales de la CF (Murmu y

col., 2006, Lemaire y col., 2000, Stefanis y col., 1999). Más aún, se ha demostrado que el EP produce una reducción de hasta 30 % en el número de sinapsis y en los niveles de neurogénesis, lo que conllevaría una reducción en la generación de la LTP, daños en la función cognitiva y déficits en distintos tipos de memorias, alteraciones que fueron comprobadas tanto en ratas como en ratones EP machos (Lui y col., 2011, Fujioka y col., 2006).

Trabajos anteriores realizados por nuestro laboratorio, han demostrado que el estrés por inmovilización promueve un aumento de los receptores dopaminérgicos de tipo D2 en diferentes áreas del cerebro, como la corteza, el núcleo *accumbens* y la región hipocampal CA1 (Berger y col., 2002). Posteriormente encontramos que el aumento del receptor D2 en el núcleo *accumbens* conlleva una pérdida de la normal asimetría del sistema entre los dos hemisferios cerebrales de los animales EP y la pérdida de esta característica no se producía en el *caudado putamen* (Adrover y col., 2007). En este mismo sistema de neurotransmisión se evaluó la expresión de los factores de transcripción dopaminérgicos, Nurr1 y Pitx3 y de la enzima TH. Los resultados mostraron que el factor Nurr1 presenta una expresión elevada en los machos EP a distintas edades, mientras que Pitx3 presentaba un aumento únicamente en las ratas adultas (60 DPN). En este modelo la TH mostró una disminución significativa en ratas de 7 DPN y recuperó niveles normales de expresión a los 28 DPN de los individuos EP (Katunar y col., 2009, Katunar y col., 2010). En edad adulta los machos EP mostraron altos niveles de TH en el área tegmental ventral y una mayor susceptibilidad a los efectos de la 6-hidroxi-DA (Baier y col., 2014). En su conjunto estos resultados indican que el estrés durante el desarrollo fetal afecta directamente al sistema dopaminérgico e induce una alta susceptibilidad a los insultos neuroquímicos, especialmente en el área mesolímbica. El trabajo de Silvagni y col (2008) puso en evidencia que la estimulación de los individuos EP mediante la aplicación de anfetaminas genera un aumento de los niveles de DA en el núcleo *accumbens*, mientras que Carboni y col (Carboni y col., 2010), mostraron que este tratamiento induce una disminución de la liberación del neurotransmisor en la CF de las ratas estresadas durante la gestación. Resultados de estudios más recientes demostraron que, el estrés gestacional provoca una reducción de los niveles del receptor D2 en el HPC de ratas prepúberes, conjuntamente con una reducción de los árboles dendríticos neuronales de esta área cerebral. Por otra parte las ratas EP adultas mostraron una disminución en la expresión del receptor de estrógenos en la CF y en el HPC (Pallares

y col., 2013a). Debido a que el desarrollo del sistema dopaminérgico es influenciado por los andrógenos y que el EP modifica los niveles de testosterona (Pallares y col., 2013b) estos resultados sugieren que el insulto gestacional podría modificar el efecto la organizacional de los andrógenos durante etapas críticas del desarrollo cerebral en los individuos macho, modulando así la actividad de la DA.

La exposición a estrés durante la gestación promueve alteraciones en distintos puntos del sistema glutamatérgico. Uno de los efectos más estudiados se produce a nivel de la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico, donde se han registrado disminuciones en los niveles de glutamato, acompañado por un desbalance en la relación Glu/ GABA, dos medidas correlacionadas con las expresión de desórdenes emocionales como la ansiedad, la depresión y los trastornos de la memoria (Chen y col., 2010). También se han detectado disminuciones en los niveles de los receptores glutamatérgicos en la postsinapsis por una caída en la fosforilación de sus subunidades NR1 y NR2 del NMDA con disminución del mismo receptor en áreas corticales (Kinnunen y col., 2003). Otros estudios han observado un aumento en la expresión de NMDA y mGluR, en el HPC, en la amígdala, en el *caudado putamen* y el cuerpo estriado (Marrocco y col., 2012) y modificaciones en los valores de ARNm de las subunidades del NMDA en las crías de ratas sometidas a estrés durante la preñez (Weinstock, 2008). Empleando un modelo de estrés variable por inmovilización Zhang y col (2013) hallaron bajos niveles de fosforilación de GluR1 en el HPC de machos y hembras EP, concomitantemente con menores niveles de ARNm de GLT 1 en esa área y en la CF. La función de los receptores mGlu I en el HPC mostró una disminución en las hembras EP pero un incremento en la misma área en los machos (McCormick y col., 1995). En algunos modelos de EP, las hembras muestran una reducción en el nivel de expresión de las subunidades del receptor NMDA, NR1 y NR2a, en la CF y bajos niveles del receptor metabotrópico GluR 5 en el HPC y en la CF (Van den Hove y col., 2013). En nuestro laboratorio, estudios previos mostraron que el estrés gestacional modificaba la presencia de los receptores en la membrana celular de las neuronas de la corteza, del área CA1 y del núcleo *accumbens*. El EP producía un incremento de NMDA en dichas áreas y un aumento del receptor metabotrópico III en la corteza únicamente (Berger y col., 2002). Por otra parte, Barros y col (2006a) encontraron que las ratas EP adultas, de 90 DPN, presentan en la CF, en el cuerpo estriado y en la región CA1 del hipocampo una pérdida de contactos sinápticos y presencia de hipertrofia astroglía. Puesto que la función glutamatérgica se

basa en la relación estrecha entre las neuronas y la astroglía circundante, estos resultados estarían sugiriendo que la vía del neurotransmisor glutamato estaría dañada en el cerebro de la cría estresada prenatalmente.

El conjunto de investigaciones realizadas hasta la actualidad, han expuesto al estrés prenatal como un factor de influencia en el desarrollo del SN y posteriormente en la expresión de los comportamientos asociados. Entre sus efectos encontramos la reprogramación de los sistemas de neurotransmisión y la modificación en sus funciones, que son fundamentales en la regulación e integración de múltiples procesos cognitivos. Así mismo, como se expuso anteriormente, diversos autores han establecido, que el EP es un modelo experimental que puede reproducir, en los sujetos de estudio, síntomas y rasgos asociados a diversas psicopatías y enfermedades neurodegenerativas. Paralelamente, gran interés ha surgido en los últimos años sobre el neurotransmisor glutamato, ya que se han detectado deficiencias en el funcionamiento de su sistema de neurotransmisión en cerebros afectados por diversos desordenes neurofisiológicos como la depresión, el desorden bipolar y la esquizofrenia.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo se orienta a determinar los efectos del estrés, aplicado durante la gestación, sobre la neurotransmisión glutamatérgica a fin de evaluar sus consecuencias neurológicas en la rata adulta. Para obtener un conocimiento más completo acerca de cómo se encuentra el sistema glutamatérgico en sujetos adultos que sufrieron estrés prenatal, se postuló la siguiente Hipótesis de trabajo: "El estrés prenatal genera cambios en puntos clave de la sinapsis del sistema glutamatérgico, alterando el funcionamiento de la corteza frontal, el hipocampo y las funciones que regulan". Para poner a prueba esta hipótesis se plantearon diferentes objetivos específicos.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del estrés prenatal sobre el metabolismo del glutamato en cerebro de ratas.

I. Cuantificar, mediante la técnica de cromatografía liquida-espectroscopia de masa, el aminoácido glutamato y otros metabolitos derivados en la corteza frontal y el hipocampo de ratas sujetas a estrés prenatal y en los controles de referencia.

II. Realizar la cuantificación en machos y hembras jóvenes y adultas.

2. Determinar el nivel de expresión del transportador vesicular, vGluT-1 en el modelo de estrés prenatal.

I. Evaluar mediante inmunohistoquímica los niveles del transportador vesicular vGluT1 en la corteza frontal y el hipocampo de individuos controles y estresados durante la gestación.

II. Realizar la cuantificación en ratas macho y hembra en edad adulta.

III. Realizar, mediante microscopia electrónica, una evaluación morfológica de la sinapsis glutamatérgicas en la corteza frontal y el hipocampo de las ratas adultas.

3. Evaluar la liberación del neurotransmisor glutamato en respuesta a la estimulación de las células cerebrales.

I. Cuantificar, mediante la técnica de superfusión, el porcentaje de glutamato liberado después de aplicar un estímulo despolarizante en la corteza frontal y el hipocampo de ratas estresadas prenatalmente y controles.

II. Realizar la cuantificación en ratas macho y hembra adultas.

4. Medir el nivel de expresión de los receptores del sistema glutamatérgico.

I. Evaluar los niveles de los receptores, NMDA y AMPA, en la corteza frontal y el hipocampo de ratas de ambos grupos experimentales.

II. Realizar la cuantificación en ratas macho y hembra adultas.

III. Medir la expresión de ARN mensajero de las proteínas, NR1 y GluR4, en los mismos animales de experimentación.

IV. Realizar la cuantificación de ARN mensajero, en ratas macho y hembra adultas.

5. Evaluar la expresión de los transportadores glutamatérgico, GLT1 y GLAST en el modelo de estrés prenatal.

I. Evaluar los niveles de la proteína de los transportadores de glutamato, GLT1 y GLAST, en la corteza frontal y el hipocampo de ratas de los dos grupos experimentales.

II. Realizar la cuantificación en ratas macho y hembras, jóvenes y adultas.

III. Realizar la cuantificación del ARN mensajero de las proteínas de ambos transportadores en la corteza frontal y el hipocampo de las ratas de ambos tratamientos

IV. Realizar la cuantificación en ratas macho y hembras adultas.

6. Evaluar la función de los transportadores glutamatérgico, GLT1 y GLAST en el modelo de estrés prenatal.

I. Medir la captación de glutamato en dos fracciones cerebrales: glial y neuronal. Esta medición se realizara en la corteza frontal y el hipocampo de ratas de ambos grupos de experimentación.

II. Realizar la cuantificación en ratas macho y hembra adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales utilizados

1.1. Drogas y reactivos

1-^{13}C-glucosa (Cambridge Isotopes laboratorios Inc.), 2-β-mercatoetanol (Amersham), 3,3´-diaminobencidina (DAB) (Sigma-Aldrich). Ácido acético glacial, ácido ascórbico (Merk), ácido etilen diamino tetracético (EDTA) (Syntex), ácido fosfórico 85% (Sigma-Aldrich), ácido perclórico (Merk), acrilamida (GE Healthcare), azul de coomassie G-250, azul de bromofenol (Invitrogen life technologies). Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich). Carbonato de sodio (Anedra), clorhidrato de Xilasina (Kensol König), cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio (Anedra). Deoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich), dihidrokainato (DHT), DL-ditiotreitol (Sigma-Aldrich), dodecilsulfato sódico (SDS) (Invitrogen life technologies). ECL premix luminata crescendo y ECL plus (Millipore), enzima Superscript II (Invitrogen life technologies), estreptavidina peroxidasa (Sigma-Aldrich), etanol 95% (Merk). Filtros de fibra de vidrio (G/FB Whatman), fluoromount Aqueous Mounting Medium (S3023, Dako), Folin Ciocalteu (Anedra), fosfato de potasio (Anedra), Freón. Glicerol (Merk), glucosa (Anedra), glutaraldehido (Sigma-Aldrich). Heparina (Veinfar), HEPES (Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio (Anedra). IGEPAL CA-630 e inhibidor de proteasas (Roche). Ketamina (Holliday® Scott- Argentina). L-[3,4-^{3}H]-acido glutámico (Perkin Elmer). Medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich), metilen-bisacrilamida (GE Healthcare). Nitrito de sodio (Anedra). Optiphase Hisafe 3 (Perkin Elmer). Paraformaldehido y Percoll (Sigma Aldrich), peroxido de hidrogeno 30% (Merk), persulfato de amonio (Sigma-Aldrich, polifluoruro de polivideno (PVDF. Immobilon, Millipore), polyATrack III (Promega). Sacarosa (Anedra), seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich), sodio acetato anhidro (Anedra), sulfato de amonio (Sigma-Aldrich), sufato de cobre, sulfato de magnesio y sulfato de sodio (Anedra), suero fetal bovino (Sigma-Aldrich), SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Tartrato de sodio (Merck), TEMED (Ge Healthcare), threo-β-benziloxiaspartato (TBOA) (Tocris Bioscience), tris-HCl y triton-X 100 (Sigma-Aldrich), TRIzol® (Invitrogen life technologies), Tween-20 (Sigma-Aldrich). Xileno (Merck).

1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos obtenidos en conejo fueron: anti GLT1 y anti GLAST (donado por el Dr. Niels Danbolt), anti NR1ζ (sc-9058, Santa Cruz), anti GluR4 (8070, Cell Signaling), anti GS (G2781, Sigma Aldrich), anti vGluT-1 (135 303, Synaptic System). Los siguientes anticuerpos fueron obtenidos en ratón: anti actina (MAB1501R, Millipore), anti sinaptofisina (S5768, Sigma-Aldrich). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti IgG de conejo-HRP (P0217) y anti IgG de ratón-HRP (P0447) (Dako Cytomation). Anti IgG de conejo-biotinilado (B7389, Sigma-Aldrich), anti IgG de ratón Alexa fluor 488 (A- 11001, Invitrogen) y anti IgG de conejo cy3 (711-165-152, Jackson Inmuno Research)

1.3. Equipos

Baño termostático con agitación (Dubnoff), bomba peristáltica (Blue Solution). Caja oscura acoplada a una cámara digital (Leica), centrifuga (Sorvall) con rotor SM24 o rotor SS34, contador de centelleo líquido β (Wallac), cortador de tejido (Chopper, McIlwain), crióstato (Leica CM1850). Espectrofotómetro UV- visible (Beckman). Homogeneizador (Ultraturrax), HPLC (Shimadzu 10 A VP) acoplado a un espectrómetro de masa (Shimadzu 2010). Microscopio de luz y fluorescencia (Olympus BX50) acoplado a una cámara digital (CoolSnap), microscopio electrónico de transmisión (Zeiss 109). Termociclador (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems). Vibratomo (Oxford).

2. Métodos empleados

2.1. Modelo de estrés prenatal

2.1.1. Preparación de los animales experimentales

Las ratas Wistar de aproximadamente 250 gr fueron obtenidas del Bioterio central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA y del Bioterio central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Para la producción de hembras preñadas, un macho experimentado y una hembra virgen se colocaron en una jaula de apareo hasta el día que se corroboro el apareamiento por la presencia de tapón vaginal y se

confirmó por exudado vaginal la presencia de espermatozoides. Este día se designó como el primer día de gestación. Las hembras preñadas (N= 8) se acomodaron en jaulas individuales con libre acceso a agua y comida, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas por período a una temperatura de 21 a 23 °C y con humedad del 40 al 60 %, que se mantuvieron constantes durante todo el experimento. Estas hembras fueron divididas aleatoriamente en 2 grupos experimentales: estrés y control (n= 4).

2.1.2. Estrés por inmovilización

En el día 14 de gestación, las ratas preñadas pertenecientes al grupo estrés, fueron colocadas en cepos de acrílico transparente de 54 a 64 mm de diámetro interno, durante 45 minutos 3 veces por día (9 y 12 am y 4 pm) hasta el día último día de gestación (Ward y Weisz, 1984). Las sesiones de estrés se realizaron en un cuarto conductual bajo las mismas condiciones de bioterio (22°C y 40-60 % de humedad). Las hembras del grupo control permanecieron sin ser perturbadas durante toda la preñez. El primer día postnatal (DPN) se cuantifico el número de crías y se determinó el sexo de cada una, en caso de ser necesario se redujo la camada a 10 crías manteniendo la misma proporción entre machos y hembras. En el DPN 21 se realizó el destete, las crías provenientes de madres estresadas se designaron como grupo estrés prenatal (EP) y aquellas provenientes de madres control como grupo control (C). Todas las crías fueron separadas por sexo y tratamiento y agrupados de a 5 ratas de diferentes camadas por cada jaula. Los animales experimentales permanecieron en el bioterio bajo condiciones estandarizadas hasta los 28 o 60 días de edad, cuando fueron trasladados al laboratorio para realizar los distintos ensayos. La figura 5 muestra un esquema explicativo del diseño experimental. Todos los procedimientos mencionados se realizaron bajo los estándares para el cuidado de animales de laboratorio de la Guía de NIH ("NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals") y siguiendo las regulaciones locales fijadas por el Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, resolución 121/2013), tomando los recaudos necesarios para reducir al mínimo el número de individuos en cada experimento.

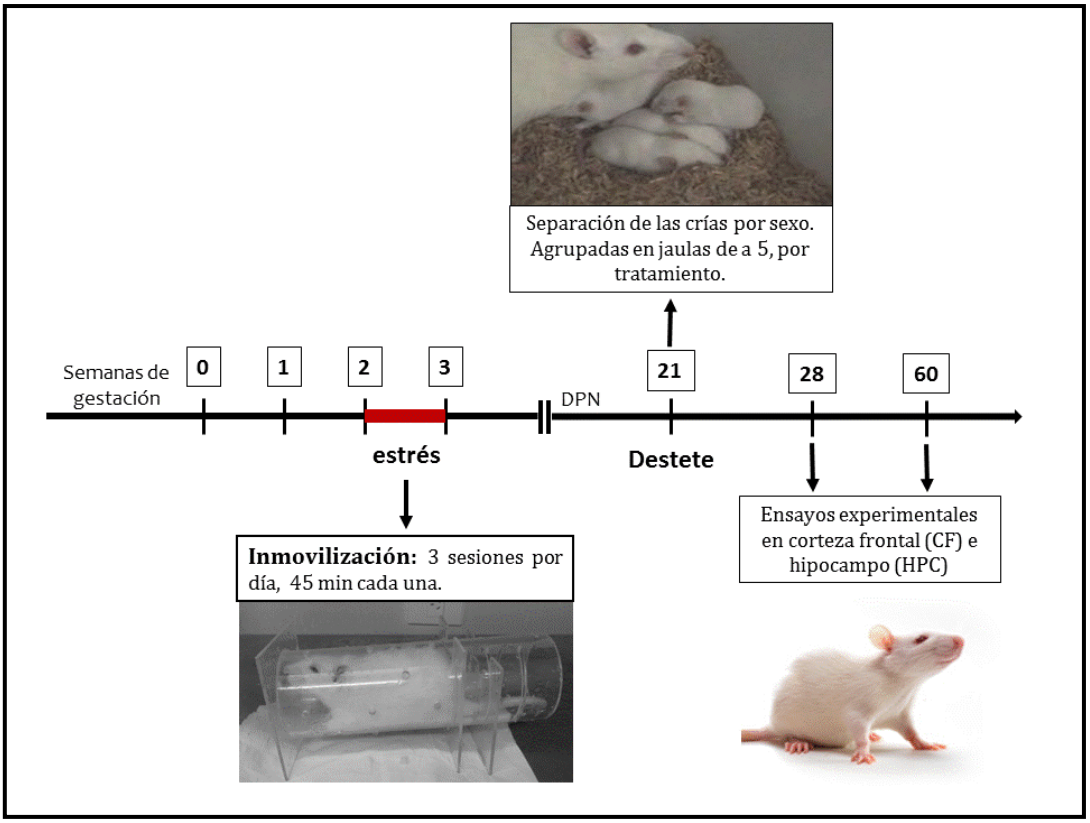


Figura 5. Esquema de diseño experimental Estrés= Estrés prenatal por inmovilización durante la 3er semana de gestación. Destete= Separación de la madre luego de la lactancia. DPN 28 y 60: distribución de las crías prepúberes y adultas entre los distintos ensayos experimentales.

2.2. Cromatografía liquida y espectrometría de masa

Las crías EP y C, machos y hembras de 28 (n= 6) y 60 (n= 6) días de edad fueron inyectados con una solución de 1-^{13}C-glucosa al 99% en agua (pH 7) y luego de 15 minutos en reposo fueron sacrificados con guillotina. La cabeza fue sumergida en nitrógeno líquido y luego se almacenó a -80°C hasta su uso. El día del experimento se extrajo el cerebro y rápidamente se separó el hipocampo (HPC) y la corteza frontal (CF). Inmediatamente las áreas fueron homogeneizadas con una solución de 7% acido perclórico a razón de 1 ml cada 100 gr de tejido. Esta preparación fue centrifugada a 4000g por 5 minutos. El primer sobrenadante se reservó y el pellet se resuspendió en agua destilada para centrifugarse bajo las mismas condiciones anteriores. Los dos sobrenadantes se mezclaron, el pH fue ajustado a 7 y el total del homogeneizado fue liofilizado. Cada muestra fue resuspendida con agua destilada para ser analizadas con

un sistema de cromatografía liquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés: high performance liquid chromatography) acoplado a un espectrómetro de masa.

Se cuantifico la abundancia de ^{13}C en cada muestra y se corrigió el valor por la abundancia natural de isótopo, para obtener este valor solo se tuvo en cuenta el pico del espectro de masa donde se ubican las moléculas marcadas con un solo átomo de ^{13}C. Así se definió el % de ^{13}C incorporado al metabolito de interés como la variable de estudio y se expresa como la media ± error estándar (EE). Este protocolo es una modificación del publicado en Bak y col (2006).

Los estudios de metabolismo se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Arne Schousboe en el departamento de Diseño de Drogas y Farmacología de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de la Universidad de Copenhague, Copenhague, Dinamarca.

2.3. Método de superfusión

2.3.1. Preparación de las áreas cerebrales

4 ratas macho y 4 ratas hembra de cada grupo experimental (C y EP) fueron decapitadas a los 60 días de edad, rápidamente se extrajeron los cerebros y se les disecó el HPC y la CF. Estas áreas se cortaron en secciones de 180 µm con un cortador McIlwain. El tejido se colocó en buffer Krebs-Ringer (BKR: NaCl 0,126 M, KCl 2,5 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, Na_2SO_4 1,2 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, glucosa 0,1 %m/v, ácido ascórbico 0,06 mM, pH 7,4 y saturado con O_2/CO_2 95/5 %, respectivamente). Se incubo a 37 °C en un baño térmico con agitación por 10 minutos. Luego se colocaron en una solución de ^{3}H-acido glutámico 0,1 % v/v en BKR y se incubaron por 30 minutos en el mismo baño. Posteriormente se inició el protocolo de superfusión.

2.3.2. Superfusión

Cada una de las secciones de tejido se colocó en una cámara de incubación que se encontraba a 37°C y que recibía un flujo constante de 0,7 ml/min de solución. Se inició el protocolo lavando el tejido durante 30 min con BKR. Luego de este periodo se recogieron fracciones del fluido cada 2,5 min (figura 6). Las fracciones colectadas sucesivamente fueron: 5 de lavado con BKR, 4 de lavado con KCL 56 mM en BKR y 3

más de lavado con BKR. La superfusión con BKR sirve para estimar la liberación basal del tejido y el buffer Krebs KCl 56 mM como solución estimulante de la liberación de neurotransmisores. Al finalizar la superfusión cada una de las áreas cerebrales fue homogeneizada con ácido perclórico (0,2 M) y sonicada. 500 µl de cada fracción y del homogeneizado fueron colocados en viales con líquido de centelleo y se midió su radioactividad en un contador de centelleo β. Cada medición se realizó por duplicado y se hizo un control de la radioactividad total al inicio y final del experimento. Para realizar el análisis de los datos se calculó la diferencia entre la cantidad de ^{3}H-glutamato liberado en forma basal y la cantidad liberada durante la estimulación. La cantidad liberada se determinó sumando el valor medido en cada fracción al medido en el tejido total y se obtuvo la cantidad de radioactividad acumulada. El valor de cada fracción se relativizo al valor acumulado, obteniendo así el % de ^{3}H-glutamato liberado. La variable, % de liberación, se expresa como la media ± EE.

Los estudios de superfusión se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Ricardo Cabrera en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Facultad de Ciencias de la Salud en la Universidad de Mendoza, Mendoza, Argentina.

