



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN TÁCTIL SOBRE LA
NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL, EL APRENDIZAJE
ESPACIAL Y LA MEMORIA EN RATAS ESTRESADAS
PRENATALMENTE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

M. en B.E. MARÍA DE LOS ANGELES GUERRERO AGUILERA

TESIS CO-DIRIGIDA POR

DRA. MARÍA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MÁRQUEZ

DRA. WENDY PORTILLO MARTÍNEZ

ASESORADA POR

DRA. MARÍA DEL CARMEN RUBIO OSORNIO

CIUDAD DE MÉXICO

ENERO 26 DEL 2017

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

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la realización del presente trabajo a través de la beca con número 224664.

Agradezco al Área de Biología Conductual y Reproductiva del Departamento de Biología de la Reproducción de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y al Laboratorio de Conducta Sexual y Plasticidad del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla por el espacio y apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Miembros del Jurado

Los miembros del jurado fueron designados por la Comisión de Posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada:

EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN TÁCTIL SOBRE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL, EL APRENDIZAJE ESPACIAL Y LA MEMORIA EN RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE

Que presentó:

M. en B. E. María de los Ángeles Guerrero Aguilera, el día 26 de Enero del 2017

Dra. Beatriz Gómez González

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa


(Presidenta)

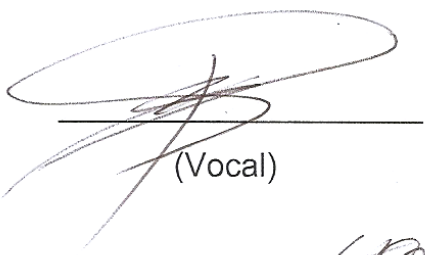
Dra. Sonia Galván Arzate

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"


(Secretaria)


Dra. María del Carmen Rubio Osornio

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"


(Vocal)

Dr. Moisés Rubio Osornio

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"


(Vocal)

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTORA

DRA. MARÍA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MÁRQUEZ

Área de Biología Conductual y Reproductiva
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

CO-DIRECTORA

DRA. WENDY PORTILLO MARTÍNEZ

Laboratorio de conducta sexual y plasticidad
Instituto de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla

ASESORA

DRA. MARÍA DEL CARMEN RUBIO OSORNIO

Departamento de Neurofisiología
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
“Manuel Velasco Suárez”

*“En el enfrentamiento entre el arroyo y la roca, el arroyo siempre gana, no por fuerza,
sino por la persistencia”*

Buda

Con amor para mi hijo Miguel Ángel

Agradecimientos

A mi codirectora la Dra. María del Socorro Retana Márquez por su tiempo, comprensión, dedicación y compromiso otorgados en cada momento, mismos que contribuyeron de manera favorable para el buen término de este proyecto, muchas gracias.

A mi codirectora la Dra. Wendy Portillo Martínez y a mi asesora la Dra. María del Carmen Rubio Osornio por su tiempo, dedicación y sobre todo esas palabras de apoyo que fueron cruciales en los momentos más críticos. Muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio Lizbeth, Aldo, Fahiel, Diana, Felipe, Mónica, Azhalea, Flor, Eunice y Sergio por todos los momentos que compartimos, les deseo éxito.

A mi familia, que durante todos estos años me han apoyado y que a pesar de las adversidades siempre han estado ahí. Los amo.

A mi hijo por ser el motor de mi vida y a Johnny por el amor, el tiempo y el apoyo otorgado.

Resumen

El aprendizaje de tipo espacial y la estimulación posnatal incrementan la neurogénesis en el giro dentado (GD) del hipocampo. Por el contrario, el estrés prenatal (EP) causa disminución en la proliferación de las células granulares en esa estructura cerebral. En este trabajo se evaluó el efecto de la estimulación táctil postnatal (EST), aplicada desde el nacimiento hasta la edad adulta (3 meses), sobre el desempeño cognitivo y la neurogénesis hipocampal (sobrevivencia y diferenciación) en ratas adultas de ambos sexos estresadas prenatalmente. Asimismo se evaluó la respuesta del eje adrenal a la exposición al laberinto acuático de Morris (LAM). El EP por inmersión en agua fría se aplicó en el último tercio de la gestación (día 15 a 21 de gestación). A la edad de tres meses, se evaluó la capacidad cognitiva de los animales en el LAM, así como la neurogénesis en el hipocampo. Los resultados mostraron que las latencias de escape de las hembras y de los machos con EP fueron mayores en comparación al grupo de animales control (CON). En las hembras con EP la sobrevivencia celular en el GD aumentó. Las concentraciones de corticosterona (CORT) al final de las pruebas en el LAM fueron mayores en las ratas EP de ambos sexos. La EST disminuyó las latencias de escape en los animales EP y causó aumento en el número de neuronas nuevas en el GD. Asimismo, las concentraciones de CORT de los animales con EP más EST fueron similares a los CON. En los animales CON, la EST causó disminución en la sobrevivencia de las células nuevas en el GD de hembras y machos, pero incrementó el porcentaje de células nuevas que se diferenciaron a neuronas y mejoró el desempeño en el LAM. Estos resultados muestran que la EST de largo plazo en los animales EP puede prevenir las deficiencias

en el aprendizaje en la etapa adulta debido probablemente al incremento en el número de neuronas nuevas en el GD y a la disminución de la reactividad del eje adrenal al estímulo del LAM.