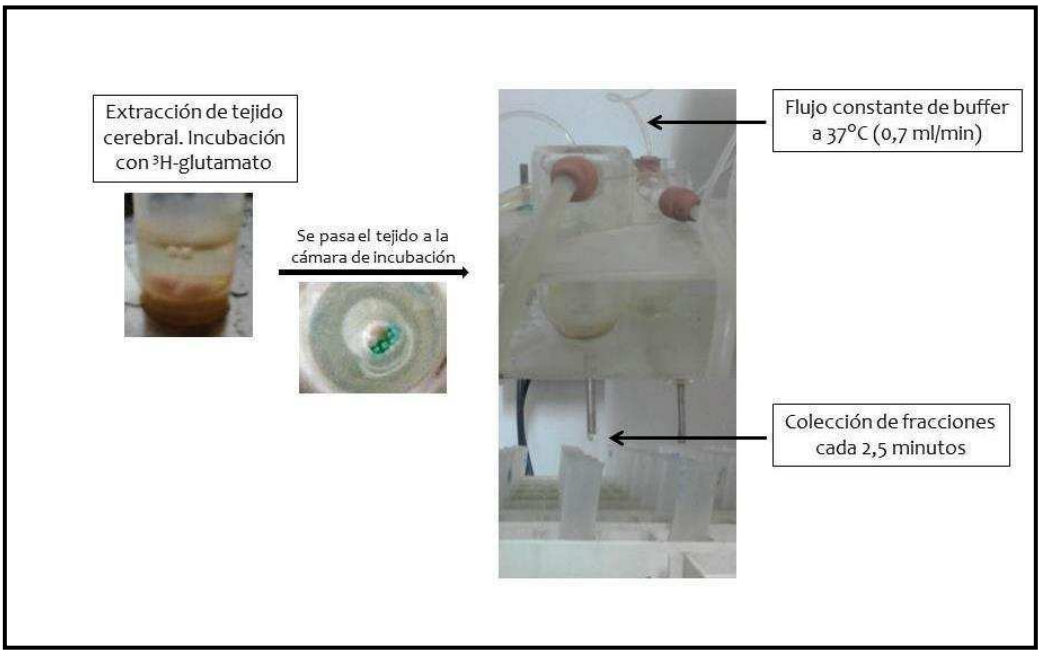


Figura 6. Esquema del diseño experimental para los ensayos de superfusión con tejido cerebral de ratas C y EP.

2.4. Expresión de proteínas y niveles de ARN mensajero

2.4.1. Western blot

I. Electroforesis

Se sacrificaron por decapitación, ratas machos y hembras de los dos grupos experimentales a los 28 y 60 días de edad (n= 4, para cada grupo experimental). Se extrajeron la CF y el HPC de cada individuo. El tejido fue homogeneizado en buffer RIPA (1 % IGEPAL CA-630, 0,5 % sodio desoxicolato, 0,1 % SDS, en PBS) con el agregado de 1 µl de inhibidor de proteasas. Se centrifugo a 10000 g por 7 minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Alícuotas de las muestras fueron mezcladas con buffer de muestra (SDS 4%, glicerol 20%, 2-β-mercatoetanol 10%, azul de bromofenol 0,004% y tris-HCl 0,125 M). Las proteínas de la muestra fueron separadas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS. Se realizó la corrida electroforética aplicando 75 V constantes para la concentración de la muestra (gel concentrador: acrilamida 30%, bisacrilamida 1%, Tris-HCl 0,5 M, SDS 10%; H2O destilada, persulfato de amonio 10% y TEMED) y a 125 V constantes para la separación de las proteínas (gel separador: acrilamida 30%, bisacrilamida 1%, Tris-HCl 1,5 M, SDS 10%; H_2O destilada, persulfato de amonio 10% y TEMED). Luego se transfirieron a una membrana de PVDF aplicando 200 mA durante 1 hora. Para la inmunodetección la membrana se colocó en una solución de bloqueo (leche descremada 5% en 3,2 mM Na_2HPO_4; 0,5 mM KH2PO4; 1,3 mM KCl; 135 mM NaCl; pH 7,4; Tween-20 0,1%) durante 2 horas para bloquear sitios inespecíficos. Pasado este tiempo se agregaron los diferentes anticuerpos primarios en solución de bloqueo y se incubaron las membranas durante toda la noche a 4°C. A continuación se lavaron y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa en la misma solución de bloqueo. Las bandas inmunopositivas fueron detectadas por quimioluminiscencia. Utilizando el software de imagen Imaje J (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland, USA) se cuantifico la densidad óptica de las bandas positivas y se relativizo este valor al valor obtenido en la cuantificación de la proteína actina, obteniendo así un valor de densidad óptica relativa (DOR), determinando una medida de la cantidad de proteína detectada que se expresa como la media de DOR ± EE.

II. Marcación para receptores glutamatérgicos

Se sembraron en cada gel 50 µg de proteínas y se realizó la electroforesis. Los anticuerpos primarios utilizados en el proceso inmunomarcación fueron: IgG de conejo anti NR1ζ 1/100, IgG de conejo anti GluR4 1/500 y IgG de ratón anti actina 1/5000. Los anticuerpos secundarios fueron anti HRP de conejo y anti HRP de ratón.

La detección de las bandas inmunopositivas se realizó por aplicación de ECL plus para la reacción de quimioluminiscencia y se visualizó en un sistema de imagen Storm.

III. Marcación para glutamina sintetasa

Se sembraron en los geles 20 µg de proteína. Se utilizó para realizar la inmunomarcación el anticuerpo primario de conejo anti GS, 1/20000 y un anticuerpo secundario anti HRP de ratón, 1/5000.

Se utilizó ECL (premix luminata crescendo) para la detección de las bandas inmunopositivas y se revelaron en una caja oscura acoplada a una cámara Leica (D-Lux 3).

IV. Marcación para transportadores glutamatérgicos

Se sembró 20 µg de proteína por gel y se detectaron con los anticuerpos primarios: IgG de conejo anti GLT1 1/2500 y de conejo anti GLAST 1/2000 y de ratón anti actina 1/5000. Los anticuerpos secundarios que se usaron fueron anti HRP de conejo, 1/5000 y anti HRP de ratón, 1/5000.

Se utilizó ECL (premix luminata crescendo) para la detección de las bandas y se revelaron en una caja oscura acoplada a una cámara Leica (D-Lux 3).

2.4.2. Método de Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó empleando la metodología de Bradford M. M (1976). Brevemente, a 1 µl de tejido cerebral homogeneizado se le adiciono 90 µl de H_2O y se mezcló vigorosamente. Luego se agregó 1 ml del reactivo de Bradford (azul de coomassie, etanol 95%, acido fosforito 85%, H_2O milliQ) y a los 10 minutos se midió la reacción colorimétrica con un espectrofotómetro UV-visible a 595 nm. Se

realizó paralelamente una curva estándar con sero albúmina bovina para hacer una relación entre la absorbancia medida y la cantidad de proteína en las muestras.

2.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa con trascripción reversa, método cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR)

Las áreas cerebrales HPC y CF de ratas C y EP, macho y hembra de 60 días (n= 6, para cada grupo experimental), fueron homogeneizadas en reactivo de TRIzol® para la extracción de ARN total y se cuantifico por espectrometría usando una relación de absorbancia 260/280 nm y empleando la ecuación: DO_{260} x 0,04 x Fd = [ARN] µg/µl. Partiendo del ARN total extraído, se aisló ARN polyA+ (ARN considerado mensajero) utilizando el sistema de aislamiento PolyATrack III y se almaceno a -70°C hasta su utilización. El ARN mensajero (ARNm) purificado fue retrotranscrito para generar ADN copia (ADNc) utilizando enzima Superscript II, oligonucleótidos oligo-dt y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó un control negativo sin agregado de la enzima para supervisar la ausencia de ADN geonómico. El ADNc se conservó a -20º C hasta su utilización. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real se realizó con un termociclador 7500 Real Time PCR System utilizando el reactivo SYBR Green PCR Master Mix para detectar los productos de la reacción. Para verificar la detección de un único producto de PCR, todas las reacciones se sometieron al protocolo de disociación por calor luego del ciclo final de la PCR y se realizó una curva de *melting*. (Por el término en inglés para fusión): La presencia de un único pico en esta curva confirmo la presencia de producto único.

Las secuencias de oligonucleótidos se diseñaron con el programa Primer Express (Applied Biosystems) y se especifican en la tabla 1. Los genes considerados de referencia para la normalización de los datos figuran en Nelissen y col (2010).

Gen	**secuencia 3´- 5´**
EAAT1 *(Slc1a3)*	F: CAGTCGTTTTGCGACGCTAGTA R: AATTGCGACAAATGGGTCACACT
EAAT2 *(Slc1a2)*	F: GGTCAATGTAGTGGGCGATTCT R: CTGCGTCTTGGTCATTTCGA
NMDAR1 *(Grin1)*	F: GCATCGTAGCTGGGATTTTCC R: TGTGTTCCTACGGGCATCCT
GLUR4 *(Grin4)*	F: CGTGTGCTGACCCCTGACT R: TCCCGAACTTTGTCTAATTGCA
CICLOFILINA	F: CATTCAGTCTTGGCAGTGCAG R: AAGCATACAGGTCCTGGCATCT

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos seleccionados para realizar el ensayo de RT-PCR. Entre paréntesis se indica el nombre para cada gen que se registra en el GeneBank.

Para cada gen se emplearon 4 µl de producto PCR diluido 1/100 aproximadamente, dependiendo de la curva de estándares. Se agregaron a esta dilución 8,5 µl de mezcla de reacción (6,25 µl de Master Mix, 0,375 µl de primer y 1,5 µl de H_2O). La curva estándar se preparó con 1 µl de cada muestra de producto de la PCR para generar una mezcla de ADNc. A partir de este preparado se realizaron diluciones seriadas (1/20; 1/40; 1/80; 1/200; 1/400) que formaron los valores para confeccionar la curva de estándares de Ct (ciclo de amplificación, la fluorescencia medida es significativamente mayor al valor umbral) en función del logaritmo de la concentración. Utilizando la curva estándar calculamos la concentración de cada muestra de interés. Cada cuantificación se realizó por triplicado, en la misma placa y se incluyeron controles negativos: sin templado, sin retrotranscripción, sin producto de PCR. La cantidad de ARNm por ciclo de amplificación se relativizo al nivel de ciclofilina (gen de expresión constitutiva usado como control) y el valor obtenido se definió como la variable de estudio.

Los estudios de los receptores y transportadores por RT-qPCR se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Marcela Brocco en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Nacional de General San Martín.

2.4.4. Inmunohistoquímica

I. Preparación del tejido

Ratas C y EP de ambos sexos a los 60 DPN (n= 5) fueron anestesiadas intraperitonealmente con Ketamina/ Xilasina (75 mg/kg: 10 mg/kg). Se comprobó el efecto de la anestesia por ausencia de reflejos corneales y de las patas traseras. Inmediatamente se operó a los animales para realizar una perfusión intracardíaca. Se realizó una incisión en el ventrículo izquierdo y se colocó una sonda conectada a una bomba peristáltica fijada a un flujo de 10 ml/min. Primero se hicieron circular 100 ml de una solución lavadora (ClNa 0,9 %, $NaNO_2$ 0,05 % y heparina de 50 UI) seguida por 500 ml de solución fijadora de paraformaldehido (Sigma) 4 % en PBS (pH 7,4). Una vez extraído el cerebro completo, este se colocó en la misma solución fijadora por 4 hs a 4°C, pasado este periodo la solución se reemplazó por una solución de sacarosa al 15 % en PBS y cuando el cerebro decanto se lo colocó en una solución de sacarosa al 30 % en PBS hasta que volvió al fondo de contenedor. Posteriormente se congelo el cerebro por inmersión en Freón (-40°C) y se almaceno a –80°C hasta su utilización. Los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 25 µm, en un crióstato Leica a -20°C, utilizando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (1998). Se conservaron únicamente, para la CF las secciones delimitadas en las láminas 4 a 13 del atlas y para el HPC las pertenecientes a las láminas 27 a 45 del atlas (figura 7). Todas las secciones fueron conservadas en una solución de glicerol 50% en PBS a -20ºC hasta el día del experimento.

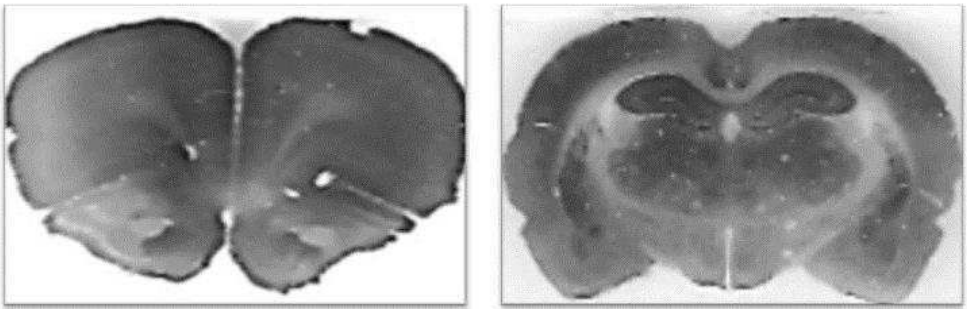


Figura 7. Cortes coronales representativos de las áreas de interés. A la izquierda un corte de corteza frontal. A la derecha una sección del hipocampo.

II. Inmunomarcación

Se procesó el tejido por libre flotación siguiendo el protocolo descripto en Katunar y col (2009). Los cortes de tejido se lavaron 3 veces, durante 5 minutos cada vez, en una solución conteniendo tritón 0,15 % en PBS (buffer A). Para inhibir la actividad endógena de la enzima peroxidasa se incubo el tejido con H_2O_2 0,3 % en buffer A durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. Se lavaron nuevamente los cortes y se bloquearon los sitios inespecíficos con suero fetal bovino al 5 % en buffer A durante 1 hora a temperatura ambiente. Inmediatamente retirado el suero, se colocó el anticuerpo primario anti vGluT-1 a una concentración de 1/2000 en la misma solución de y se incubo toda la noche a 4°C. Paralelamente se realizó un control negativo de la inmunomarcación siguiendo wl mismo protocolo pero sin el agregado de anticuerpo primario. Los cortes se lavaron nuevamente con buffer A, 3 veces cada 5 minutos y a continuación se incubaron 2 horas con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo–biotinilado, 1/250 en buffer A. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno y se incubo el tejido durante 90 minutos con el complejo estreptoavidina-peroxidasa 1/500 en buffer A. Se realizaron nuevos lavados con la misma solución (3 veces de 5 minutos cada uno) y uno adicional con buffer acetato 0,1 M (ácido acético glacial 0.016 %, sodio acetato anhidro 0.82 %, en H_2O, pH 6). Se utilizó 3,3´-diaminobencidina (DAB) 0,035 % p/v, con $(NH_4)_2SO_4$ al 2,5% p/v en buffer acetato para incubar los cortes por 15 minutos y se revelo la actividad de la enzima peroxidasa agregando H_2O_2 0,1 % v/v. Luego de 2 minutos se detuvo la reacción lavando 5 veces con buffer acetato cada 5 minutos. Para terminar se montaron los cortes en porta objetos gelatinizados y se deshidrataron en un gradiente de alcohol (etanol 30, 70, 95 y 100 % 2 minutos cada uno) y xileno (durante 5 minutos). Se colocó un cubreobjetos con medio de montaje (DPX) para evaluar los cortes inmunomarcados en un microscopio de luz y fluorescencia.

La evaluación de la marca se realizó mediante la obtención de imágenes de los cortes observados en el microscopio de luz. Para cada situación experimental se midieron en cada individuo 10 cortes seriados de cada área cerebral y se cuantificaron 3 campos en cada hemisferio. En cada una de las imágenes obtenidas a una magnificación de 20x (objetivo) se midió la DO de la marca y a este valor se le resto la DO obtenida en campos del mismo área que no presentan marca del anticuerpo (DO

del fondo). La cuantificación de DO se realizó con el programa Image J (versión 1.42q) y se expresa como la media ± EE.

III. Inmunofluorescencia

Cortes de las mismas áreas y tratamientos antes descriptos fueron procesados por libre flotación para inmunofluorescencia. Se lavaron los cortes 3 veces con buffer A. Seguidamente se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de bloqueo compuesta por 5% suero fetal bovino en buffer A durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. A continuación los cortes se incubaron durante toda la noche, a 4°C, con los anticuerpos primarios anti vGluT-1 1/2000 y anti- sinaptofisina 1/1000 en buffer A para permitir la colocalización de las proteínas de interés. Se lavaron los cortes 5 veces durante 5 minutos cada vez con buffer A y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti IgG de ratón- Alexa flúor 1/1000 y anti IgG de conejo- cy3 1/1000 por 2 horas a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad. Se lavaron los cortes 4 veces con buffer A y una vez con PBS. Seguidamente se montaron los cortes en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar a temperatura ambiente por 4 horas antes de colocar el medio de montaje para fluorescencia y cubrir los cortes con un cubreobjetos. De esta manera se conservaron a 4°C y en oscuridad hasta su observación.

La evaluación de la marca fluorescente de los anticuerpos se realizó mediante la obtención de imágenes de los cortes observados en el microscopio de fluorescencia. Para cada situación experimental se midieron 10 cortes seriados de cada área cerebral de cada individuo y se cuantificaron 3 campos en cada hemisferio del cerebro. La cuantificación de la marca se realizó sobre imágenes tomadas a una magnificación de 20x, midiendo la DO empleando el programa Image J (versión 1.42q). La variable de estudio se definió como la DO obtenida menos la DO del fondo y se expresa como la DOR media ± EE. La superposición digitalizada de las imágenes de fluorescencia de cada marcador (mezcla) permitió observar la colocalización de ambas proteínas en el tejido evaluado.

IV. Inmunomarcación para microscopia electrónica de transmisión

Se realizó el protocolo de Inmunohistoquímica antes detallado, con algunas modificaciones. La solución fijadora se preparó con paraformaldehido 4% y

glutaraldehido 0,25% en PBS (pH 7,4). La postfijación se realizó en la misma solución fijadora y se dejó el cerebro en sacarosa al 5% en PBS hasta que decanto. Los cortes de cerebro para obtener las áreas de interés (HPC y CF) se realizaron en un Vibratomo Oxford. Se realizaron cortes coronales de 200 µm de espesor pertenecientes a macho y hembra de los grupos C y EP. Los cortes se lavaron con TBS (Tris 0,3% p/v, NaCl 3% p/v, en H_2O, pH 7,5) y se bloquearon los sitio inespecíficos con SFB al 3% en TBS durante 1 hora en agitación. Se incubo el tejido toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti vGluT-1, 1/2000 en SFB 1% en TBS. Al día siguiente se realizaron 5 lavados con TBS por 5 minutos cada uno y se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Se realizaron 5 lavados con TBS y se procedió al revelado de la marca. Se agregó a los cortes una solución de DAB 0,05% p/v en TBS se incubo por 5 minutos y se agregó H_2O_2 0,1% para la reacción de la enzima peroxidasa. Luego de 2 minutos se cortó la reacción lavando con buffer TBS repetidamente y se conservaron las secciones en PBS. Los cortes inmunomarcados fueron postfijados en tetroxido de osmio 2% en PBS por 2 horas, luego el tejido se deshidrato en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol. Se aumentó el contraste de la marca con acetato de uranilo al 5% y se embebieron en Durcupan. Bajo una lupa se seleccionaron y cortaron áreas de tejido de 1 mm2 para cada zona de estudio. Las secciones se tiñeron con citrato de plomo según el método de Reynold (1963), para su observación en un microscopio electrónico Zeiss.

Para cada situación experimental se tomaron 20 imágenes al azar en cada hemisferio con una resolución de 20000x y 85000x, para cada uno de los individuos. Todas las imágenes obtenidas a mayor aumento fueron utilizadas para la descripción ultraestructural de las sinapsis. El largo de la sinapsis fue definido como la relación entre la distancia de borde a borde de la neurona presináptica y el largo del espacio sináptico. Para la semicuantificación de la ultraestructura se emplearon diez fotografías de cada área, región y grupo experimental a 20000x y se contabilizó el número de contactos sinápticos por campo y el ancho de la densidad postsináptica definida como la distancia entre el borde de la neurona postsináptica y la parte más convexa del complejo sináptico observado en la misma imagen (Tagliaferro y col., 2006). El análisis de las imágenes se realizó con el programa Image Pro Plus (versión 5.1).

El estudio morfológico de áreas por microscopia electrónica se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Alicia Brusco en el instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Eduardo De Robertis" en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina

2.5. Captación de glutamato

2.5.1. Preparación de gliosomas y sinaptosomas

El protocolo aquí empleado resulta de una modificación de los protocolos descriptos por Dunkley y col (2008) y Nakamura y col (1993). En el DPN 60 ratas hembra y macho (n= 6), C y EP, fueron sacrificadas por decapitación. Inmediatamente y a 0°C se removió el cerebro, se extrajeron las áreas del HPC y la CF. Este tejido fue homogeneizado en 1 ml de sacarosa 0,32 M con EDTA 1 mM (pH 7,4) por cada gramo de tejido usando un homogeneizador de teflón y vidrio. Los homogeneizados fueron centrifugados en una centrifuga Sorvall a 1000g durante 10 minutos. 2 ml de sobrenadante se vertieron sobre un gradiente de Percoll de 4 capas (2, 6, 10, y 20 %) preparadas con una solución de sacarosa 0,32 M, EDTA 1mM, DTT 0,25 mM y HEPES 20 mM (pH 7,4). Los gradientes fueron centrifugados por 5 minutos a 33500g. La fracción de muestra depositada entre las capas del gradiente de 2 y 6 % de percoll y la encontrada entre las capas de 10 y 20 % de percoll, fueron recolectadas como gliosomas (GPV, del inglés: glial plasmmalemal vesicles) y como sinaptosomas (SYN, del inglés: synaptosome) respectivamente (figura 8). Cada fracción fue diluida en 80 ml de solución de sacarosa 32 M y EDTA 1 mM, y centrifugada a 20000g por 30 minutos para lavar el percoll remanente. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en buffer de reacción (125 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 1,5 mM $CaCL_2$, 1,2 mM $MgSO_4$, 1,25 mM KH_2PO_4, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM Hepes and 10 mM D-glucose, pH 7.4) para usar en el ensayo de captación.

La concentración de proteínas en cada fracción se determinó mediante el método de Lowry (1951).

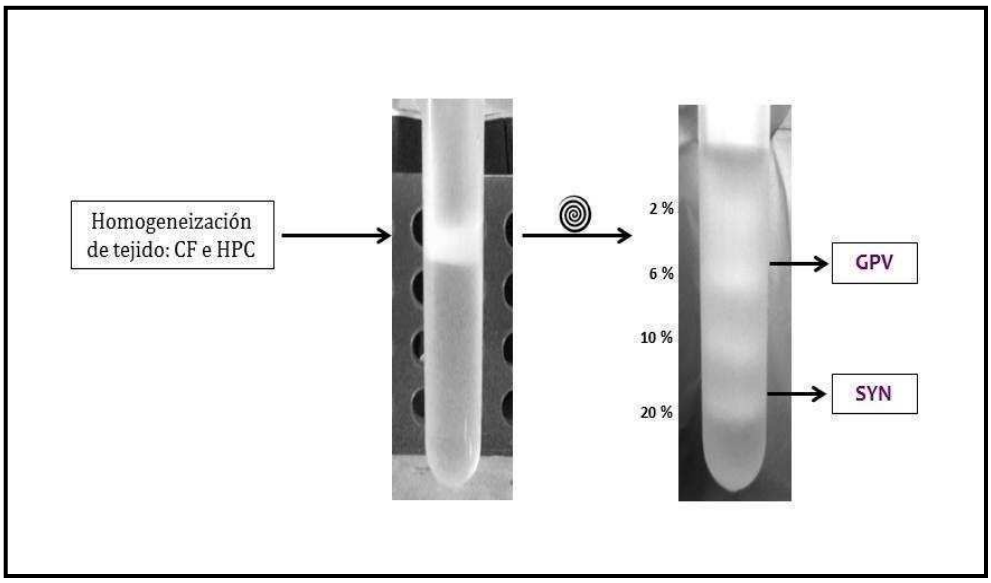


Figura 8. Esquema del protocolo de la preparación de fracciones celulares para la medición de la captación de glutamato. Las imágenes muestran el gradiente de Percoll antes (izquierda) y después (derecha) de la centrifugación. GPV= gliosomas y SYN= sinaptosomas.

2.5.2. Medición de glutamato capturado

La captación de glutamato se realizó utilizando GPV y SYN recién extraídos. La reacción se inició agregando 100 ml de muestra (1 mg/ml de proteínas) a 400 ml de buffer de reacción y se incubaron los tubos en un baño termostatizado a 30°C. En otra serie de tubos 100 µl de buffer de reacción fueron reemplazados por 100 µl de threo-β-benziloxiaspartato (TBOA, 100 µM) o por 100 µl de dihidrokainato (DHT, 100 µM) en el mismo buffer. Una vez a temperatura y en agitación se agregó L-[3,4-^{3}H]-acido glutámico 10 nM (actividad específica: 49,6 Ci/mmol), se incubo por 3 minutos y se interrumpió la reacción con el agregado de 1,5 ml de buffer de reacción frío (0°C). Inmediatamente se terminó el ensayo filtrando por vacío sobre filtros de fibra de vidrio y lavando con buffer de reacción 2 veces luego de filtrar. Los filtros se colocaron en viales con líquido de centelleo y se midió su radioactividad en un contador de centelleo β. Paralelamente se realizaron mediciones controles en tubos con todo el material pero sin tiempo de incubación (tiempo 0) para medir la radioactividad inespecífica en cada muestra.

La cantidad de ^{3}H-acido glutámico incorporada al tejido por miligramos de proteínas se definió como la variable de interés y se expresa como el valor medio ± EE.

2.5.3. Método de Lowry

Para la determinación de la concentración de proteínas presentes en una muestra se aplicó la técnica descripta por Lowry y col (1951). Brevemente, a 5 µl de muestra se le agregaron 0,2 ml de NaOH 0,5 M. Luego de 15 minutos se agregó 1 ml de una solución 1/50 de tartrato de cobre (SO_4Cu 1%, tartrato de Na 2% y CO_3Na_2 2%) y se incubo por 10 minutos. Por último se colocaron 100 µl del reactivo de Folin Ciocalteu y luego de 45 min se midió la reacción colorimétrica con un espectrofotómetro UV-visible a 750 nm. Para determinar la relación absorbancia/cantidad de proteína se realizó una curva de concentración utilizando sero albúmina bovina como proteína estándar.

3. Análisis estadístico

Todos los estudios se realizaron con 4 o 6 ratas de cada sexo y de cada tratamiento (C y EP), las cuales fueron seleccionadas de diferentes camadas de forma aleatoria. De esta manera se generó un valor de n con unidades experimentales independientes para el análisis estadístico de las variables medidas.

Los modelos estadísticos aplicados para el análisis de datos fueron:

- ANOVA de una vía: para evaluar el efecto del factor tratamiento (2 niveles: C y EP) en el estudio del metabolismo glutamatérgico, para analizar el efecto de las drogas inhibidoras de la captación de glutamato (3 niveles: s/inhibidor, TBOA y DHK) y en los ensayos de inmunohistoquímica en CF. En los casos necesarios se realizaron comparaciones a posteriori aplicando el test de Tukey. La diferencia en la comparación se consideró significativa cuando el valor de p fue menor a 0,05. Para el caso particular del ensayo de inmunohistoquímica en el HPC se aplicó un análisis median ANOVA de dos vías para comparar el efecto del factor tratamiento (EP vs C), del factor región (CA1, CA2, CA3 Y GD) y la interacción entre ambos.

- T student: permitió comparar las medias de 2 muestras independientes (C vs. EP) en los estudios de la liberación de glutamato, Western blot y qRT-PCR. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

La evaluación estadística de todos los resultados, se realizó mediante el software InfoStat 2008 y los gráficos se hicieron con Excel 2008.

RESULTADOS

1. El metabolismo del glutamato en el modelo de estrés gestacional

En este ensayo las crías C y EP recibieron una inyección de ^{13}C-glucosa durante la fase de luz de su ciclo. Posteriormente la marca de ^{13}C fue detectada y cuantificada mediante HPLC-EM en el HPC y la CF. El análisis de los resultados se realizó en machos y hembras de 28 días (figura 9) y de 60 días (figura 10) de edad para ambos grupos. La marca del isotopomero se registró en 3 metabolitos de interés: glutamato (GLU), glutamina (GLN) y ácido γ-aminobutírico (GABA). En este estudio, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de los metabolitos marcados entre los grupos analizados. Para realizar la comparación entre los tratamientos, se incluyeron únicamente los aminoácidos monomarcados, es decir aquellos que solo tenían 1 átomo de ^{13}C incorporado en su estructura.

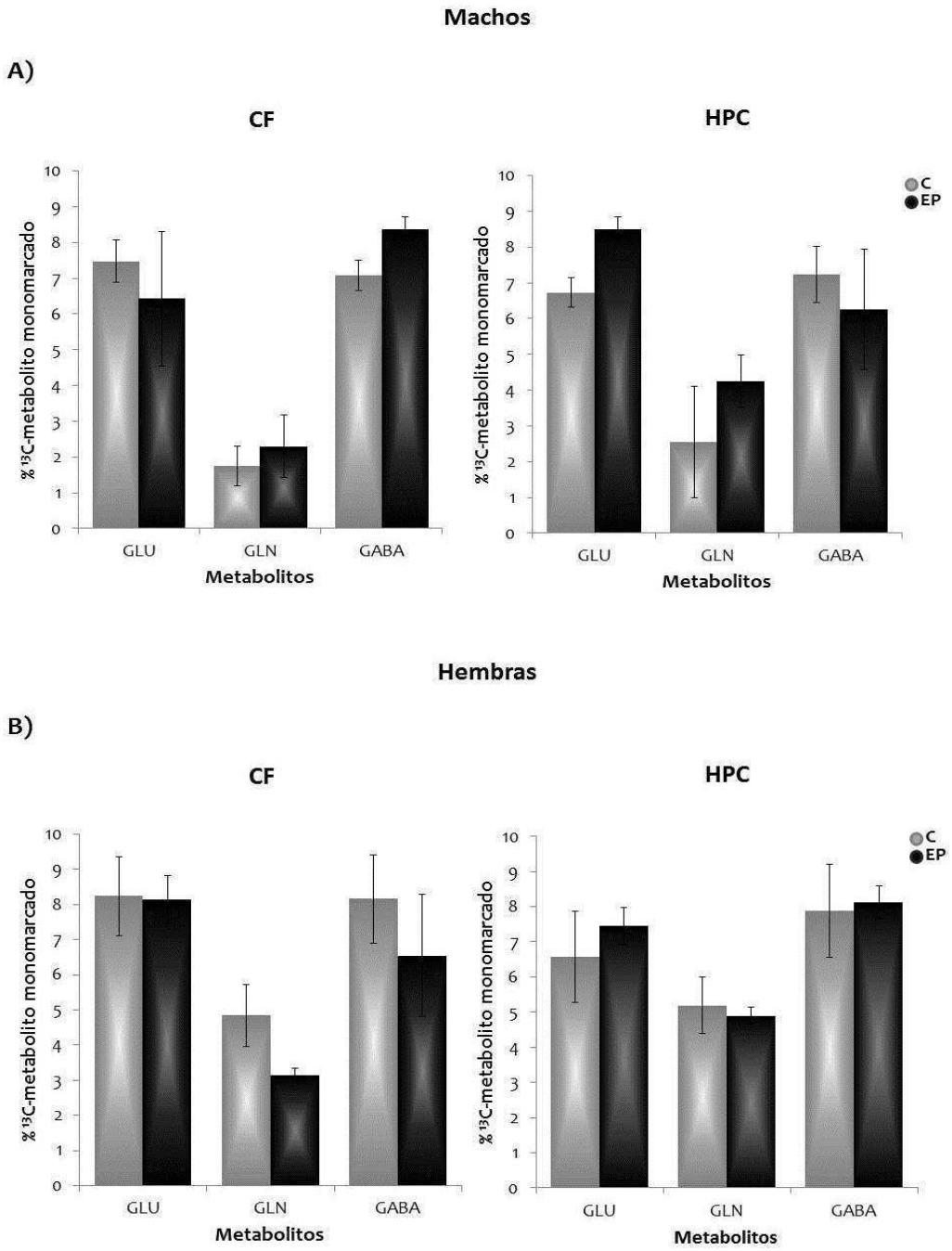


Figura 9. Niveles de glutamato (GLU), glutamina (GLN) y ácido γ-aminobutírico (GABA) medidos por espectrometría de masa en crías de 28 días de edad. A) % de ^{13}C- aminoácidos obtenidos en CF e HPC de ratas machos. B) % de ^{13}C- aminoácidos en ratas hembras en las mismas áreas de interés. En todos los gráficos se expresa para cada tratamiento (C y EP) el valor medio ± EE del porcentaje (%) de aminoácido monomarcado en el total de marca de ^{13}C obtenida (n= 6).

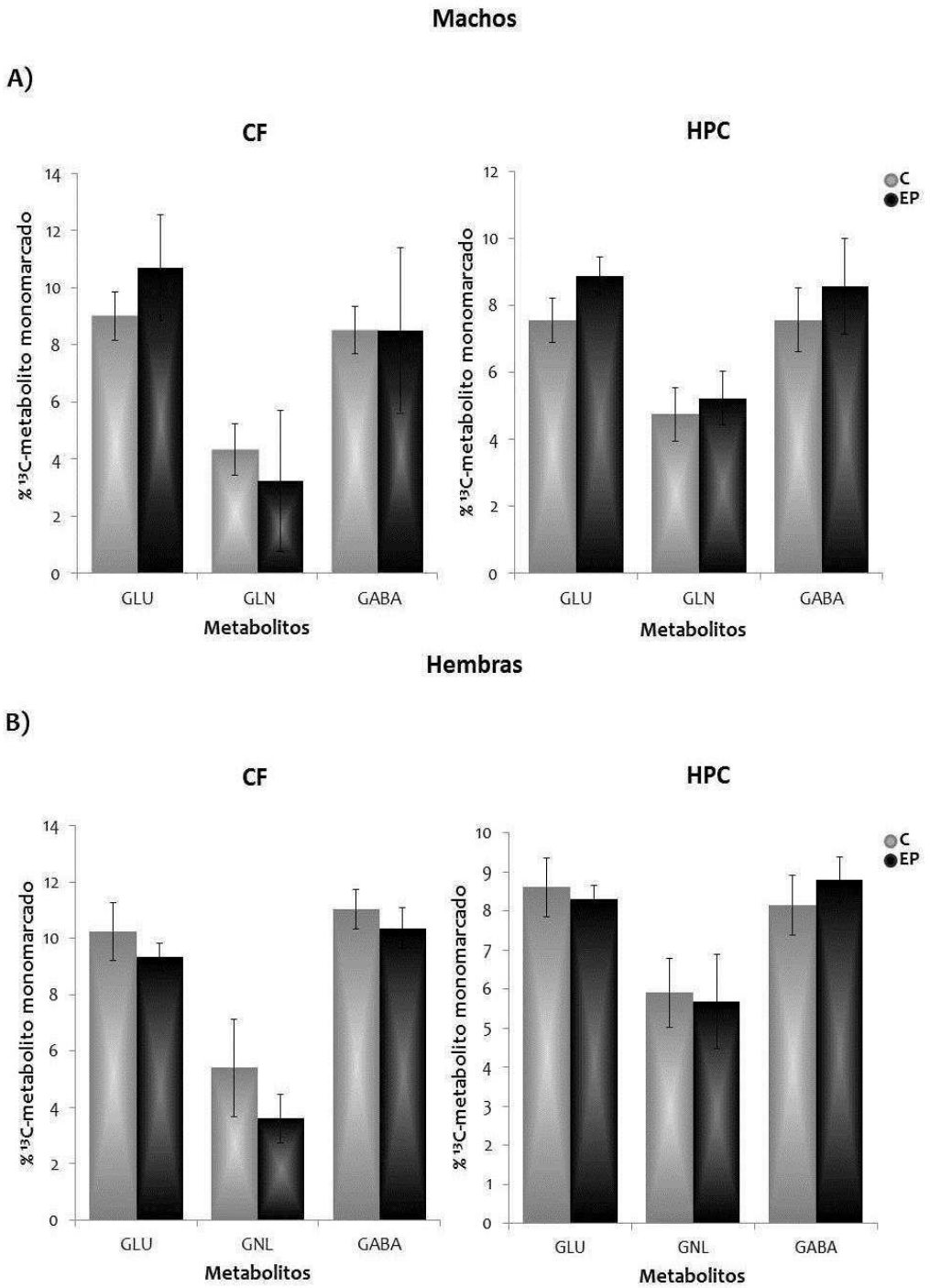


Figura 10. Niveles de glutamato (GLU), glutamina (GLN) y ácido γ-aminobutírico (GABA) medidos por espectrometría de masa en crías de 60 DPN. A) % de ^{13}C- aminoácidos obtenidos en CF e HPC de ratas machos. B) % de ^{13}C- aminoácidos en ratas hembras en las mismas áreas de interés. En todos los gráficos se expresa para cada tratamiento (C y EP) el valor medio ± EE del porcentaje (%) de aminoácido monomarcado en el total de marca de ^{13}C obtenida (n= 6).

2. Liberación evocada del neurotransmisor glutamato en las crías EP adultas

Para estudiar el efecto del estrés experimentado prenatalmente sobre la liberación del glutamato como neurotransmisor, se aplicó la técnica de superfusión de tejidos con un estímulo despolarizante de las neuronas. Se evaluó en el HPC y la CF de ratas C y EP adultas la liberación de ^{3}H-glutamato basal y estimulada mediante la aplicación de K^{+} 56 mM. Más allá de la tendencia de aumento observada en los valores de liberación de la CF de los machos EP (figura 11, A. t= -2,43; p= 0,06), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre C y EP para los casos estudiados (figura 11).

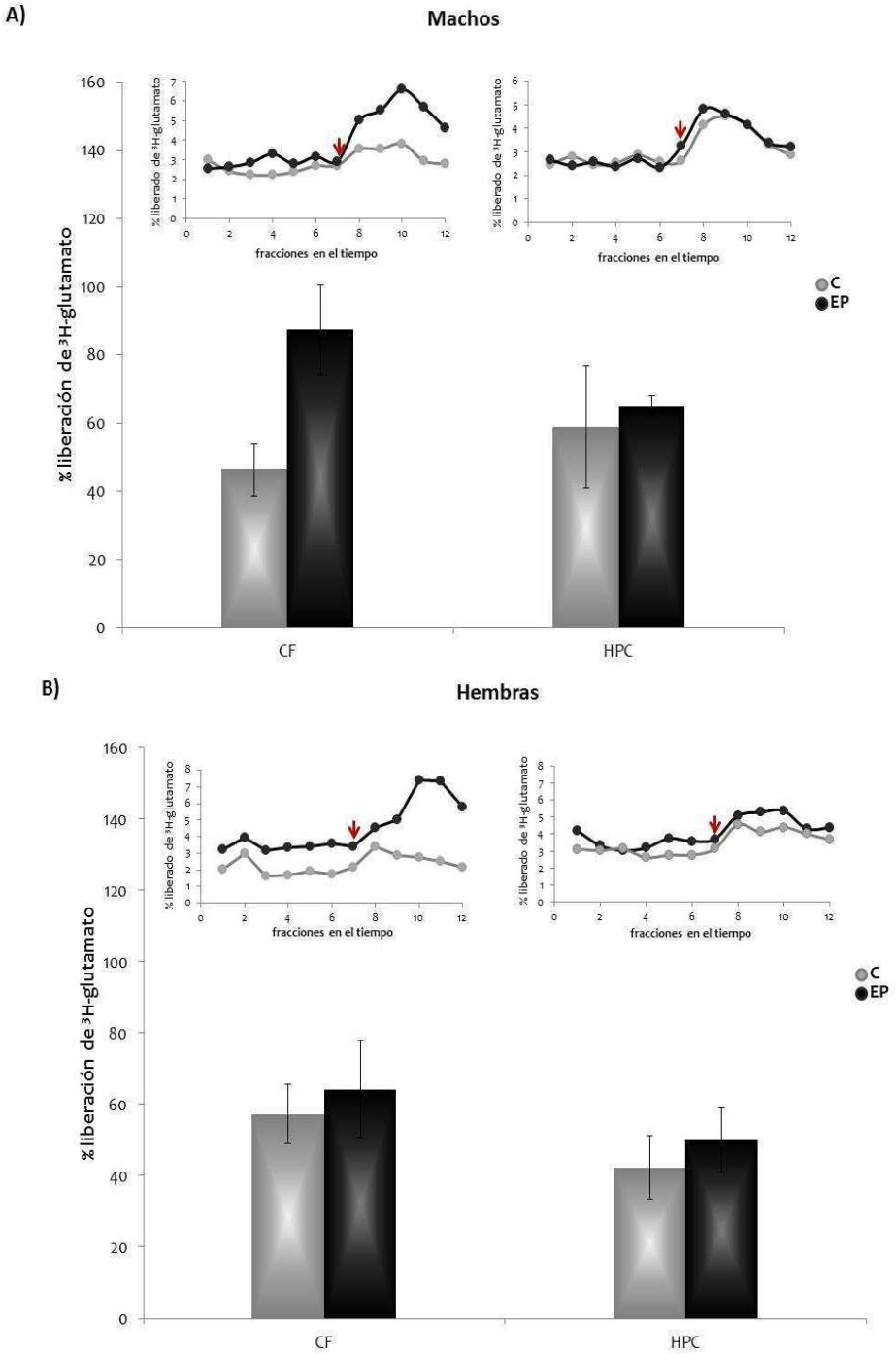
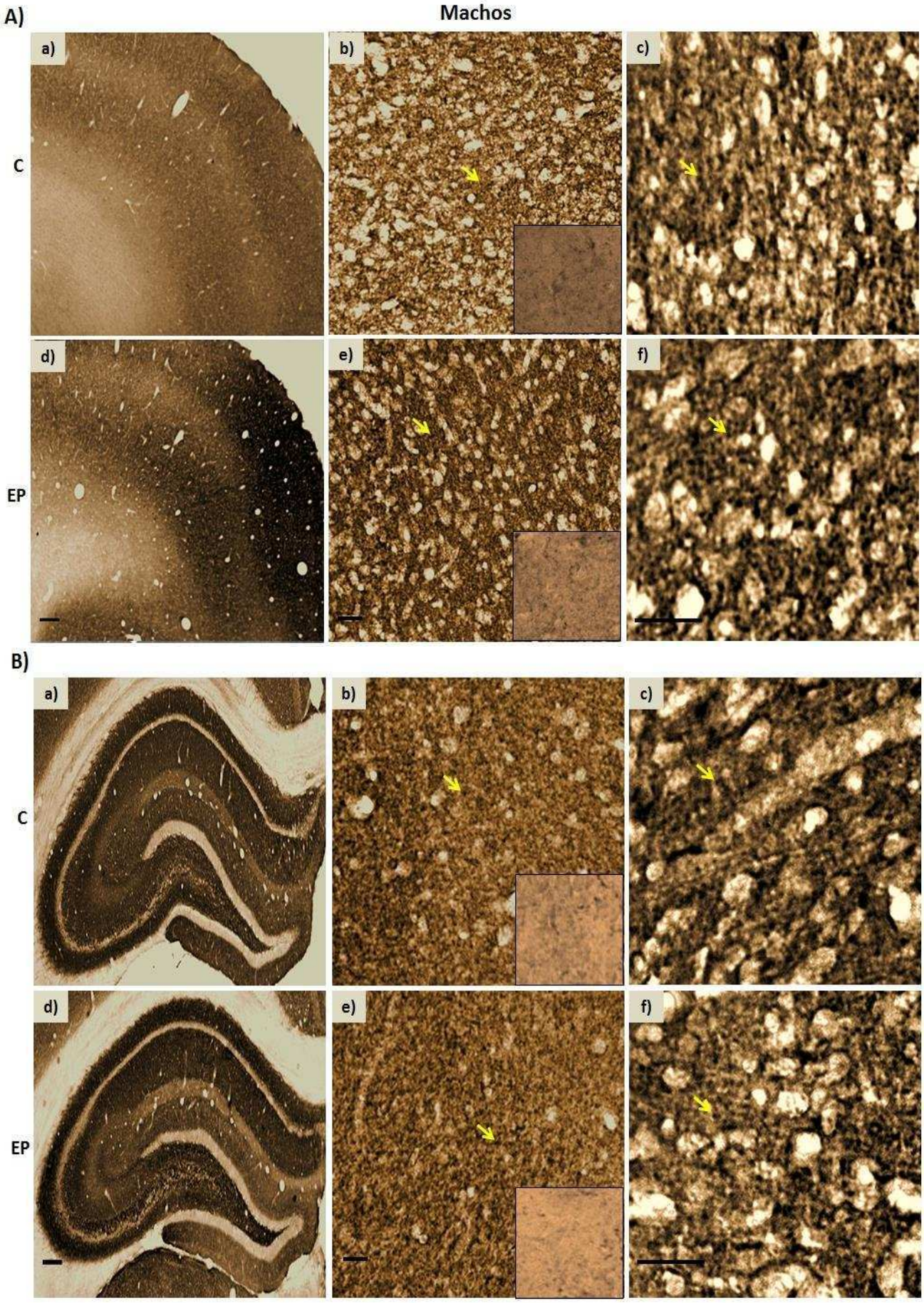


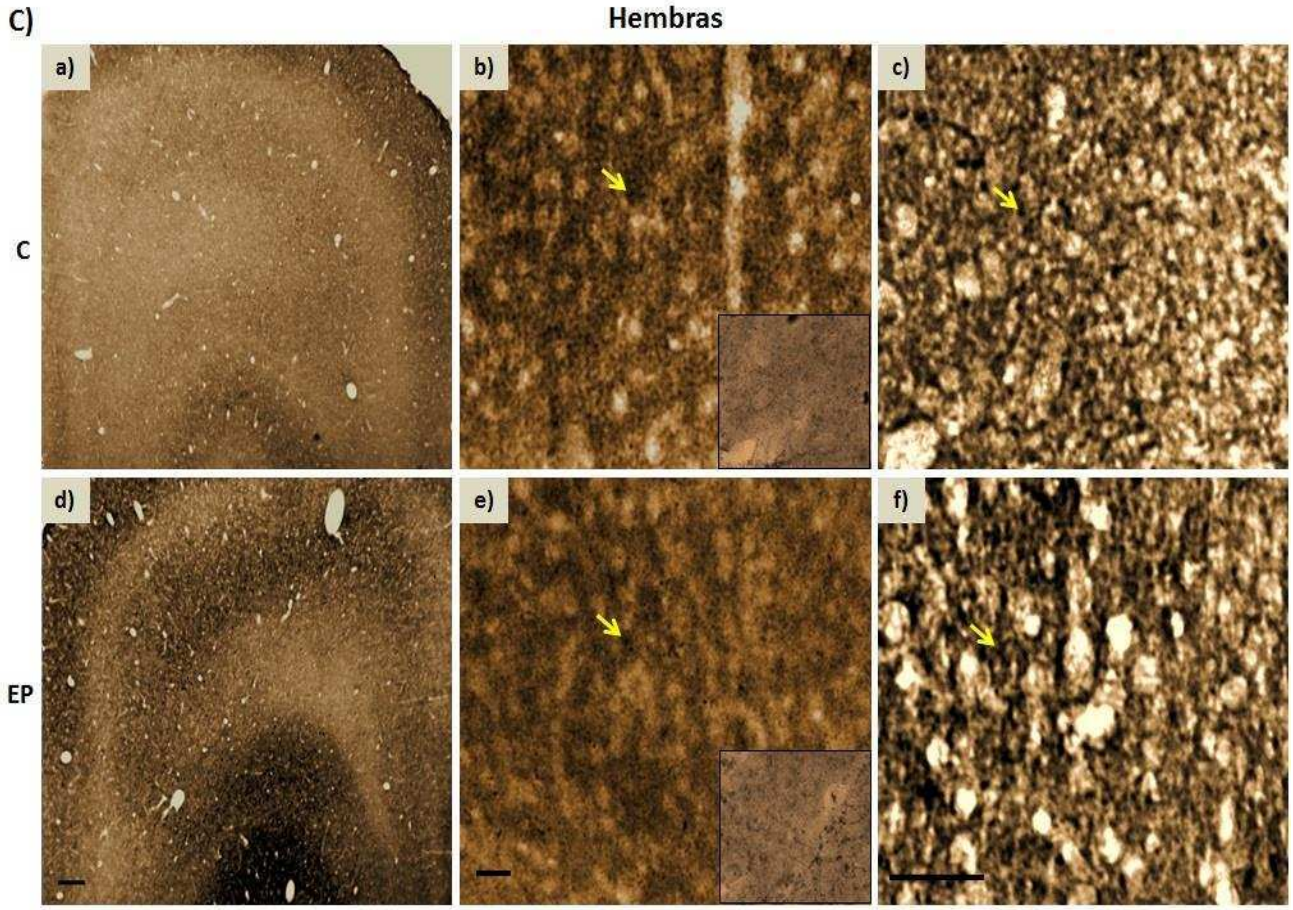
Figura 11. Cuantificación de la liberación de ^{3}H-glutamato en la CF y en el HPC de crías adultas. Se evaluó la liberación basal y estimulada con potasio 56 mM del glutamato marcado en las ratas C y EP, machos (A) y hembras (B). Los gráficos muestras los valores como la media de % de liberación ± EE (n= 4). El % de liberación se calculó como la relación entre el glutamato liberado por estimulación y el liberado en forma basal. Los recuadros insertos en los gráficos, reflejan para cada área de estudio los perfiles de liberación en el tiempo de las fracciones recolectadas durante la liberación basal y durante la superfusión con K^{+} 56 mM. La flecha roja indica el inicio de la estimulación.

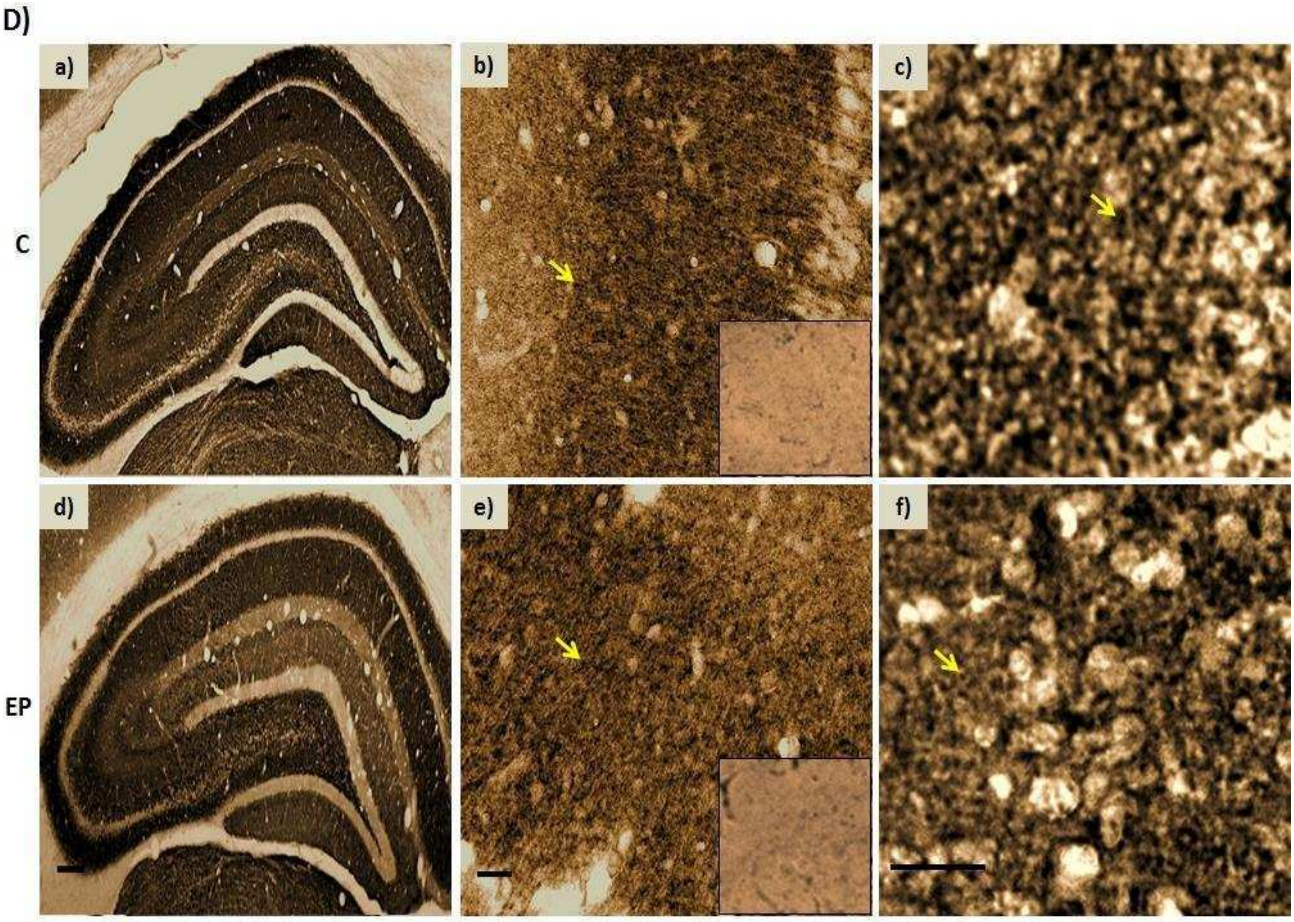
3. Efecto del estrés gestacional sobre el transportador vesicular, vGluT-1

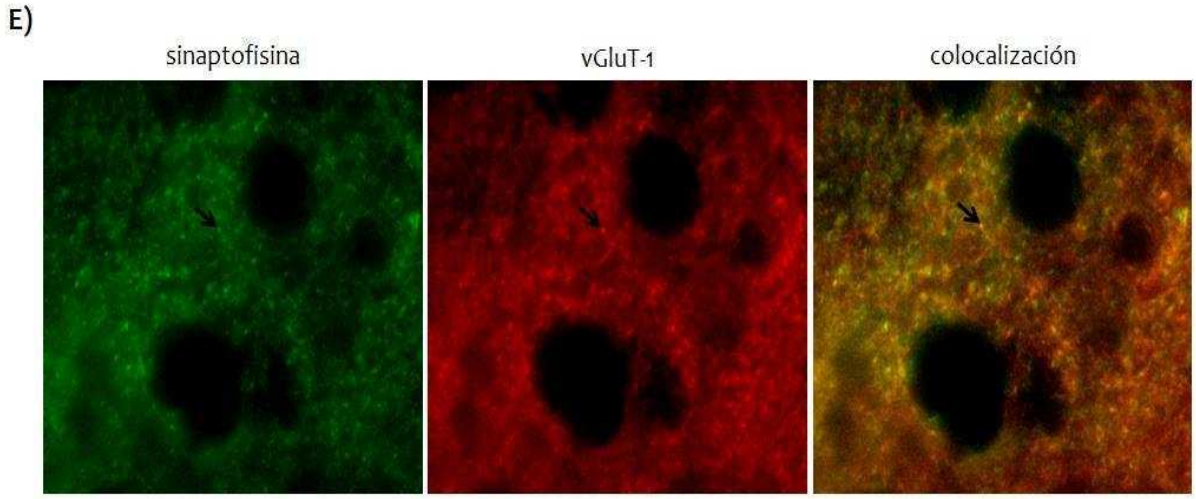
Con el fin de determinar la expresión del transportador vesicular del neurotransmisor glutamato en crías C y EP, medimos la presencia de vGluT-1 mediante la técnica de inmunohistoquímica en cortes de las áreas cerebrales CF y en las regiones que componen al HPC: CA1, CA2, CA3 y el GD. La cuantificación de la inmunomarcación revelo un aumento en los niveles del transportador en la CF de machos adultos EP (figura 12, A). La diferencia estadística ($F= 9,28$; $p= 0,02$) marca un aumento del 36,9% en las crías EP cuando se comparan con los individuos C (figura 12, F). Se puede observar que la marca de vGluT-1 en el área del HPC resulto homogénea para todas las regiones evaluadas (figura 12, F) y no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los machos EP y C (figura 12, B). Las crías hembras no mostraron diferencias en ninguna de las situaciones evaluadas (figura 12, C, D y F).

Debido a que la inmunomarcación con el anticuerpo anti vGluT-1 muestra un punteado homogéneo en toda el área de evaluación, se realizó un control de la marcación para confirmar que la señal detectada correspondía a la proteína vGluT-1. Con este fin se empleó un anticuerpo contra sinaptofisina y se observó la colocalización de la señal de ambos anticuerpos por inmunofluorescencia. En la figura 12 E, se muestra una imagen representativa de la CF de machos C donde se puede observar la superposición de las marcas de los dos anticuerpos empleados. La colocalización de las marcas de vGlut-1 y sinaptofisina se verifico, positivamente, en todos los casos de estudio (las imágenes no se muestran).


A)
Machos
a)
b)
c)
C
d)
e)
f)
EP
B)
a)
b)
c)
C
d)
e)
f)
EP


C)
Hembras
a)
b)
c)
C
d)
e)
f)
EP


D)
a)
b)
c)
C
d)
e)
f)
EP



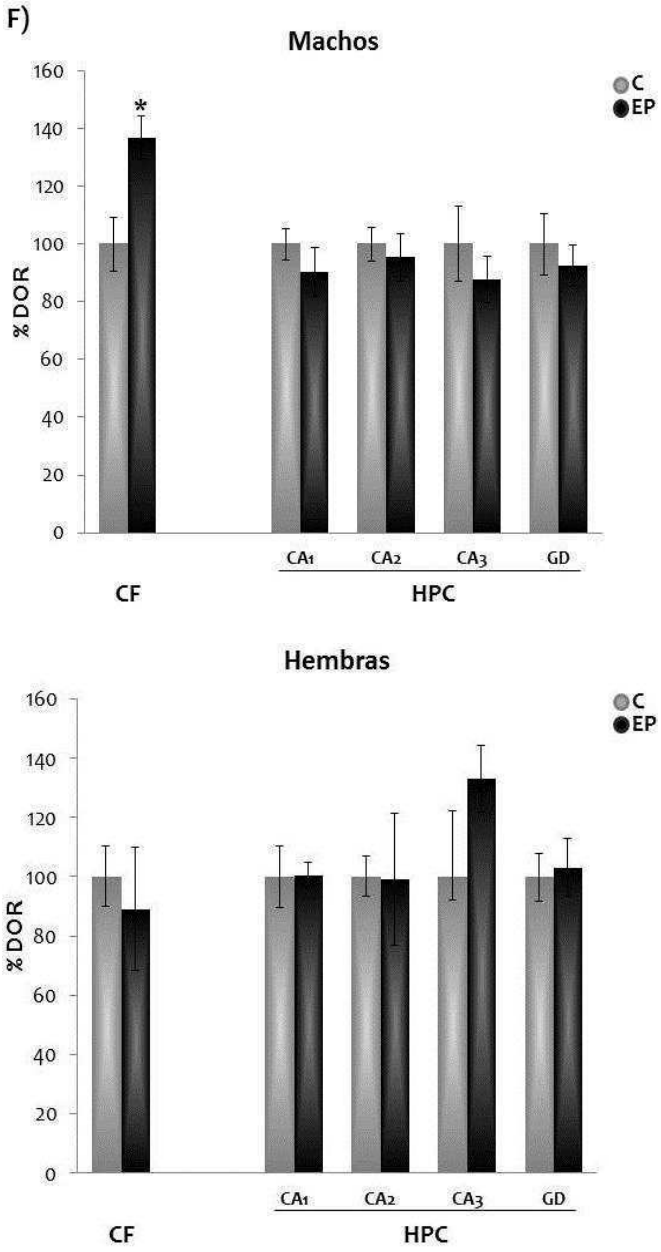
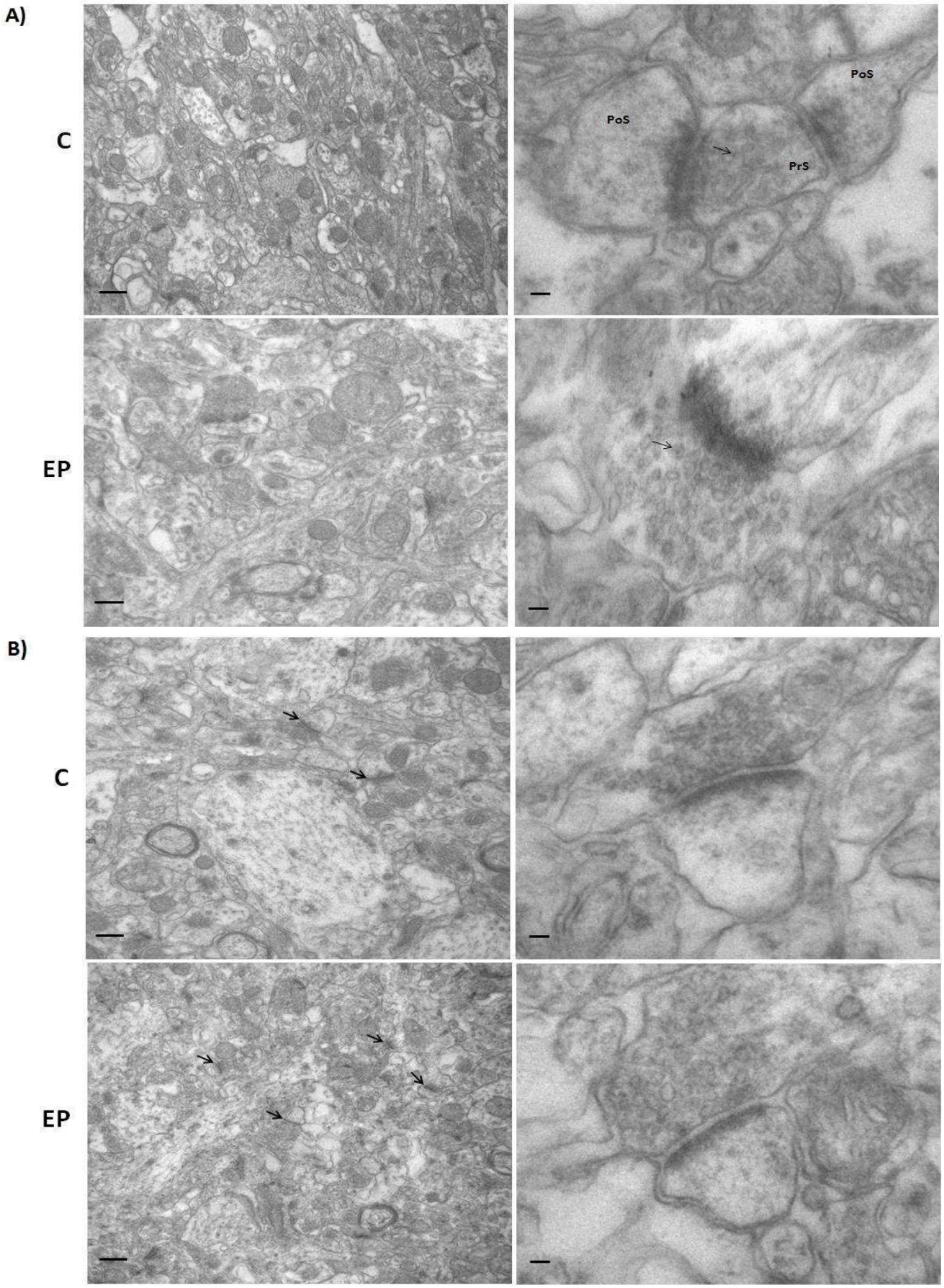


Figura 12. Evaluación del transportador vesicular vGluT-1 en ratas C y EP adultas por inmunohistoquímica. Las fotos muestran imágenes representativas de la inmunomarcación en A) CF de machos, B) HPC de machos, C) CF de hembras y D) HPC de hembras. En todas las imágenes a y d) se tomaron a un aumento de 4x, la barra de escala indica 200 µm; b y e) a un aumento de 20x, barra de escala 200 µm y por ultimo c y f) a un aumento de 40x, barra de escala 20 µm. Los recuadros internos muestran una imagen representativa del control negativo de la inmunomarcación (aumento 20x). E) muestra 3 imágenes representativas de inmunofluorescencia realizadas con sinaptofisina (verde), vGlut-1 (rojo) y la colocalización de ambas marcas. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 60x y las flechas señalan la marca de anticuerpo correspondiente en cada caso. F) Cuantificación de la marcación en la CF y en tres regiones del HPC: CA1, CA2, CA3 y GD, en ratas machos y hembras. Los valores fueron expresados como la media ± EE de la densidad óptica relativa (DOR) y se graficaron cómo % del valor de C. * indica una diferencia estadística significativa con $p < 0,05$ contra el valor de C.

3.1. Morfología de la sinapsis glutamatérgica

Con el objetivo de evaluar la morfología de la sinapsis glutamatérgica en más detalle, utilizamos el anticuerpo anti vGlut-1 como marcador para detectar sinapsis glutamatérgicas mediante microscopia electrónica de transmisión. La observación de los cortes en el microscopio electrónico mostró la estructura clásica de las mitocondrias y de las vesículas sinápticas. En estas últimas, se pudo detectar una tenue marca del anticuerpo indicando la presencia de neuronas de tipo glutamatérgicas (figura 13, b). En las imágenes se analizó el número de sinapsis, el largo de la sinapsis y la densidad postsináptica (para definiciones ver materiales y métodos) como parámetros para caracterizar el estado de los contactos sinápticos. Las ratas macho EP mostraron una tendencia de aumento en el número de sinapsis hipocampales del 50% ($t= -2,75$; $p= 0,07$; figura 13, B). El análisis de las imágenes no revelo ninguna diferencia entre los individuos C y EP en la CF de los machos, ni en ninguno de los parámetros analizados en las ratas hembras (figura 13, C y D).

Machos



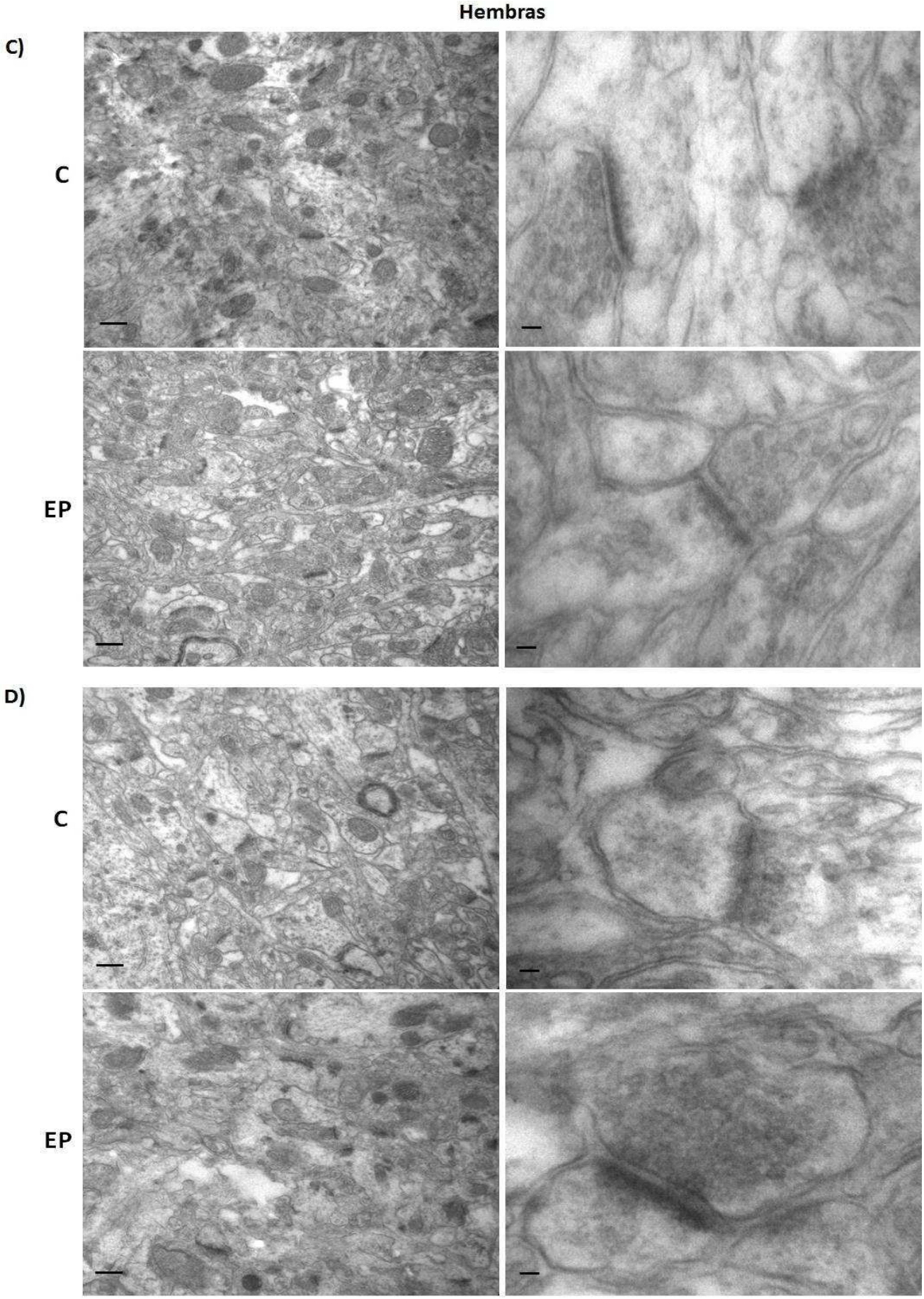


Figura 13. Evaluación de sinapsis glutamatérgicas por inmunohistoquímica y

microscopia electrónica de transmisión en ratas EP y C. A) Imágenes representativas de la CF y B) del HPC de machos adultos. C) Imágenes representativas de la CF y D) del HPC de hembras adultas. Las flechas delgadas, en A, señalan la marca del anticuerpo sobre las vesículas sinápticas; las flechas gruesas, en B, indican los contactos sinápticos. PoS: postsinapsis, PrS: presinapsis. Las imágenes de la columna izquierda fueron tomadas con un aumento de 20000 x, barra de escala 0,5 µm, mientras que las imágenes de la columna derecha, tienen una resolución de 85000 x, barra de escala 100 nm.

4. Los receptores NMDA y AMPA en las crías EP adultas

Se evaluaron los niveles de los receptores NMDA y AMPA en la CF y el HPC de ratas C y EP mediante la técnica de Western blot, empleando anticuerpos específicos para las subunidades NR1 de NMDA y GluR4 de AMPA. La cuantificación de la inmunomarcación no mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (figura 14). Sin embargo, se puede observar una tendencia de aumento en los niveles de la subunidad NR1 en la CF de las ratas EP con una variación del 40 % para los machos (t: -2,52; p: 0,07) y del 70% en hembras (t: -2,35; p: 0,06).

Con el objetivo de evaluar la expresión a nivel génico de las subunidades NR1 y GluR4 se empleó la técnica de qRT-PCR para cuantificar el ARNm de estas dos proteínas en la CF e HPC de machos y hembras, EP y C. En la figura 15, A) se puede observar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, en ninguno de las áreas evaluadas para los machos. En el caso de las hembras (figura 15, B) se detectó un aumento significativo del 150 % en la subunidad NR1 en la CF de las ratas EP (t: -4,71; p: 0,002) pero no se detectaron diferencias estadísticas en el HPC o para la subunidad GluR4 en ninguna de las áreas evaluadas en estos individuos.

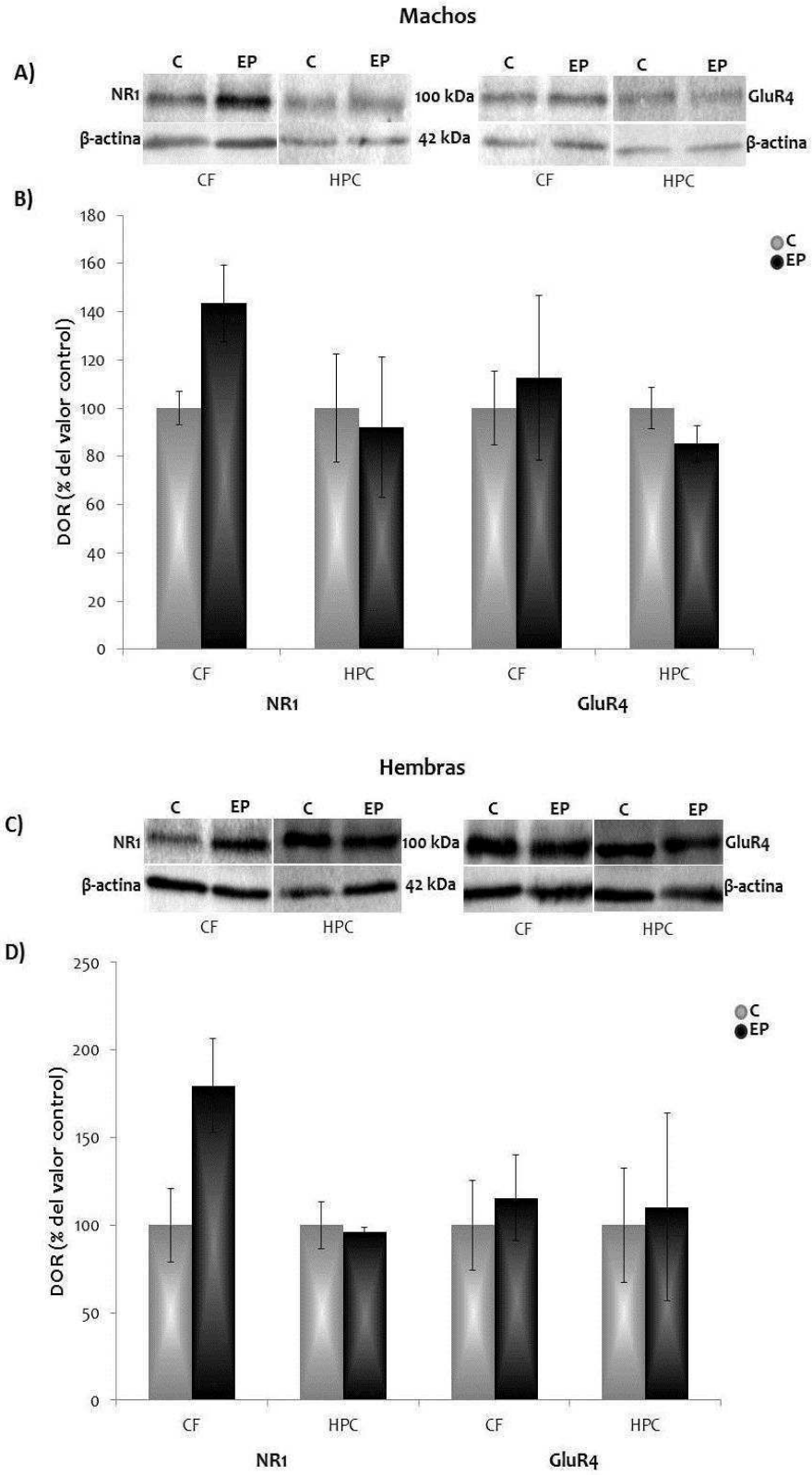


Figura 14. Determinación de los niveles de los receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA por Western blot en ratas adultas. La detección se realizó utilizando un anticuerpo contra la subunidad NR1 para detectar NMDA y otro contra la subunidad GluR4 para AMPA. A) y C) imágenes representativas de la inmunomarcación de las subunidades. B) y D) cuantificación de la marca en la CF e HPC en machos y hembras, respectivamente. En los gráficos se expresa el valor medio ± EE de la densidad óptica relativa (DOR) expresada en función del valor control para facilitar su visualización.

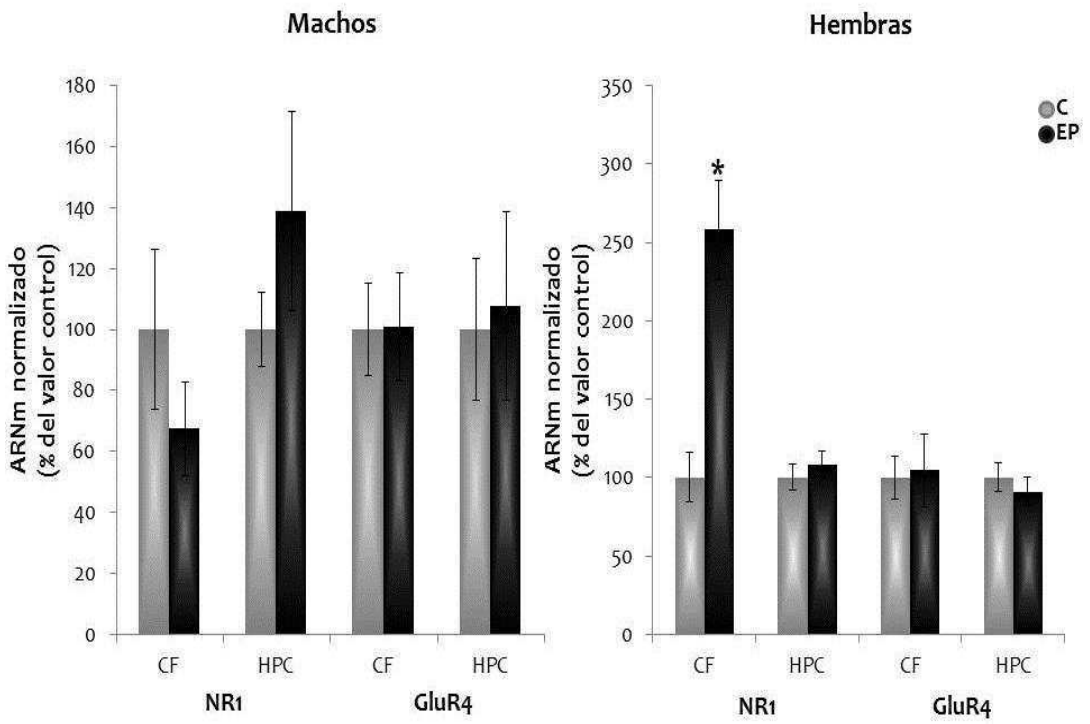


Figura 15. Medición de la expresión de ARN mensajero de las subunidades NR1 y GluR4 de los receptores glutamatérgicos. Los gráficos muestran la cuantificación realizada en la CF e HPC de ratas machos y hembras. Los valores se expresan como la media ± EE de ARNm normalizado por el valor del gen constitutivo y relativizado a los valores del control para facilitar la visualización. * indica una diferencia estadísticamente significativa entre C y EP con $p < 0,05$.

5. Los transportadores glutamatérgicos gliales y la enzima glutamina sintetasa en el modelo EP

5.1. Niveles de la enzima glutamina sintetasa

Se cuantificaron los niveles de la enzima GS mediante la técnica de Western blot en machos y hembras de 28 y 60 días de edad, de los dos grupos experimentales. En la figura 16, se puede observar que los niveles de la enzima de los individuos C y EP no muestran diferencias estadísticamente significativas.

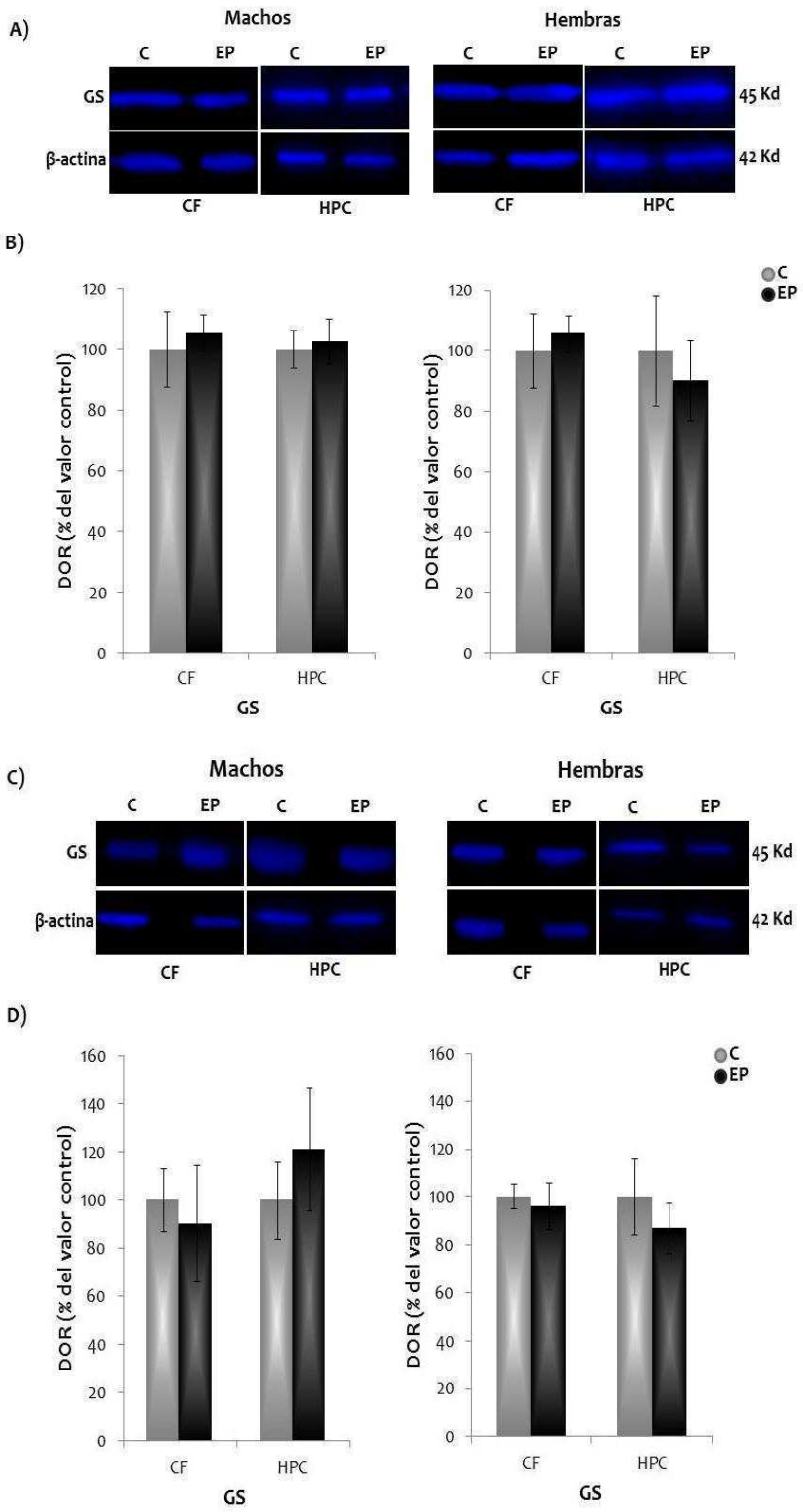


Figura 16. Evaluación de los niveles de la enzima glutamina sintetasa (GS) en ratas macho y hembra por Western blot. A) Imagen representativa de las bandas inmunopositivas para GS en individuos de 28 días de edad, B) Cuantificación de las bandas de GS para cada grupo valuado al DPN 28. C) Imagen representativa de la marca de GS obtenida con muestras de ratas de 60 días de edad, D) Cuantificación en hembras y machos adultos de las bandas de GS al DPN 60. Los gráficos se realizaron con el valor medio ± EE de la densidad óptica relativa (DOR) obtenida para cada banda. Este valor se expresa como porcentaje del valor del grupo control para facilitar su visualización. CF, corteza frontal; HPC, hipocampo; C, control; EP, estrés prenatal.

5.2. Efecto del EP sobre GLT1 y GLAST

Los dos transportadores gliales fueron evaluados por Western blot con el objetivo de medir su expresión en la CF y el HPC de ratas C y EP. En la figura 17, se muestran la inmunomarcación y la cuantificación de la expresión de las proteínas para GLT1 y GLAST, en ratas de 28 días de edad. A esta edad no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos para ninguno de los casos en estudio. Cuando se midió la expresión de las proteínas en individuos de 60 DPN (figura 18) se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos C y EP. Los machos EP adultos muestran un aumento del 30% en la expresión de GLT1 en el HPC (figura. 18, A y B. t: -3,56; p: 0,04) cuando se los compara con C, pero no muestran diferencias en los niveles de la misma proteína en la corteza frontal. En el caso de GLAST no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los casos pero se puede observar una tendencia de aumento del 46% (figura. 18, B. t: -2,22; p: 0,08) en el hipocampo de los machos estresados durante la gestación. Las hembras no muestran variación entre C y EP en ninguna de las proteínas, áreas cerebrales o edades estudiadas (figura 18. C y D).

Los transportadores GLT1 y GLAST también fueron evaluados por qRT-PCR en muestras de las ratas C y EP de 60 DPN. Como se puede observar en la figura 19, los niveles de ARNm expresan un aumento del 90% para el transportador GLT1 en el hipocampo de ratas macho EP (t: -3,2, p= 0,002). Cabe destacar que el incremento registrado en la expresión génica de GLT1 coincide con el incremento registrado en los niveles de su proteína. En la misma figura podemos observar que los machos no muestran diferencias estadísticamente significativas para el transportador GLAST entre C y EP. Las mediciones en las hembras no muestran diferencias entre tratamientos en ninguno de las situaciones evaluadas (figura 19).

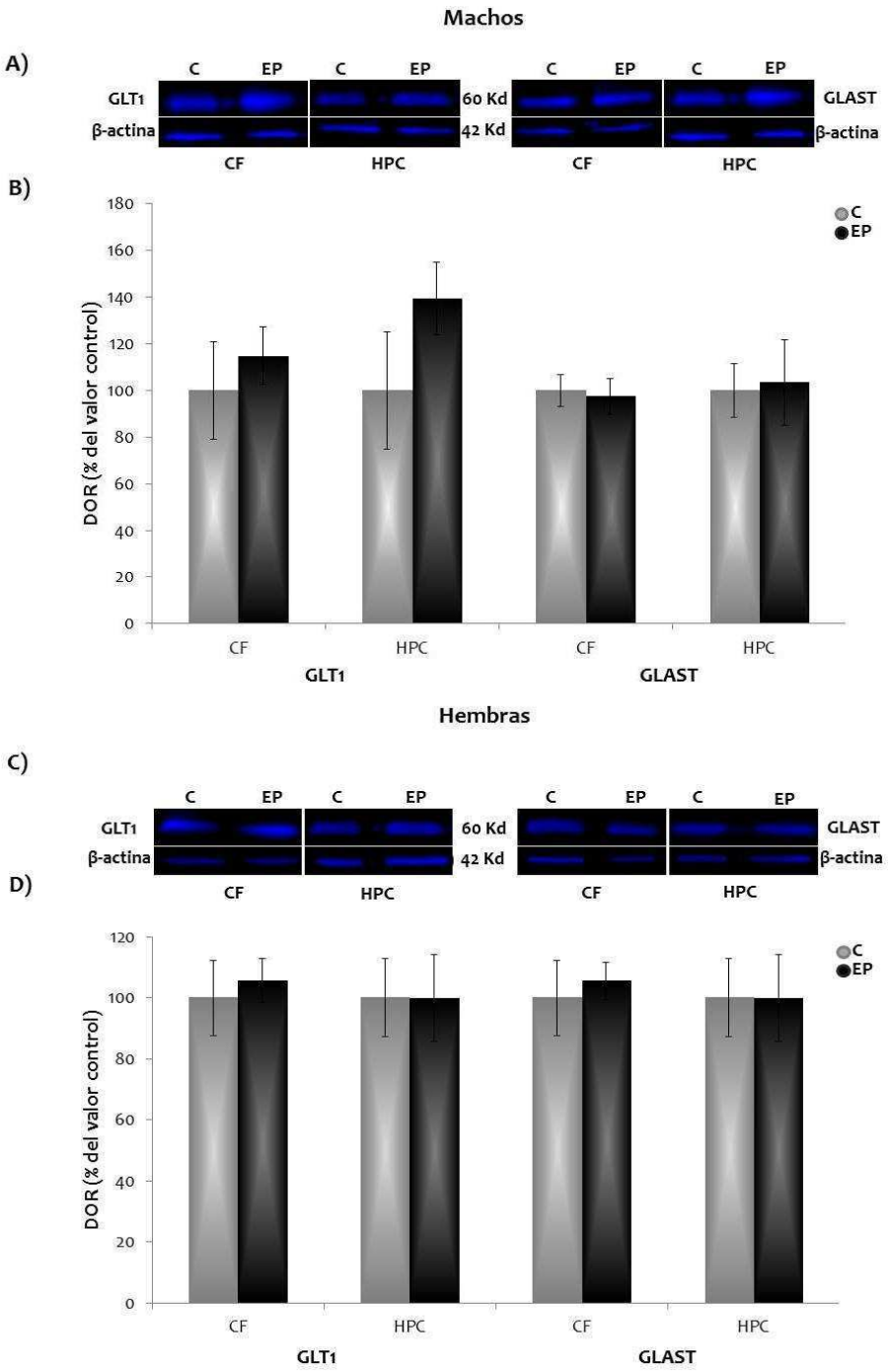


Figura 17. Evaluación de los transportadores glutamatérgicos GLT1 y GLAST en ratas de 28 días de edad por Westren blot. A y C) imágenes representativas de las bandas inmunomarcadas para cada transportador en machos y hembras, respectivamente. B y D) cuantificación de las bandas obtenidas para cada transportador en machos y hembras, respectivamente. En cada grafico se expresa el valor medio de densidad óptica relativa (DOR) ± EE. DOR se expresa como porcentaje del valor control para facilitar su visualización.

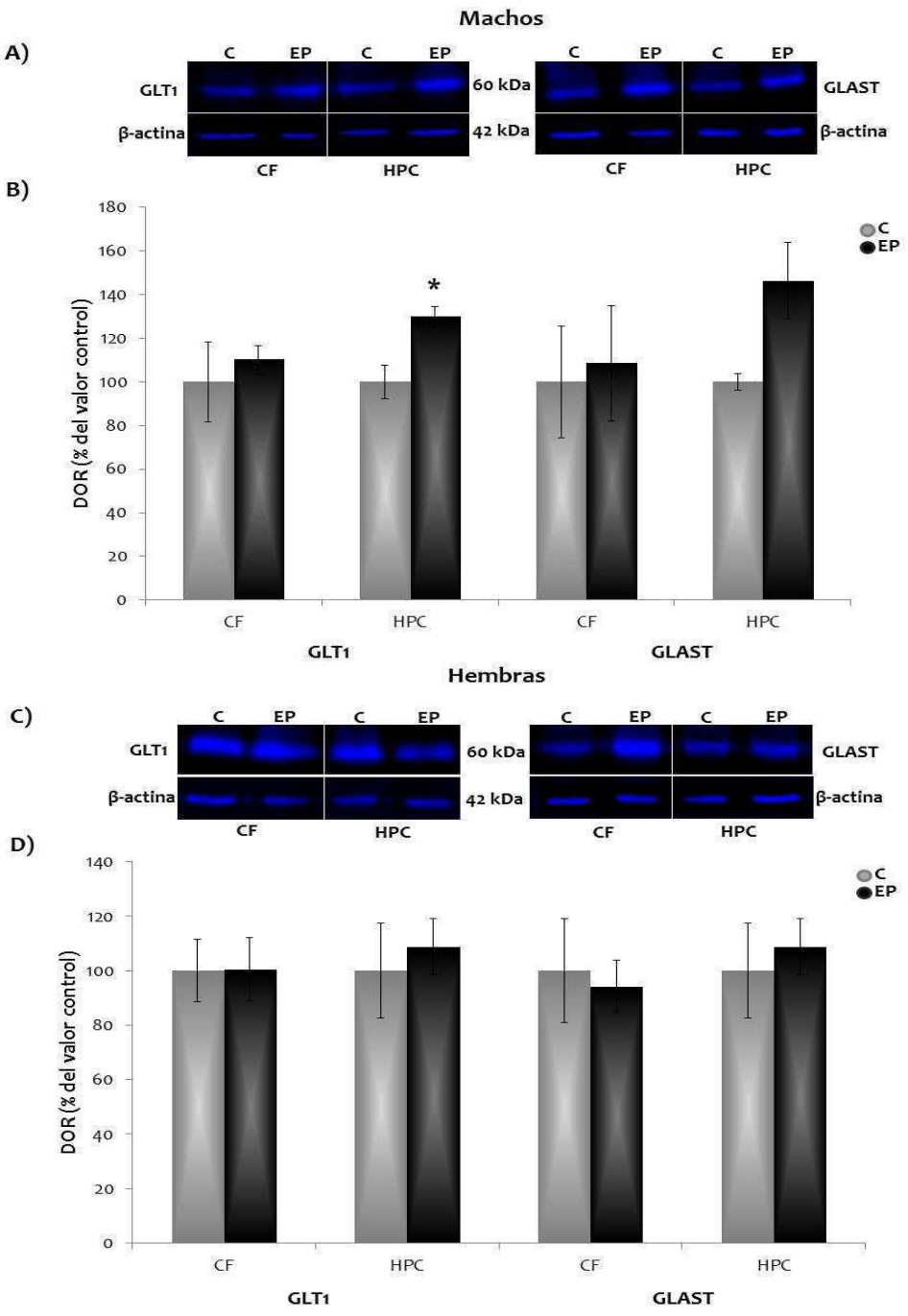


Figura 18. Cuantificación de los niveles de GLT1 y GLAST por Western blot en ratas adultas. A y C) imágenes representativas de bandas inmunomarcadas de cada transportador en machos y hembras, respectivamente. B) cuantificación de las bandas obtenidas en CF e HPC de ratas machos, D) cuantificación de las bandas obtenidas en las mismas áreas cerebrales de ratas hembras. En cada grafico se expresa el valor medio de la densidad óptica relativa (DOR) ± EE y se expresa como porcentaje del valor control para facilitar su visualización. * indica una diferencia estadísticamente significativa entre C y EP con $p < 0,05$.

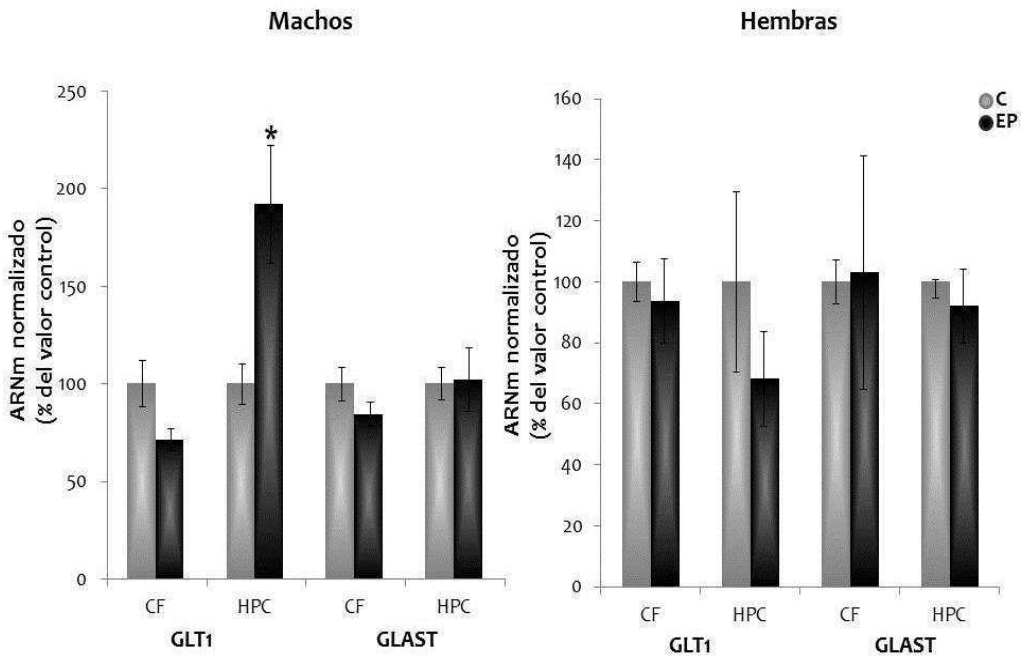
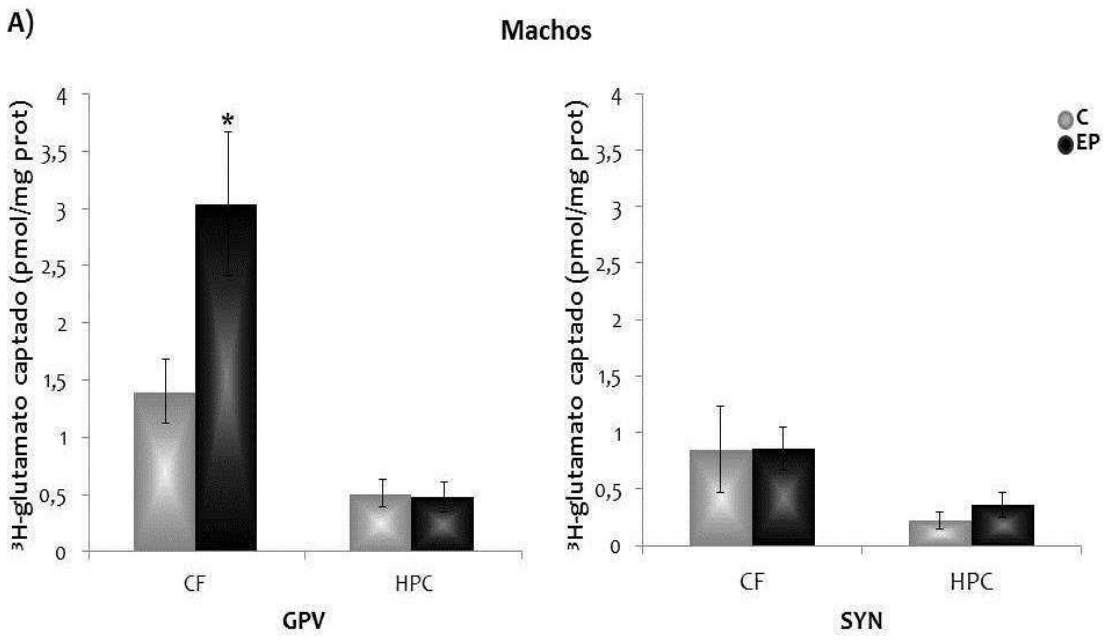


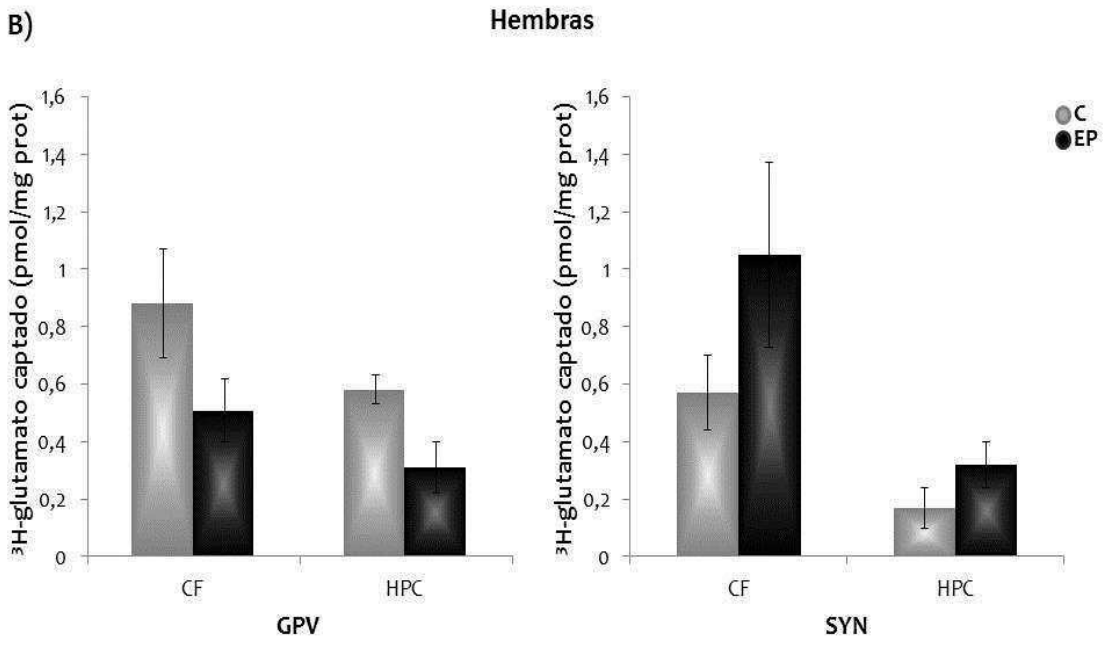
Figura 19. Evaluación de la expresión de ARN mensajero (ARNm) para los transportadores GLT1 y GLAST en ratas adultas. Se midieron mediante RT-qPCR los niveles de expresión génica en la CF y en el HPC de machos (izquierda) y hembras (derecha) de ambos tratamientos (C y EP). Los gráficos muestran los valores medios ± EE de ARNm normalizado por el valor del gen constitutivo y relativizado a los valores del control para facilitar la visualización. * indica una diferencia estadísticamente significativa entre C y EP con $p < 0,05$.

6. Efecto del EP sobre la función de los transportadores glutamatérgicos en las crías adultas

Con el fin de estudiar la función de los transportadores de glutamato, cuantificamos los niveles de captación de glutamato tritiado (^{3}H- glutamato) en dos fracciones, la glial (GPV) y la fracción de sinaptosomas neuronales (SYN), ambas extraídas de la CF y del HPC de ratas adultas. La figura 20 muestra la cantidad de ^{3}H-glutamato capturado en cada fracción estudiada en machos y hembras de cada tratamiento (C y EP). Se puede observar un incremento del 100% (t: -2,39; p: 0,04) en la cantidad de glutamato capturado en la fracción GPV de CF de machos EP (figura 20, A), mientras que no se registraron variaciones entre C y EP, en los niveles en los sinaptosomas de CF ni en ninguna de las fracciones en el HPC. Las hembras, por su parte, no muestran diferencias estadísticamente significativas en ningún caso evaluado. Cabe destacar que la fracción GPV del HPC de las hembras EP, muestra una tendencia a la disminución en la captación del amino ácido tritiado con una caída del 50% de la cantidad capturada cuando se la compara con el valor control (figura 20, t: 2,66; p: 0,06).

Con el objetivo de determinar cuáles de los transportadores de glutamato estaban involucrados en la captación de Glu en las fracciones evaluadas se realizó un ensayo de captación en presencia de dos inhibidores específicos de los transportadores glutamatérgicos. TBOA, un potente inhibidor de los EAATs y DHK, un inhibidor selectivo de GLT1. Los resultados indican, que la acción de TBOA produjo una inhibición de, aproximadamente, 80% de la captación, tanto en los macho como en las hembras. Así se corroboró que la captación medida fue resultado de la acción de los transportadores glutamatérgicos. Por su parte, DHK inhibió el 70% de la captación de ^{3}H- glutamato tanto en GPV como en SYN lo que estaría poniendo en evidencia la presencia de GLT1 en los sinaptosomas, reflejando una posible contaminación de glía en la fracción sinaptosomal. El agregado de los inhibidores produjo diferencias estadísticamente significativas en comparación a la medición sin inhibidor, para todos los casos de estudio (figura 20 C, machos: control GPV CF: $F(2,6)= 25,6$ $p= 0,001$; HPC: $F(2,8)= 10,02$ $p= 0,007$; SYN CF: $F(2,6)= 1,09$ $p= 0,36$; HPC: $F(2,9)= 3,7$ $p= 0,05$; estrés prenatal GPV CF: $F(2,3)= 37,5$ $p= 0,008$; HPC: $F(2,10)= 7,9$ $p= 0,02$; SYN CF: $F(2,9)= 50,92$ $p= 0,002$, HPC: $F(2,9)= 7,96$ $p= 0,06$; hembras: control GVP CF: $F(2,5)= 13,7$ $p= 0,001$; HPC: $F(2,6)= 43,9$; SYN CF: $F(2,3)= 39,9$ $p= 0,007$; HPC: $F(2,6)= 3,32$ $p= 0,17$; estrés prenatal GVP CF: $F(2,3)= 24,6$ $p= 0,01$; HPC: $F(2,6)= 7,4$ $p= 0,05$; SYN CF: $F(2,6)= 39,85$ $p= 0,03$; HPC: $F(2,9)= 12,1$ $p= 0,003$).


A)
Machos
³H-glutamato captado (pmol/mg prot)
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*
CF
HPC
GPV
SYN
C
EP


B)
Hembras
³H-glutamato captado (pmol/mg prot)
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
CF
HPC
GPV
SYN
C
EP

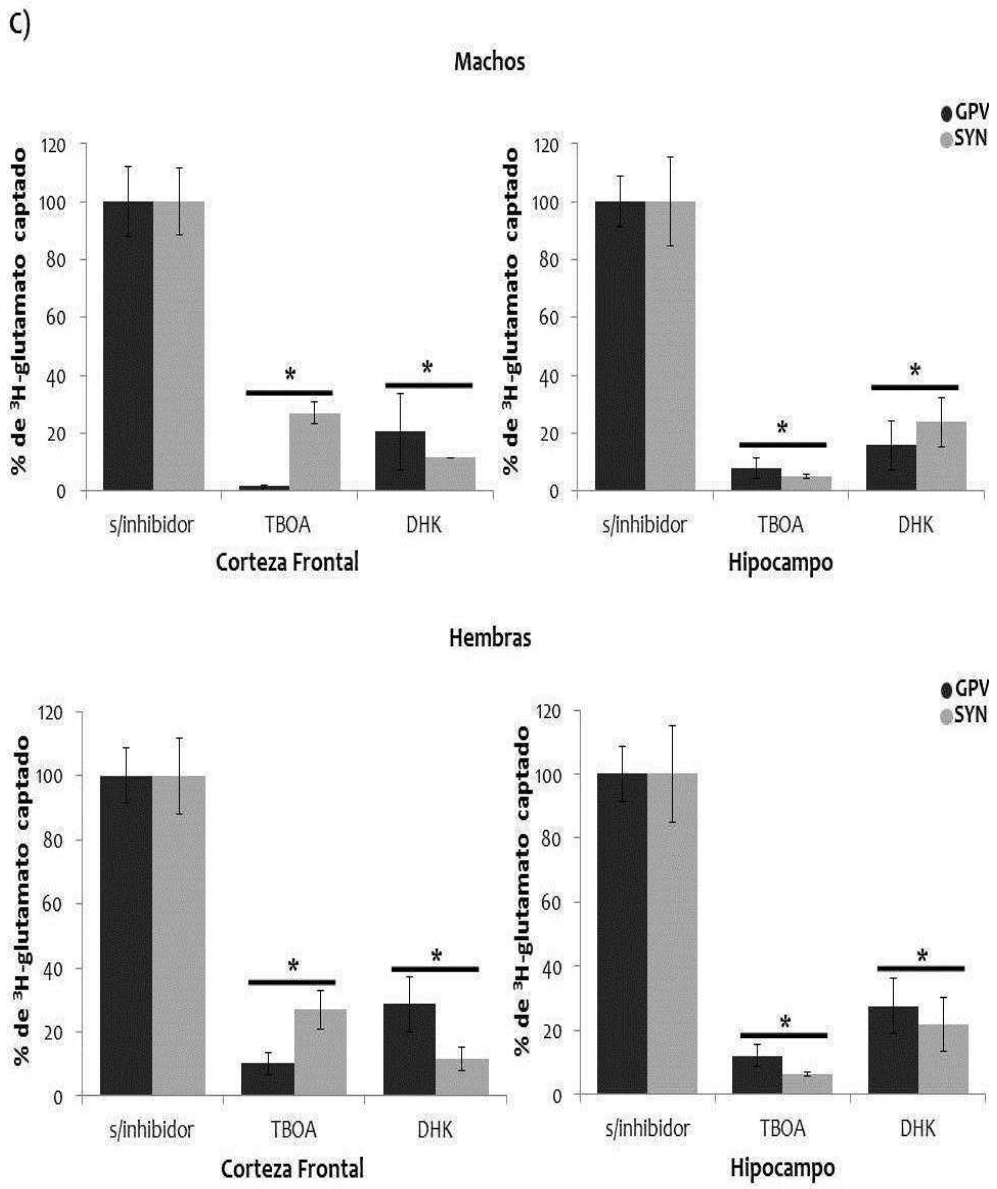


Figura 20. Cuantificación de la captación de glutamato tritiado (^{3}H- glutamato) en dos fracciones diferenciales (gliosomas, GPV y sinaptosomas, SYN) de la corteza frontal (CF) y del hipocampo (HPC) en ratas adultas. A) niveles capturados en el tejido de machos C y EP, B) niveles capturados en el tejido de hembra C y EP. Los valores se muestran como la media ± EE de pmoles de ^{3}H- glutamato por mg de proteína. El * indica una diferencia estadística significativa entre C y EP para la fracción y área del cerebro indicadas, con $p < 0,05$. C) Cuantificación de la captación de glutamato en GPV y SYN con el agregado de dos inhibidores específicos del transporte de glutamato, TBOA inhibidor de EAATs y DHK inhibidor de GLT1. Solo se muestran los porcentajes de captación en ratas machos y hembras adultas del grupo C. Los valores en el histograma se expresan como la media ± EE y se graficaron cómo % del valor medido sin inhibidor (s/inhibidor) para facilitar su visualización. * indica una diferencia estadísticamente significativa entre TBOA o DHK vs su valor de referencia, s/inhibidor- y la barra negra indica que la diferencia es válida para ambas fracciones. $p < 0,0$

DISCUSIÓN

Numerosos estudios coinciden en señalar que la exposición repetida a situaciones estresantes durante la gestación genera alteraciones en el desarrollo neurobiológico de la cría. En este trabajo de tesis, demostramos que un estímulo prenatal, como la inmovilización de la rata preñada durante la última semana de gestación, genera en las crías cambios en el funcionamiento del sistema glutamatérgico. Nuestros principales resultados muestran que el insulto sufrido durante el desarrollo genera un nivel aumentado de la proteína y ARN mensajero del transportador GLT1 en el hipocampo de las crías macho adultas y simultáneamente promueve un aumento en la captación del neurotransmisor glutamato junto con un elevado nivel del transportador vesicular vGluT-1, en la corteza frontal.

La liberación, acción e internalización del aminoácido glutamato ocurren principalmente entre tres elementos celulares: la neurona presináptica, la neurona postsináptica y el astrocito, formando así lo que se denomina una sinapsis tripartita (Parpura y col., 2012). En la neurona presináptica el transportador vesicular vGluT almacena glutamato en las vesículas sinápticas generando así la reserva de moléculas de aminoácido que actuarán como neurotransmisor. Una vez liberado al espacio sináptico, el glutamato puede activar a los receptores postsinápticos e iniciar así la transmisión de la señal nerviosa o puede unirse a elementos presinápticos, como los auto-receptores mGlu3 (Tsapakis y Travis, 2002). La unión a los transportadores postsinápticos como EAAC1 y EAAT3 (Nieoullon y col., 2006) y a los transportadores gliales como GLT1 y GLAST promueve el fin de la transmisión sináptica y para el caso particular del Glu, impide los efectos citotóxicos característicos de este aminoácido (Anderson y Swanson, 2000). Posteriormente, el Glu capturado por los astrocitos es transformado en Gln para luego volver a la neurona presináptica donde es transformada nuevamente en glutamato, donde puede ser destinado a formar proteínas o a ser reciclado mediante la incorporación a las vesículas sinápticas, para formar la reserva del neurotransmisor.

1. Estudio del metabolismo glutamatérgico en el modelo de estrés prenatal

La relación metabólica entre las neuronas y las células de la glía, esta mediada por la transformación de Glu en Gln, lo cual es esencial para la neurotransmisión glutamatérgica (Gruetter y col., 2001). La mayor cantidad de Glu está presente en las

neuronas, mientras que la mayor parte de la Gln es sintetizada en los astrocitos. La glucosa es metabolizada, a través de la glucólisis y del ciclo del TCA (o ciclo de Krebs), fundamentalmente en las neuronas y en menor cantidad también se metaboliza en las células gliales (Schousboe y col., 2013). La incorporación externa de ^{13}C-glucosa permite realizar estudios metabólicos debido a que mediante su ingreso al sistema se formaran compuestos derivados con la marca de ^{13}C incorporada, generando una variada cantidad de isotopómeros dentro de la células (Qu y col., 2000). En concordancia con estas características, el experimento realizado en este estudio mostró un mayor porcentaje de ^{13}C-glutamato que de ^{13}C-glutamina, reflejando mayoritariamente el aporte del metabolito por parte de las neuronas. En este estudio evaluamos los compuestos derivados del primer giro del ciclo del TCA, los cuales solo presentan un átomo de ^{13}C en la molécula final del metabolito. Los resultados no mostraron un cambio significativo en la incorporación de ^{13}C en los metabolitos entre las ratas C y EP, sugiriendo que el estrés prenatal no afectaría la síntesis del aminoácido Glu ni tampoco la de otros metabolitos asociados, como la de GABA o la de Gln. Esto indicaría que el estímulo estresante aplicado durante la gestación no modifica la homeostasis glutamatérgica, ni la actividad del ciclo glutamina-glutamato entre las neuronas y los astrocitos.

En condiciones de baja actividad nerviosa, la síntesis y degradación del glutamato permanece en equilibrio mientras que durante la actividad excitatoria la cantidad de este aminoácido aumenta cambiando la tasa de equilibrio, de forma tal que la síntesis se vuelve mayor que la degradación (Hertz y col., 2007). En este estudio, los sujetos de experimentación en los que se midió la actividad metabólica no fueron estimulados para promover una actividad mayor del sistema, sino que estaban en reposo con un consumo basal de glucosa. En esta situación no se detectaron diferencias en la incorporación y metabolización de la glucosa, pero no se puede descartar que ante una necesidad extrema de energía y mayor actividad del metabolismo, los individuos EP muestren un cambio en el ciclo de metabolización y síntesis de glutamato que promueva la acumulación o disminución del mismo. En otros modelos animales, como los modelos de depresión generada por estrés social, se ha registrado una reducción en el metabolismo del Glu y otros metabolitos en los sujetos tratados (Veeraiah y col., 2014). En este mismo estudio también se determinó que el contenido de Gln, metabolito que se sintetiza exclusivamente en astrocitos, no varió entre los sujetos EP y C. Al igual que en nuestro trabajo, este resultado estaría

sugiriendo, indirectamente, que el estrés gestacional no afecta el funcionamiento metabólico de los astrocitos cuando el sustrato es la glucosa. Un estudio similar realizado por Banasr y col (2010) donde se inyectó a los sujetos con ^{13}C-acetato demostró una disminución en el nivel de metabolitos marcados en la CF de los individuos estresados. Debido a que los astrocitos incorporan mayor porcentaje de acetato que de glucosa para obtener energía celular, sería de gran interés para este modelo de EP evaluar el metabolismo glial a partir de la incorporación de ^{13}C-acetato y cuantificar así el porcentaje de Gln y Glu sintetizados. Esta es la primera vez que se aplica esta técnica para estudiar el metabolismo glutamatérgico en un modelo de EP por inmovilización, por lo cual esta primera evidencia experimental permite establecer parámetros para el estudio y detección de potenciales cambios en el metabolismo de los aminoácidos en este modelo.

2. Efecto del estrés gestacional sobre el transportador vGluT-1 y la liberación del neurotransmisor glutamato.

El transportador vesicular glutamatérgico, vGluT-1, es responsable de introducir el neurotransmisor Glu dentro de la vesícula sináptica donde éste queda almacenado hasta ser liberado durante la transmisión sináptica. Existen en la literatura evidencias que señalan que un aumento del número de vGluTs podría inducir una mayor liberación de Glu, sobre todo a nivel del control de la liberación cuántica a largo término, lo que podría producir variaciones en la eficiencia sináptica y estimular procesos de neurodegeneración como consecuencia de la citotoxicidad del transmisor (Liu, 2003, Moechars y col., 2006, Reimer y col., 1998, Wilson y col., 2005). Raudensky y Yamamoto (2007) en su trabajo con estrés y Kim y col, (2005) en sus trabajos con hipoxia, mostraron que la expresión de la proteína de los vGluTs aumentaba debido a los tratamientos. Así mismo también encontraron que estos individuos presentaban un incremento en la actividad del sistema que era acompañada por rasgos de neurodegeneración. En la evaluación realizada en este estudio se detectó un incremento en los niveles de la proteína del transportador vGlut-1 en la CF de ratas macho EP adultas. Paralelamente mediante la técnica de superfusión de tejido cerebral, evaluamos la liberación de Glu en las dos áreas de estudio. El porcentaje de neurotransmisor liberado fue medido antes y después de la aplicación de un estimulador de la liberación. Los resultados de esta experiencia no mostraron

variaciones estadísticamente significativas entre individuos C y EP pero encontramos una marcada tendencia de aumento en el porcentaje de Glu liberado en la CF de los machos EP en comparación con los individuos C (figura 11). Con la técnica aplicada para este experimento, no podemos descartar la posibilidad que, de haber una variación en los niveles de Glu liberados al espacio sináptico esta diferencia en el porcentaje de neurotransmisor medido se haya diluido durante la homogeneización y procesamiento del tejido. De todas maneras y en coincidencia con otros autores, el aumento en la expresión del transportador vesicular podría contribuir a la remodelación de los árboles dendríticos y a la neurodegeneración observadas en los modelos de estrés (Musazzi y col., 2011). El estudio de Marrocco y col (2012) demuestra que la disminución registrada en la liberación de Glu en el HPC de individuos EP no se debía a un impedimento en la síntesis del aminoácido per se y propusieron que el estrés gestacional causa una disfunción de la maquinaria que controla la exocitosis de Glu en las terminales sinápticas. De esta manera, el aumento de vGluT-1 registrado en nuestro modelo y la tendencia observada en la liberación del neurotransmisor, podrían ser asociados a alteraciones en las proteínas del complejo SNARE o de las proteínas sinaptofisina, sinapsina y/ o Rab 3A que regulan el tráfico de las vesículas sinápticas hacia la membrana. En otro de los experimentos aquí realizados, analizamos la ultraestructura de la sinapsis en individuos C y EP. Este estudio reveló una morfología de la sinapsis con estructura clásica, donde se observó la presencia de mitocondrias, vesículas sinápticas y de densidad postsináptica típicas de las terminales neuronales (figura 13). En esta misma línea, Barros y col (2006a), encontraron que el EP indujo una reducción en los niveles de sinaptofisina y una alta reacción astroglíal en la CF, lo cual estaría reflejando un menor número de sinapsis y una disfunción astroglíal lo cual podría ser consecuencia de los efectos de la neurotoxicidad (Tagliaferro y col., 2006). El resultado obtenido en el presente estudio en coincidencia con los antecedentes bibliográficos, podría indirectamente estar indicando un potencial aumento de la liberación del neurotransmisor en la CF que podría tener consecuencias citotóxicas en el sistema. Al evaluar el HPC de los individuos estudiados, los resultados de los experimentos no mostraron diferencias significativas en los niveles del transportador vGlut-1, ni en la liberación del neurotransmisor en los individuos EP, pero pudimos observar una tendencia de aumento en el número contactos sinápticos de esta área en los machos EP adultos. Dosemenci y col, (2001) encontraron bajos niveles del neurotransmisor y de proteínas

asociadas a la regulación sináptica en el HPC y propusieron que estos cambios reflejarían, una remodelación de los contactos sinápticos del área cerebral, que a largo plazo podrían ser la base de los cambios a nivel de memoria y aprendizaje observados en diversos modelos de EP (Barzegar y col., 2014). Estudios realizados empleando modelos animales de estrés mostraron que los glucocorticoides podrían ser los responsables del aumento de la liberación glutamatérgica provocada por el insulto (Fontella y col., 2004, Raudensky y Yamamoto, 2007). Mientras que otros trabajos con diversos modelos de estrés y sobre desórdenes neuropsiquiátricos han propuestos diversas teorías sobre las modificaciones en el sistema glutamatérgico generadas por este particular estímulo. En su mayoría estos trabajos plantean que un aumento del Glu en el espacio extracelular sería una de las bases de los desórdenes como la depresión, desórdenes neurodegenerativos y de la psicosis que se presenta como síntoma de la esquizofrenia (Banasr y col., 2007). Una teoría opuesta plantea la posibilidad que estas patologías sean consecuencia de una hipofunción de la transmisión glutamatérgica causada por una disminución en la actividad de los receptores o una modificación en la actividad de los transportadores (Tsapakis y Travis, 2002). Sin embargo, todos estos autores coinciden en que un aumento en la captación de Glu sería un posible mecanismo detrás de estos efectos del estrés, ya sea como la causa de una disminución en la neurotransmisión o como una compensación al aumento en la liberación del neurotransmisor.

3. Evaluación de los receptores glutamatérgicos en las crías EP

Debido a que se registraron cambios en las neuronas presinápticas de los individuos EP, se decidió evaluar el componente postsináptico del sistema. Como punto de inicio se estudió el estado de los receptores del sistema glutamatérgico, midiendo los niveles de NMDA y AMPA utilizando como determinantes a las subunidades NR1 y GluR4, respectivamente. Tanto en los machos como en las hembras EP los receptores no mostraron diferencias significativas en sus niveles proteicos con respecto a los C. Paralelamente se evaluaron los niveles de ARNm de las mismas proteínas en las dos áreas de estudios, en machos y en hembras. Los resultados de este ensayo mostraron un aumento en el nivel del ARN mensajero de la subunidad NR1 en la CF de las hembras EP. Resultados previos de nuestro grupo mostraron que el estrés durante la gestación produce un aumento del receptor NMDA

en el HPC y en la CF de machos EP adultos (Berger y col., 2002). Esta discrepancia entre los dos resultados obtenidos empleando el mismo modelo de experimentación, podría deberse a las diferencia del método de evaluación. Para la detección del receptor presente en la membrana plasmática de la células, en el trabajo de Berger y col (2002) se utilizó la autoradiografía cuantitativa, una técnica que permite la detección específica e "*in situ*" de un receptor empleando un ligando tritiado. Para este trabajo de tesis los niveles de las subunidades del receptor se detectaron mediante la técnica de Western blot, por la que se cuantificó la proteína total en un homogeneizado de CF y del HPC, lo que podría llevar a omitir la detección de pequeños cambios en la membrana. Otro de los factores que pudieron haber influido en la diferencia de los resultados obtenidos, puede ser la edad de los sujetos en la que se realizó la evaluación de los receptores. En este estudio empleamos individuos de 60 días de edad que presentan las características de un adulto joven, mientras que en el trabajo anterior se emplearon individuos de 90 días de edad, los cuales presentan una fisiología cerebral de adultos. Como se ha demostrado en diversos estudios, los efectos del estrés cambian a medida que progresan los procesos de envejecimiento y contribuyen también al desarrollo de patologías relacionadas con el aumento de la edad (McEwen y col., 2002, Miller y O'Callaghan, 2005).

En otros modelos de estudio donde se evalúan los efectos de insultos aplicados durante la gestación, como en el caso de la exposición a etanol durante la preñez, se ha demostrado que existen diferencias entre los efectos que se producen sobre los receptores glutamatérgicos a nivel genómico, proteico y funcional. Por ejemplo, (Naassila y Daoust, 2002) encontraron aumentos en los niveles del ARN mensajero de NR1 en el hipocampo de ratas expuestas a etanol duran la gestación mientras que los niveles proteicos de la misma subunidad no presentaron cambios. En un contexto similar, con nuestro modelo, no podemos descartar la posibilidad que el estrés aplicado en la etapa de desarrollo este modificando los niveles de NMDA detectable en la membrana de las neuronas sin modificar los niveles de expresión génica. También podría ocurrir que el insulto gestacional este aumentando la afinidad del receptor por su ligando sin modificar los niveles de la proteína o de su ARN mensajero, detectándose así mayor cantidad de receptor en ensayos con ligandos específicos como en MK-801 (Sun y col., 2013). Vale la pena aclarar que este tipo de inconsistencias entre resultados obtenidos en modelos de estrés gestacional se repite a lo largo de diversos estudios. Algunos autores han propuesto que no hay cambios en

las subunidades de los receptores ni en los niveles de ARNm, entre EP y C (Fumagalli y col., 2009, Neeley y col., 2011) mientras que otros, como Yaka y col (2007), demostraron una disminución de los niveles de NR1 en HPC de machos EP. Matrisciano y col (2012), encontraron disminución en los niveles de mGlu 2 y 3 de los receptores metabotrópicos. Más allá de las diferencias, todos los modelos coinciden en señalar que la función y expresión de los receptores glutamatérgicos son moduladas por los insultos durante el desarrollo gestacional. Así mismo, se han realizado estudios para determinar el origen de estas diferencias y estos demuestran que las modificaciones encontradas dependen del modelo de EP aplicado y de las áreas cerebrales evaluadas, así como también del tipo de animal de experimentación que se emplea (Laloux y col., 2012, Cottrell y Seckl, 2009).

Hasta este momento los estudios realizados en hembras coinciden que el EP no induce cambios extremos en el SNC de estos individuos y concluyen que el hecho que las hembras no muestren cambios podría reflejar que presentan una mayor resistencia al insulto prenatal que los machos (Weinstock, 2007). Al igual que en este trabajo, otros autores que evaluaron variaciones fisiológicas en las hembras han detectado cambios a nivel de la expresión génica, como es el caso del grupo de Van Den Hove y col (2013) quienes encontraron una disminución en los niveles de expresión de NR1, N2A y mGlu5 en el HPC y CF de hembras adultas. La diferencia entre estos resultados y los obtenidos en el presente estudio, donde las hembras EP adultas presentaron un aumento significativo en el ARNm de NR1 en la CF (figura 15), podrían radicar en el tipo de estrés prenatal aplicado para la evaluación. Mientras que nuestro grupo usa un paradigma de estrés crónico por inmovilización, Van Den Hove y col (2013) aplica un paradigma de estrés variable. Más allá de estas diferencias, el hecho que observáramos un aumento de ARNm sin un correlato en la expresión de la proteína podría estar indicando que el efecto del estrés a nivel de la transcripción podría ser posteriormente compensado durante la traducción de la proteína del receptor. Esto permitiría que el sistema produzca una cantidad normal de receptores que llevarían a un funcionamiento normal del sistema glutamatérgico en las hembras sometidas a EP.

Todos estos estudios, muestran que en la actualidad no se ha logrado consenso general sobre los efectos del estrés gestacional a nivel de los receptores glutamatérgicos, ya que la expresión varía según el momento de la aplicación del estrés, la edad evaluada y los individuos utilizados para el análisis. Sin embargo varios

autores coinciden en señalar que cuando los glucocorticoides permanecen sostenidamente elevados, como ocurre en los modelos de estrés, afectan el sistema glutamatérgico a nivel de la liberación de Glu y de sus receptores, tanto en modelos animales como en estudios con humanos (Herman y col., 2004, Martisova y col., 2012, Solas y col., 2010).

4. El EP genera cambios en los niveles de los transportadores gliales y en su función

El glutamato es removido del espacio extracelular por acción de los transportadores de membrana celular. Entre ellos, tanto el transportador GLT1 como el GLAST tiene un rol predominante en el SNC y actúan en forma área específica (Huang y Bergles, 2004, Shigeri y col., 2004). Varios estudios han demostrado que la expresión y mantenimiento de los transportadores depende directamente del contacto neurona-astrocito y de diversos factores neuronales (Gegelashvili y col., 2000, Sheldon y Robinson, 2007, Swanson y col., 1997, Yang y col., 2010). En este estudio se evaluó el efecto del estrés prenatal sobre la expresión de la proteína y del ARNm de GLT1 y GLAST en dos áreas particulares del cerebro, la CF y el HPC. Los resultados hallados muestran una sobreexpresión de la proteína y del ARNm del transportador GLT1 en el HPC de los machos EP adultos, mientras que no se encontró una variación en la CF. Conjuntamente observamos que, los machos EP adultos presentaron un aumento significativo de la captación de Glu realizada por los trasportadores gliales en la CF. Esta diferencia con el grupo C no fue observada en el HPC se estos individuos. Debido a que son dos los transportadores glutamatérgicos presentes en la fracción glial que podrían ser responsables por esta variación, se aplicó el uso de dos inhibidores específicos de EAATs para caracterizar la captación medida en las dos fracciones de estudio. Con este fin, cuantificamos la captación del [^{3}H]-Glu en presencia de DHK y TBOA en gliosomas y sinaptosomas. Este experimento mostró dos importantes aspectos: primero, que la mayor parte de la recaptación en los gliosomas está a cargo del transportador GLT 1, ya que el 80% de la actividad resulto bloqueada por acción del inhibidor específico de este transportador, DHK. Segundo: la captación en la fracción sinaptosomal también resulto bloqueada por DHK, lo cual indicaría que en esta fracción había presencia de GLT 1. Debido a que este es un transportador activo exclusivamente en glía (Danbolt, 2001), este

resultado estaría evidenciando una contaminación en el proceso de extracción de las fracciones.

Numerosas investigaciones empleando diversos modelos y técnicas de investigación, han confirmado que el estrés recibido a lo largo de la vida de un individuo tiene gran impacto en la cognición y en las respuestas emocionales. Los estímulos estresantes a través de sus mediadores neuroquímicos y endócrinos, inducen grandes alteraciones en la sinapsis glutamatérgica y esto modifica, en consecuencia, diversos comportamientos relacionados (Musazzi y col., 2011). Por ejemplo, Martisova y col. (2012) encontraron elevados niveles de expresión de GLT 1 en el HPC de ratas Wistar estresadas mediante separación maternal y concluyeron que este cambio se debía a una alta liberación de Glu que podría ser la base del estado depresivo que mostraban estos individuos. Zhang y col (2013) emplearon un modelo de estrés por inmovilización y encontraron que los individuos jóvenes que mostraban un comportamiento de tipo depresivo también presentaban niveles bajos de GLT 1 y EAAT 3 en el HPC, el cuerpo estriado y en la CF. A diferencia de estos autores, en el presente trabajo no se detectaron cambios a nivel de los transportadores glutamatérgicos en las ratas EP jóvenes con respectos a los individuos C. Esta discrepancia puede deber a que el grupo de Zhang (2013) utilizo la cepa de ratas Sprague-Dawley mientras que nuestro grupo empleo ratas Wistar y una ventana de aplicación del estrés prenatal diferente a la empleada por el otro grupo. Por su parte, Matute y col (2005), al igual que en el presente estudio, encontraron un aumento en la captación glutamatérgica en la CF y sugirieron que este cambio podría reducir la eficacia de la neurotransmisión del sistema, hecho que también se observa en modelos animales de esquizofrenia y en pacientes esquizofrénicos. Los resultados encontrados en la CF de los machos EP adultos, en coincidencia con otros antecedentes bibliográficos (Musazzi y col., 2011, Pittenger y Duman, 2008, Racagni y Popoli, 2008) permiten postular la hipótesis que la hiperactivación de los transportadores gliales en las ratas EP podría ser un proceso de compensación neuroprotectora contra una posible hiperactividad glutamatérgica asociada a citotoxicidad por parte del glutamato. Los cambios específicos encontrados en el HPC, podrían reflejar una disfunción del sistema glutamatérgico en esta área, lo cual podría relacionarse con los déficit de memoria y aprendizaje registrados extensamente en los modelos de EP (Banasr y col., 2010, Schulz y col., 2011, Son y col., 2006, Yaka y col., 2007). Otra posible explicación a este escenario podría ser que el insulto prenatal

induce directamente una hiperactivación del transportador glial GLT 1 en la CF, lo que conllevaría a una disminución en la neurotransmisión, disminuyendo así su efectividad. El aumento per se, de la captación de Glu en la corteza cerebral ha sido propuesto como uno de los factores en el desarrollo de la esquizofrenia (Tsai y Coyle, 2002) y esta coincidencia refuerza una teoría de causa y efecto ya estudiada entre los insultos gestacionales y el desarrollo de síntomas esquizoides (Koenig y col., 2005, Lahti y col., 2009, Moore y Susser, 2011). Las alteraciones en el sistema glutamatérgico juegan un importante papel en la fisiopatología de diversos trastornos como la depresión y la ansiedad (Chen y col., 2010, McEwen, 2012, Ongur y col., 2008). En este modelo de estrés por inmovilización, los machos EP muestran comportamientos de tipo ansioso (Barros y col., 2006b), una alteración que en conjunto con los resultados obtenidos, podría relacionarse con una alteración de la transmisión glutamatérgica en la CF.

5. Crías machos y hembras en el modelo de estrés gestacional.

A lo largo del desarrollo de este trabajo pudimos observar que hubo ciertos efectos que se detectaron únicamente en la cría macho y otros, en menor número, que se detectaron solo en las crías hembra. Los diferentes estudios realizados para evaluar como el estrés gestacional influye en los dos géneros coincide que los cambios en el aprendizaje, las variaciones en la LTP y las reducciones en la densidad dendrítica son principalmente detectadas en los machos EP, mientras que las crías hembra presentan mayoritariamente cambios a nivel de la respuesta del eje hipotalámico pituitario adrenal y en los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos (Weinstock, 2001, 2008). Entre otros, Bowman y col (2004) demostraron que hay diferencias entre los géneros para parámetros como las concentraciones de la noradrenalina, la serotonina y la dopamina en el HPC y en la CF. En el HPC de hembras, se han registrado variaciones en la función de los glucocorticoides (Liu y col., 2006) y de los estrógenos, que llevaron a un aumento en la cantidad de dendritas neuronales en conjunto con un aumento en el registro de la intensidad de la LTP (Woolley y col., 1997). Cambios a nivel de las células gliales también han sido registrados en hembras EP, las cuales mostraron una reducción en el número de estas células, específicamente, en la capa piramidal del HPC. Además estos sujetos experimentales mostraron un incremento de anhedonia y una menor actividad cognitiva, efecto que también fue registrado con menos intensidad en los machos EP

(Behan y col., 2011). El paradigma de estrés prenatal es un modelo bien documentado, que genera variaciones neurobiológicas y comportamentales en las crías que lo experimentaron y ha sido altamente correlacionado con el desarrollo de diversos desórdenes como la depresión, el comportamiento obsesivo compulsivo e incluso rasgos esquizoides (Joels y Baram, 2009, Maccari y Morley-Fletcher, 2007). Como los antecedentes registrados hasta el presente lo muestran, los cambios inducidos por el EP y sus ocurrencias genero específicas están influenciados por la especie, la cepa y la edad de la cría que se evalúa, así como también del tipo de agente de estrés, de su duración y del momento en el que fue aplicado a la madre gestante (Behan y col., 2011, Lemaire y col., 2000, Mueller y Bale, 2007, Schmitz y col., 2002, Zagron y Weinstock, 2006, Zuena y col., 2008). Resulta claro que para poder determinar qué efectos del insulto prenatal están asociados a cada género se necesitarán un mayor número de estudios en cada grupo, e incluso más estudios comparativos entre machos y hembras bajo el mismo tratamiento experimental.

CONCLUSIÓN

Este estudio se realizó con el objetivo de explorar la sinapsis glutamatérgica en el cerebro de ratas adultas sometidas a estrés prenatal y para poner a prueba la hipótesis que los insultos durante la gestación inducen variaciones del sistema que finalmente modifican su función. A pesar que en este estudio no se registraron cambios a nivel del metabolismo, ni de la síntesis del aminoácido Glu y que no se encontró un cambio significativo en la liberación del neurotransmisor Glu, se demostró que los individuos machos expuestos a EP presentan un aumento en los niveles de GLT1 y un incremento en la actividad de captación del aminoácido desde el espacio sináptico. También pudimos identificar que los organismos macho no muestran los mismos cambios que los organismos hembra cuando son expuestos a estrés gestacional. Ambos géneros experimentan diferente variaciones, reflejando que las hembras podrían ser más resistentes a los efectos del EP que los machos. Este tópico requiere de más estudios comparativos para poder obtener una conclusión definitiva sobre los efectos de los insultos prenatales que están asociados a un género específico y que no afectan al otro. Todos los cambios registrados en este trabajo implicarían que el estrés, experimentado por la madre, durante la gestación provoca una variación en los componentes participantes de la sinapsis glutamatérgica en el SNC de las crías que podría desencadenar una alteración en la función sináptica modificando su efectividad en dos importantes áreas del cerebro como la CF y el HPC. Esta alteración, en las crías macho adultas, podría deberse a una captación exacerbada del Glu en la CF, que el sistema podría estar compensado mediante un aumento en la cantidad de vesículas sinápticas disponibles. Así mismo, podría ocurrir que la modificación a nivel de la corteza esté produciendo un aumento en la disponibilidad del neurotransmisor, que podría ser compensado por un aumento en la recaptación a nivel glial evitando un posible efecto de hiperactividad y citotoxicidad del neurotransmisor. En cualquiera de estos escenarios la transmisión glutamatérgica estaría alterada en estas áreas cerebrales, modificando también la señal glutamatérgica a otras áreas del cerebro. A nivel del HPC detectamos cambios en los niveles del ARNm de los transportadores gliales y de sus proteínas, pero no así en su funcionalidad. Por lo que es posible postular que esta área, en los machos adultos, es más resiliente a los efectos del estrés prenatal y no experimenta cambios funcionales a nivel de la sinapsis glutamatérgica en los puntos aquí evaluados. Tomando estas variaciones desde otro enfoque, los cambios registrados podrían estar mostrando que el HPC es más susceptible a los efectos de EP a nivel de la regulación génica, la

transcripción y la traducción, y sería en estos puntos donde el insulto gestacional estaría modelando el sistema. Estas variaciones no se verían compensadas a nivel de la función de los transportadores, déficit que podría ser la base de las alteraciones detectadas a nivel de comportamiento y aprendizaje ligadas al hipocampo.

En síntesis, este estudio fue realizado con el objetivo de probar la hipótesis que el estrés durante la gestación genera cambios en el sistema glutamatérgico de las crías que modifican su función. Aun cuando los niveles metabólicos y la liberación de Glu no fueron alterados por el insulto gestacional, los niveles de GLT1 y su función sufrieron un incremento en el cerebro de los machos adultos expuestos a estrés durante el desarrollo. Los cambios reportados en este trabajo, podrían estar poniendo en evidencia un déficit en la fuerza sináptica como consecuencia de la captación aumentada del neurotransmisor con un concomitante proceso de compensación mediante el aumento del neurotransmisor disponible para ser liberado.

BIBLIOGRAFÍA

Adrover E, Berger MA, Perez AA, Tarazi FI, Antonelli MC (Effects of prenatal stress on dopamine D2 receptor asymmetry in rat brain. Synapse 61:459-462.2007).

Alonso SJ, Damas C, Navarro E (Behavioral despair in mice after prenatal stress. J Physiol Biochem 56:77-82.2000).

Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (The hippocampus and Pavlovian fear conditioning: reply to Bast et al. Hippocampus 12:561-565.2002).

Andersen P (2007) The Hippocampus Book: Oxford University Press, USA.

Anderson CM, Swanson RA (Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia 32:1-14.2000).

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci 22:208-215.1999).

Arenander AT, de Vellis J, Herschman HR (Induction of c-fos and TIS genes in cultured rat astrocytes by neurotransmitters. J Neurosci Res 24:107-114.1989).

Arnsten AF (Catecholamine regulation of the prefrontal cortex. J Psychopharmacol 11:151-162.1997).

Ashkenazi A, Peralta EG, Winslow JW, Ramachandran J, Capon DJ (Functional diversity of muscarinic receptor subtypes in cellular signal transduction and growth. Trends Pharmacol Sci Suppl:16-22.1989).

Axelrod J, Reisine TD (Stress hormones: their interaction and regulation. Science 224:452-459.1984).

Baier CJ, Pallares ME, Adrover E, Katunar MR, Raisman-Vozari R, Antonelli MC (Intrastriatal 6-OHDA Lesion Differentially Affects Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area of Prenatally Stressed Rats. Neurotox Res.2014).

Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS (Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. J Cereb Blood Flow Metab 26:1285-1297.2006).

Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G (Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. Mol Psychiatry 15:501-511.2010).

Banasr M, Valentine GW, Li XY, Gourley SL, Taylor JR, Duman RS (Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. Biol Psychiatry 62:496-504.2007).

Barros VG, Duhalde-Vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC (Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. J Neurosci Res 83:787-800.2006a).

Barros VG, Rodriguez P, Martijena ID, Perez A, Molina VA, Antonelli MC (Prenatal stress and early adoption effects on benzodiazepine receptors and anxiogenic behavior in the adult rat brain. Synapse 60:609-618.2006b).

Barzegar M, Sajjadi FS, Talaei SA, Hamidi G, Salami M (Prenatal exposure to noise stress: Anxiety, impaired spatial memory, and deteriorated hippocampal plasticity in postnatal life. Hippocampus.2014).

Behan AT, van den Hove DL, Mueller L, Jetten MJ, Steinbusch HW, Cotter DR, Prickaerts J (Evidence of female-specific glial deficits in the hippocampus in a mouse model of prenatal stress. Eur Neuropsychopharmacol 21:71-79.2011).

Beijers R, Buitelaar JK, de Weerth C (Mechanisms underlying the effects of prenatal psychosocial stress on child outcomes: beyond the HPA axis. Eur Child Adolesc Psychiatry 23:943-956.2014).

Bellamy TC, Ogden D (Long-term depression of neuron to glial signalling in rat cerebellar cortex. Eur J Neurosci 23:581-586.2006).

Berger MA, Barros VG, Sarchi MI, Tarazi FI, Antonelli MC (Long-term effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. Neurochem Res 27:1525-1533.2002).

Beydoun H, Saftlas AF (Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. Paediatr Perinat Epidemiol 22:438-466.2008).

Bhatia N, Maiti P, Choudhary A, Tuli A, Masih D, Mohd., Masih M, Ara T, Jaggi A (Animal Models of Stress. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2:1147-1155.2011).

Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN (Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. Endocrinology 145:3778-3787.2004).

Brosnan JT, Brosnan ME (Glutamate: a truly functional amino acid. Amino Acids 45:413-418.2013).
Brusco A, Saavedra JP, Garcia G, Tagliaferro P, Evangelista de Duffard AM, Duffard R (2,4-dichlorophenoxyacetic acid through lactation induces astrogliosis in rat brain. Mol Chem Neuropathol 30:175-185.1997).
Cahill L, McGaugh JL (Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. Trends Neurosci 21:294-299.1998).
Cannon W (Stresses and strains of homeostasis. The American Journal of the Medical Sciences 189:13-14.1935).
Carboni E, Barros VG, Ibba M, Silvagni A, Mura C, Antonelli MC (Prenatal restraint stress: an in vivo microdialysis study on catecholamine release in the rat prefrontal cortex. Neuroscience 168:156-166.2010).
Carpenter MB (1985) Fundamentos de neuroanatomía. Buenos Aires. Argentina: El Ateneo.
Contestabile A (The history of the cholinergic hypothesis. Behav Brain Res 221:334-340.2011).
Cooke SF, Bliss TV (Plasticity in the human central nervous system. Brain 129:1659-1673.2006).
Cottrell EC, Seckl JR (Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. Front Behav Neurosci 3:19.2009).
Cremer JE, Heath DF, Teal HM, Woods MS, Cavanagh JB (Some dynamic aspects of braim metabolism in rats Given portocaval anastomosis. Neuropathology and Applied Neurobiology 1:293-311.1975).
Culican SM, Baumrind NL, Yamamoto M, Pearlman AL (Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. J Neurosci 10:684-692.1990).
Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S (Prenatal stress and brain development. Brain Res Rev 65:56-79.2010).
Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. Neuron 15:711-720.1995).
Chen G, Henter ID, Manji HK (Presynaptic glutamatergic dysfunction in bipolar disorder. Biol Psychiatry 67:1007-1009.2010).
Chrousos GP, Gold PW (The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA 267:1244-1252.1992).
Danbolt NC (Glutamate uptake. Prog Neurobiol 65:1-105.2001).
Davidsson P, Gottfries J, Bogdanovic N, Ekman R, Karlsson I, Gottfries CG, Blennow K (The synaptic-vesicle-specific proteins rab3a and synaptophysin are reduced in thalamus and related cortical brain regions in schizophrenic brains. Schizophr Res 40:23-29.1999).
De Robertis E, Hib J, Ponzio R (1996) Señalización Intercelular. In: Biología Celular y Molecular Buenos Aires, Argentina: El Ateneo.
Debanne D, Daoudal G, Sourdet V, Russier M (Brain plasticity and ion channels. J Physiol Paris 97:403-414.2003).
Dingledine R, McBain C (1999) Glutamate and aspartate. In: Basic Neurochemistry, pp 315-333: Lippincott-Raven.
Dosemeci A, Tao-Cheng JH, Vinade L, Winters CA, Pozzo-Miller L, Reese TS (Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. Proc Natl Acad Sci U S A 98:10428-10432.2001).
Dunkley PR, Jarvie PE, Robinson PJ (A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. Nat Protoc 3:1718-1728.2008).
Estrada Flores E, Uribe Aranzábal MC (2002) Atlas de histología de vertebrados. Mexico: Mañoñ Juarez, E. .
Ferraguti F, Shigemoto R (Metabotropic glutamate receptors. Cell Tissue Res 326:483-504.2006).
Fonnum F (Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. J Neurochem 42:1-11.1984).
Fonnum F, Malthe-Sorenssen D, Lund-Karlsen R, Oddan E (Changes in neurotransmitter parameters in the brain induced by L-cysteine injections in the young rat. Brain Res 579:74-78.1992).
Fontella FU, Vendite DA, Tabajara AS, Porciuncula LO, da Silva Torres IL, Jardim FM, Martini L, Souza DO, Netto CA, Dalmaz C (Repeated restraint stress alters hippocampal glutamate uptake and release in the rat. Neurochem Res 29:1703-1709.2004).

Franklin TB, Saab BJ, Mansuy IM (Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. Neuron 75:747-761.2012).

Fujioka A, Fujioka T, Ishida Y, Maekawa T, Nakamura S (Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. Neuroscience 141:907-915.2006).

Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T (Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. J Comp Neurol 435:379-387.2001).

Fumagalli F, Caffino L, Racagni G, Riva MA (Repeated stress prevents cocaine-induced activation of BDNF signaling in rat prefrontal cortex. Eur Neuropsychopharmacol 19:402-408.2009).

Fuster J (2008) The Prefrontal Cortex. USA: Elsevier.

Fuster JM (The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. Neuron 30:319-333.2001).

Gegelashvili G, Dehnes Y, Danbolt NC, Schousboe A (The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. Neurochem Int 37:163-170.2000).

Giardino L, Zanni M, Pozza M, Bettelli C, Covelli V (Dopamine receptors in the striatum of rats exposed to repeated restraint stress and alprazolam treatment. Eur J Pharmacol 344:143-147.1998).

Giulian D, Lachman LB (Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. Science 228:497-499.1985).

Gomez LA, Brusco A, Saavedra JP (Immunocytochemical study of S-100 positive glial cells in the brainstem and spinal cord of the rat embryo. Int J Dev Neurosci 8:55-64.1990).

Gou ZH, Wang X, Wang W (Evolution of neurotransmitter gamma-aminobutyric acid, glutamate and their receptors. Dongwuxue Yanjiu 33:E75-81.2012).

Graignic-Philippe R, Dayan J, Chokron S, Jacquet AY, Tordjman S (Effects of prenatal stress on fetal and child development: a critical literature review. Neurosci Biobehav Rev 43:137-162.2014).

Gruetter R, Seaquist ER, Ugurbil K (A mathematical model of compartmentalized neurotransmitter metabolism in the human brain. Am J Physiol Endocrinol Metab 281:E100-112.2001).

Hatten ME (Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. J Cell Biol 100:384-396.1985).

Hatten ME (Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. Trends Neurosci 13:179-184.1990).

Henckens MJ, van Wingen GA, Joels M, Fernandez G (Time-dependent corticosteroid modulation of prefrontal working memory processing. Proc Natl Acad Sci U S A 108:5801-5806.2011).

Herman JP, Mueller NK, Figueiredo H (Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. Ann N Y Acad Sci 1018:35-45.2004).

Hertz L, Peng L, Dienel GA (Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. J Cereb Blood Flow Metab 27:219-249.2007).

Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. J Neurosci 21:RC181.2001).

Hill RW, Wyse GA, Anderson M (2004) Integrating Systems. In: Animal Physiology(Sinauer Associates, I., ed), pp 259-280 Massachussets, USA.

Huang YH, Bergles DE (Glutamate transporters bring competition to the synapse. Curr Opin Neurobiol 14:346-352.2004).

Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK (Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? Psychol Bull 130:115-142.2004).

Jessel TM (1997) El sistema nervioso. In: Neurociencia y conducta(Kandel, E. R. et al., eds), pp 75-85 Madrid: Prentice Hall.

Joels M, Baram TZ (The neuro-symphony of stress. Nat Rev Neurosci 10:459-466.2009).

Kandel ER (1997) Células nerviosas y conducta. In: Neurociencia y conducta(Kandel, E. R. et al., eds), pp 21-42 Madrid: Prentice Hall.

Kandel ER, Siegelbaum S (1997) Introducción a la transmisión sináptica. In: Neurociencia y conducta(Kandel, E. R. et al., eds), pp 199-212 Madrid: Prentice Hall.

Kandel ERS, J.H.;Jessell, T.M. (2000) Principles of Neural Science. New York: Mc Graw-Hill Companies,Inc.

Katunar M, Saez T, Brusco A, Antonelli M (Inmunocytochemical expression of dopamine-related transcription factors Pitx3 and Nurr1 in prenatally stressed adult rats. Journal of Neuroscience Research 87:1014-1022.2009).

Katunar M, Saez T, Brusco A, Antonelli M (Ontogenetic Expression of dopamine-Related Transcription Factors and Tyrosine Hydroxylase in Prenatally Stressed Rats. Neurotoxicity Research 18:69-81.2010).

Keshet GI, Weinstock M (Maternal naltrexone prevents morphological and behavioral alterations induced in rats by prenatal stress. Pharmacol Biochem Behav 50:413-419.1995).

Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Won MH, Choi HC, Song HK, Kwon OS, Kim YI, Choi SY, Kang TC (Bilateral enhancement of excitation via up-regulation of vesicular glutamate transporter subtype 1, not subtype 2, immunoreactivity in the unilateral hypoxic epilepsy model. Brain Res 1055:122-130.2005).

Kimelberg HK, Katz DM (High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. Science 228:889-891.1985).

Kimelberg HK, Narumi S, Bourke RS (Enzymatic and morphological properties of primary rat brain astrocyte cultures, and enzyme development in vivo. Brain Res 153:55-77.1978).

King S, Laplante DP (2015) Using Natural Disasters to Study Prenatal Maternal Stress in Humans. In: Perinatal Programming of Neurodevelopment, vol. 10 (Antonelli, M. C., ed) New York: Springer

Kinnunen AK, Koenig JI, Bilbe G (Repeated variable prenatal stress alters pre- and postsynaptic gene expression in the rat frontal pole. J Neurochem 86:736-748.2003).

Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E, Brady DL (Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. Behav Brain Res 156:251-261.2005).

Kvamme E, Olsen BE (Substrate mediated regulation of phosphate-activated glutaminase in nervous tissue. Brain Res 181:228-233.1980).

Lahti J, Raikkonen K, Sovio U, Miettunen J, Hartikainen AL, Pouta A, Taanila A, Joukamaa M, Jarvelin MR, Veijola J (Early-life origins of schizotypal traits in adulthood. Br J Psychiatry 195:132-137.2009).

Laloux C, Mairesse J, Van Camp G, Giovine A, Branchi I, Bouret S, Morley-Fletcher S, Bergonzelli G, Malagodi M, Gradini R, Nicoletti F, Darnaudery M, Maccari S (Anxiety-like behaviour and associated neurochemical and endocrinological alterations in male pups exposed to prenatal stress. Psychoneuroendocrinology 37:1646-1658.2012).

Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. J Neurosci 15:1835-1853.1995).

Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN (Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 97:11032-11037.2000).

Liguz-Lecznar M, Skangiel-Kramska J (Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. Acta Neurobiol Exp (Wars) 67:207-218.2007a).

Liguz-Lecznar M, Skangiel-Kramska J (Vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the developing mouse barrel cortex. Int J Dev Neurosci 25:107-114.2007b).

Liu G (Presynaptic control of quantal size: kinetic mechanisms and implications for synaptic transmission and plasticity. Curr Opin Neurobiol 13:324-331.2003).

Liu J, Suzuki T, Seki T, Namba T, Tanimura A, Arai H (Effects of repeated phencyclidine administration on adult hippocampal neurogenesis in the rat. Synapse 60:56-68.2006).

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (Protein measurement with the Folin phenol reagent. JBiol Chem 193:265-275.1951).

Lui CC, Wang JY, Tain YL, Chen YC, Chang KA, Lai MC, Huang LT (Prenatal stress in rat causes long-term spatial memory deficit and hippocampus MRI abnormality: differential effects of postweaning enriched environment. Neurochem Int 58:434-441.2011).

Maccari S, Morley-Fletcher S (Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. Psychoneuroendocrinology 32 Suppl 1:S10-15.2007).

Machiyama Y, Balazs R, Merei T (Incorporation of (14C)glutamate into glutathione in rat brain. J Neurochem 17:449-453.1970).

Magistretti PJ (Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system. Diabete Metab 14:237-246.1988).

Marini AM, Rabin SJ, Lipsky RH, Mocchetti I (Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate. J Biol Chem 273:29394-29399.1998).

Marrocco J, Mairesse J, Ngomba RT, Silletti V, Van Camp G, Bouwalerh H, Summa M, Pittaluga A, Nicoletti F, Maccari S, Morley-Fletcher S (Anxiety-like behavior of prenatally stressed rats is associated with a selective reduction of glutamate release in the ventral hippocampus. J Neurosci 32:17143-17154.2012).

Martisova E, Solas M, Horrillo I, Ortega JE, Meana JJ, Tordera RM, Ramirez MJ (Long lasting effects of early-life stress on glutamatergic/GABAergic circuitry in the rat hippocampus. Neuropharmacology 62:1944-1953.2012).

Mason JW (A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. J Psychiatr Res 8:323-333.1971).

Matrisciano F, Tueting P, Maccari S, Nicoletti F, Guidotti A (Pharmacological activation of group-II metabotropic glutamate receptors corrects a schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. Neuropsychopharmacology 37:929-938.2012).

Matute C, Melone M, Vallejo-Illarramendi A, Conti F (Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. Glia 49:451-455.2005).

McCarthy KD, de Vellis J (Alpah-adrenergic receptor modulation of beta-adrenergic, adenosine and prostaglandin E1 increased adenosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in primary cultures of glia. J Cyclic Nucleotide Res 4:15-26.1978).

McCarthy KD, Salm AK (Pharmacologically-distinct subsets of astroglia can be identified by their calcium response to neuroligands. Neuroscience 41:325-333.1991).

McClelland JL (The organization of memory. A parallel distributed processing perspective. Rev Neurol (Paris) 150:570-579.1994).

McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ (Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. Brain Res Dev Brain Res 84:55-61.1995).

McEwen BS (Stress and hippocampal plasticity. Annu Rev Neurosci 22:105-122.1999).

McEwen BS (Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiol Rev 87:873-904.2007).

McEwen BS (The ever-changing brain: cellular and molecular mechanisms for the effects of stressful experiences. Dev Neurobiol 72:878-890.2012).

McEwen BS, Magarinos AM, Reagan LP (Structural plasticity and tianeptine: cellular and molecular targets. Eur Psychiatry 17 Suppl 3:318-330.2002).

Medina Marin AM, Escobar Betancourth MI (Sistema glutamatérgico, primera parte: Sinaptología, homeostasis y muerte celular. Revista Colombiana de Psiquiatria XXXI (3):187-212.2002).

Meldrum BS (Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. J Nutr 130:1007S-1015S.2000).

Miller DB, O'Callaghan JP (Aging, stress and the hippocampus. Ageing Res Rev 4:123-140.2005).

Miller EK, Cohen JD (An integrative theory of prefrontal cortex function. Annu Rev Neurosci 24:167-202.2001).

Moechars D, Weston MC, Leo S, Callaerts-Vegh Z, Goris I, Daneels G, Buist A, Cik M, van der Spek P, Kass S, Meert T, D'Hooge R, Rosenmund C, Hampson RM (Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. J Neurosci 26:12055-12066.2006).

Moore H, Susser E (Relating the effects of prenatal stress in rodents to the pathogenesis of schizophrenia. Biol Psychiatry 70:906-907.2011).

Mueller BR, Bale TL (Early prenatal stress impact on coping strategies and learning performance is sex dependent. Physiol Behav 91:55-65.2007).

Munir M, Correale DM, Robinson MB (Substrate-induced up-regulation of Na(+)-dependent glutamate transport activity. Neurochem Int 37:147-162.2000).

Murmu MS, Salomon S, Biala Y, Weinstock M, Braun K, Bock J (Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy. Eur J Neurosci 24:1477-1487.2006).

Musazzi L, Racagni G, Popoli M (Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. Neurochem Int 59:138-149.2011).

Myers SJ, Dingledine R, Borges K (Genetic regulation of glutamate receptor ion channels. Annu Rev Pharmacol Toxicol 39:221-241.1999).

Naassila M, Daoust M (Effect of prenatal and postnatal ethanol exposure on the developmental profile of mRNAs encoding NMDA receptor subunits in rat hippocampus. J Neurochem 80:850-860.2002).

Nakamura Y, Iga K, Shibata T, Shudo M, Kataoka K (Glial plasmalemmal vesicles: a subcellular fraction from rat hippocampal homogenate distinct from synaptosomes. Glia 9:48-56.1993).

Neeley EW, Berger R, Koenig JI, Leonard S (Strain dependent effects of prenatal stress on gene expression in the rat hippocampus. Physiol Behav 104:334-339.2011).

Nelissen K, Smeets K, Mulder M, Hendriks JJ, Ameloot M (Selection of reference genes for gene expression studies in rat oligodendrocytes using quantitative real time PCR. J Neurosci Methods 187:78-83.2010).

Nelson C, Luciana M (2001) Developmental cognitive neuroscience, 2001: The MIT Press.

Netter F, Brass A (1994) Sistema Nervioso. Buenos Aires, Argentina: Ediciones Científicas y Técnicas.

Nieoullon A, Canolle B, Masmejean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S (The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? J Neurochem 98:1007-1018.2006).

Niswender CM, Conn PJ (Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 50:295-322.2010).

Northington FJ, Traystman RJ, Koehler RC, Rothstein JD, Martin LJ (Regional and cellular expression of glial (GLT1) and neuronal (EAAC1) glutamate transporter proteins in ovine fetal brain. Neuroscience 85:1183-1194.1998).

Norton N, Kirov G, Zammit S, Jones G, Jones S, Owen R, Krawczak M, Williams NM, O'Donovan MC, Owen MJ (Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: no evidence for association or epistasis. Am J Med Genet 114:491-496.2002).

O'Keefe J, Nadel L (1978) The Hippocampus as a Cognitive Map. London. New York: Oxford University Press.

Olivier B, van Oorschot R, Waldinger MD (Serotonin, serotonergic receptors, selective serotonin reuptake inhibitors and sexual behaviour. Int Clin Psychopharmacol 13 Suppl 6:S9-14.1998).

Ongur D, Jensen JE, Prescot AP, Stork C, Lundy M, Cohen BM, Renshaw PF (Abnormal glutamatergic neurotransmission and neuronal-glial interactions in acute mania. Biol Psychiatry 64:718-726.2008).

Owens DF, Kriegstein AR (Is there more to GABA than synaptic inhibition? Nat Rev Neurosci 3:715-727.2002).

Palmada M, Centelles JJ (Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. Front Biosci 3:d701-718.1998).

Pallares ME, Adrover E, Baier CJ, Bourguignon NS, Monteleone MC, Brocco MA, Gonzalez-Calvar SI, Antonelli MC (Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring. Stress 16:429-440.2013a).

Pallares ME, Baier CJ, Adrover E, Monteleone MC, Brocco MA, Antonelli MC (Age-dependent effects of prenatal stress on the corticolimbic dopaminergic system development in the rat male offspring. Neurochem Res 38:2323-2335.2013b).

Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF, Jr., Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A (Glial cells in (patho)physiology. J Neurochem 121:4-27.2012).

Pasquini M, Berardelli I, Biondi M (Ethiopathogenesis of depressive disorders. Clin Pract Epidemiol Ment Health 10:166-171.2014).

Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego Publishers by Elsevier.

Pittenger C, Duman RS (Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. Neuropsychopharmacology 33:88-109.2008).

Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Relo AL, Feldon J, Yee BK (Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. Eur J Neurosci 19:705-712.2004).

Qu H, Haberg A, Haraldseth O, Unsgard G, Sonnewald U ((13)C MR spectroscopy study of lactate as substrate for rat brain. Dev Neurosci 22:429-436.2000).

Racagni G, Popoli M (Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. Dialogues Clin Neurosci 10:385-400.2008).

Raudensky J, Yamamoto BK (Effects of chronic unpredictable stress and methamphetamine on hippocampal glutamate function. Brain Res 1135:129-135.2007).

Raviola E, Mazzarello P (The diffuse nervous network of Camillo Golgi: facts and fiction. Brain Res Rev 66:75-82.2011).

Reimer RJ, Fon EA, Edwards RH (Vesicular neurotransmitter transport and the presynaptic regulation of quantal size. Curr Opin Neurobiol 8:405-412.1998).

Reynolds ES (The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17:208-212.1963).

Rodriguez AL, Zhou Y, Williams R, Weaver CD, Vinson PN, Dawson ES, Steckler T, Lavreysen H, Mackie C, Bartolome JM, Macdonald GJ, Daniels JS, Niswender CM, Jones CK, Conn PJ, Lindsley CW, Stauffer SR (Discovery and SAR of a novel series of non-MPEP site mGlu(5) PAMs based on an aryl glycine sulfonamide scaffold. Bioorg Med Chem Lett 22:7388-7392.2012).

Sandman CA, Davis EP, Buss C, Glynn LM (Prenatal programming of human neurological function. Int J Pept 2011:837596.2011).

Santello M, Cali C, Bezzi P (Gliotransmission and the tripartite synapse. Adv Exp Med Biol 970:307-331.2012).

Schmitz C, Rhodes ME, Bludau M, Kaplan S, Ong P, Ueffing I, Vehoff J, Korr H, Frye CA (Depression: reduced number of granule cells in the hippocampus of female, but not male, rats due to prenatal restraint stress. Mol Psychiatry 7:810-813.2002).

Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS (Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. Front Endocrinol (Lausanne) 4:102.2013).

Schulz KM, Pearson JN, Neeley EW, Berger R, Leonard S, Adams CE, Stevens KE (Maternal stress during pregnancy causes sex-specific alterations in offspring memory performance, social interactions, indices of anxiety, and body mass. Physiol Behav 104:340-347.2011).

Schwartz BL, Rosse RB, Deutsch SI (Toward a neuropsychology of memory in schizophrenia. Psychopharmacol Bull 28:341-351.1992).

Schwartz JH (1997) La neurona. In: Neurociencia y conducta(Kandel, E. R. et al., eds), pp 47-58 Madrid: Prentice Hall.

Schwartz JP, Mishler K (Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes. Cell Mol Neurobiol 10:447-457.1990).

Selye H (A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. Nature 138:32-32.1936).

Selye H (The stress concept. Can Med Assoc J 115:718.1976).

Shank RP, Campbell GL (Glutamine and alpha-ketoglutarate uptake and metabolism by nerve terminal enriched material from mouse cerebellum. Neurochem Res 7:601-616.1982).

Sheldon AL, Robinson MB (The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. Neurochem Int 51:333-355.2007).

Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. Brain Res Brain Res Rev 45:250-265.2004).

Siegel GJ, Agranoff B (1999) Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects. Philadelphia. New York: Lippincott-Raven.

Silvagni A, Barros VG, Mura C, Antonelli MC, Carboni E (Prenatal restraint stress differentially modifies basal and stimulated dopamine and noradrenaline release in the nucleus accumbens shell: an 'in vivo' microdialysis study in adolescent and young adult rats. Eur J Neurosci 28:744-758.2008).

Smith CC, McMahon LL (Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. J Neurosci 26:8517-8522.2006).

Solas M, Aisa B, Mugueta MC, Del Rio J, Tordera RM, Ramirez MJ (Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease. Neuropsychopharmacology 35:1664-1673.2010).

Son GH, Geum D, Chung S, Kim EJ, Jo JH, Kim CM, Lee KH, Kim H, Choi S, Kim HT, Lee CJ, Kim K (Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. J Neurosci 26:3309-3318.2006).

Stefanis N, Frangou S, Yakeley J, Sharma T, O'Connell P, Morgan K, Sigmudsson T, Taylor M, Murray R (Hippocampal volume reduction in schizophrenia: effects of genetic risk and pregnancy and birth complications. Biol Psychiatry 46:697-702.1999).

Sun H, Guan L, Zhu Z, Li H (Reduced levels of NR1 and NR2A with depression-like behavior in different brain regions in prenatally stressed juvenile offspring. PLoS One 8:e81775.2013).

Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC (Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. J Neurosci 17:932-940.1997).

Tagliaferro P, Javier Ramos A, Onaivi ES, Evrard SG, Lujilde J, Brusco A (Neuronal cytoskeleton and synaptic densities are altered after a chronic treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. Brain Res 1085:163-176.2006).

Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS (2001) Neocortical neuronogenesis: Regulation, control points, and a strategy of structural variation. In: Handbook of Developmental cognitive neuroscience(Nelson, C. A. and Luciana, M., eds), pp 3-22 Massachusetts, USA: MIT press.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol Rev 62:405-496.2010).

Tsacopoulos M, Magistretti PJ (Metabolic coupling between glia and neurons. J Neurosci 16:877-885.1996).

Tsai G, Coyle JT (Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. Annu Rev Pharmacol Toxicol 42:165-179.2002).

Tsapakis ME, Travis MJ (Glutamate and psychiatric disorders. Advances in Psychiatric Treatment 8:189-197.2002).

Vallee M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S (Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. J Neurosci 17:2626-2636.1997).

van Calker D, Muller M, Hamprecht B (Regulation by secretin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin of cyclic AMP accumulation in cultured brain cells. Proc Natl Acad Sci U S A 77:6907-6911.1980).

van den Bergh BR, Mennes M, Stevens V, van der Meere J, Borger N, Stiers P, Marcoen A, Lagae L (ADHD deficit as measured in adolescent boys with a continuous performance task is related to antenatal maternal anxiety. Pediatr Res 59:78-82.2006).

Van den Hove DL, Kenis G, Brass A, Opstelten R, Rutten BP, Bruschettini M, Blanco CE, Lesch KP, Steinbusch HW, Prickaerts J (Vulnerability versus resilience to prenatal stress in male and female rats; implications from gene expression profiles in the hippocampus and frontal cortex. Eur Neuropsychopharmacol 23:1226-1246.2013).

van Landeghem FK, Stover JF, Bechmann I, Bruck W, Unterberg A, Buhrer C, von Deimling A (Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. Glia 35:167-179.2001).

Veeraiah P, Noronha JM, Maitra S, Bagga P, Khandelwal N, Chakravarty S, Kumar A, Patel AB (Dysfunctional glutamatergic and gamma-aminobutyric acidergic activities in prefrontal cortex of mice in social defeat model of depression. Biol Psychiatry 76:231-238.2014).

Wainstock T, Anteby EY, Glasser S, Lerner-Geva L, Shoham-Vardi I (Exposure to life-threatening stressful situations and the risk of preterm birth and low birth weight. Int J Gynaecol Obstet 125:28-32.2014).

Ward IL, Weisz J (Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. Endocrinology 114:1635-1644.1984).

Weinstock M (Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. Prog Neurobiol 65:427-451.2001).

Weinstock M (Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. Neurochem Res 32:1730-1740.2007).

Weinstock M (The long-term behavioural consequences of prenatal stress. Neurosci Biobehav Rev 32:1073-1086.2008).

Weinstock M (Sex-dependent changes induced by prenatal stress in cortical and hippocampal morphology and behaviour in rats: an update. Stress 14:604-613.2011).

Welsch U (2008) Tejidos. In: Sobotta Histología, pp 85-206 Madrid, España: Médica Panamericana.

Wilson CA, Terry AV, Jr. (Variable maternal stress in rats alters locomotor activity, social behavior, and recognition memory in the adult offspring. Pharmacol Biochem Behav 104:47-61.2013).

Wilson NR, Kang J, Hueske EV, Leung T, Varoqui H, Murnick JG, Erickson JD, Liu G (Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1. J Neurosci 25:6221-6234.2005).

Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA (Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. J Neurosci 17:1848-1859.1997).

Yaka R, Salomon S, Matzner H, Weinstock M (Effect of varied gestational stress on acquisition of spatial memory, hippocampal LTP and synaptic proteins in juvenile male rats. Behav Brain Res 179:126-132.2007).

Yang Y, Gozen O, Vidensky S, Robinson MB, Rothstein JD (Epigenetic regulation of neuron-dependent induction of astroglial synaptic protein GLT1. Glia 58:277-286.2010).

Yehuda R (Post-traumatic stress disorder. N Engl J Med 346:108-114.2002).

Yehuda R, Engel SM, Brand SR, Seckl J, Marcus SM, Berkowitz GS (Transgenerational effects of posttraumatic stress disorder in babies of mothers exposed to the World Trade Center attacks during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 90:4115-4118.2005).

Zagron G, Weinstock M (Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. Behav Brain Res 175:323-328.2006).

Zhang XH, Jia N, Zhao XY, Tang GK, Guan LX, Wang D, Sun HL, Li H, Zhu ZL (Involvement of pGluR1, EAAT2 and EAAT3 in offspring depression induced by prenatal stress. Neuroscience 250:333-341.2013).

Zozulya AA, Gabaeva MV, Sokolov OY, Surkina ID, Kost NV (Personality, coping style, and constitutional neuroimmunology. J Immunotoxicol 5:221-225.2008).

Zuena AR, Mairesse J, Casolini P, Cinque C, Alema GS, Morley-Fletcher S, Chiodi V, Spagnoli LG, Gradini R, Catalani A, Nicoletti F, Maccari S (Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. PLoS One 3:e2170.2008).