Abstract

Neurogenesis in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus is increased by spatial learning and postnatal stimulation. Conversely, prenatal stress (PS) produces a decrease in the proliferation of hippocampal granular cells. This work evaluated the effect of postnatal tactile stimulation (PTS), when applied from birth to adulthood (3 months old), on cognitive performance and hippocampal neurogenesis (survival and differentiation) in both genders prenatally stressed. Also we evaluated the adrenal response after the animals performed the Morris water maze test (MWM)) was also analyzed. PS by immersion in cold water was provided the last third of gestation (days 15 through 21). Hippocampal neurogenesis and cognitive performance in the MWM were assessed in rats of three months of age. Results showed that escape latencies of both female and male PS rats were longer when they were compared with the control group (CON). DG cell survival increased in the PS female rats. Corticosterone (CORT) concentrations were significantly higher in the male and female PS rats after MWM training. PTS decrease escape latencies and increased the number of new neurons in the DG of PS animals. CORT concentrations were similar to those in CON. In CON, PTS diminished DG cell survival but increased differentiation to neurons and reduced latency in the MWM. These results show that long-term PTS in PS animals might prevent learning deficits in adults through increase in the number of DG new neurons and decrease of the reactivity of the adrenal axis to MWM training.

ABREVIATURAS

ACTH.....	Hormona adrenocorticotropa
ADN.....	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA.....	Análisis de Varianza
AVP	Hormona Arginina-Vasopresina
BrdU	5-bromo-2´deoxiuridina
CBG.....	Transcortina o Globulina Unidora de Corticosteroides
CON	Control
CORT	Corticosterona
CRH.....	Hormona Liberadora de Corticotropina
DMSO.....	Dimetil Sulfóxido
E.E.M.....	Error Estándar de la Media
EP.....	Estrés Prenatal
EST	Estimulación Táctil
GABA	Ácido Gama Aminobutirico
GC	Glucocorticoides
GD.....	Giro Dentado
GRs.....	Receptor de glucocorticoides
HCl	Ácido Clorhídrico
HHA.....	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal
HPLC.....	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IgG.....	Inmunoglobulina tipo G
LAM.....	Laberinto Acuático de Morris
LC.....	Locus Coeruleus
MRs	Receptor de Mineralocorticoides
NaCl	Cloruro de sodio
NE	Noreste
NA	Noradrenalina
NeuN	Proteína específica de Núcleo Neuronal

NO..... Noroeste
PBSSolución amortiguadora de fosfatos
POMC..... Proopiomelanocortina
PVN..... Núcleo Paraventricular
RNAm.....Ácido Ribonucleico mensajero
s..... segundos
SE.....Sureste
SNC..... Sistema Nervioso Central
SNS Sistema Nervioso Simpático
SOSuroeste
TBSSolución amortiguadora de trifosfatos
11 β -HSD2..... 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Definición de estrés	1
1.2. La respuesta de estrés.....	2
1.2.1. Efectores de la respuesta de estrés.....	3
1.2.2. Sistema nervioso autónomo.....	4
1.2.3. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.....	5
1.3. Hipocampo y neurogénesis.....	8
1.4. Hipocampo y los procesos de aprendizaje y memoria espacial.....	13
1.5. Estimulación posnatal	14
2. Antecedentes.....	16
2.1. Estrés en la vida prenatal	16
2.2. Alteraciones del eje HHA en la descendencia EP	18
2.3. Efectos del EP sobre la neurogénesis hipocampal.....	20

2.4. Aprendizaje y memoria espacial en los animales EP..	21
2.5. Estimulación posnatal en los animales EP.....	21
3. Planteamiento del problema.....	22
4. Justificación.....	23
5. Pregunta de Investigación.....	23
6. Hipótesis.....	24
7. Objetivo General.....	24
8. Objetivos Particulares.....	24
9. Diseño Experimental.....	25
9.1. Materiales y Métodos.....	25
9.1.1. Animales.....	25
9.1.2. Estrés Prenatal.....	26
9.1.3. Estimulación Táctil Posnatal.....	27
9.1.4. Pruebas de Navegación Espacial.....	27
9.1.4.1. Instrumentación.....	28

9.1.4.2. Fase de Aprendizaje	28
9.1.4.3. Fase de Memoria	29
9.1.5. Administración del Marcador de Síntesis de ADN (BrdU)	29
9.1.6. Inmunofluorescencia	30
9.1.7. Concentraciones de CORT	31
9.1.7.1. Extracción de CORT	32
9.1.7.2. Procedimiento cromatográfico.....	32
9.2. Análisis estadístico	33
10. Resultados	34
10.1. Concentraciones séricas de CORT en las ratas hembras gestantes estresadas	34
10.2. Aprendizaje y la memoria espacial.....	35
10.3. Neurogénesis en el hipocampo.....	39
10.4. Concentraciones séricas de CORT en la descendencia al final de las pruebas en el LAM.....	43
11. Discusión	44

12. Conclusiones	51
13. Referencias	53

1. Introducción

1.1. Definición de estrés

La vida existe gracias al mantenimiento de un equilibrio dinámico y complejo conocido como homeostasis que es constantemente amenazada por fuerzas adversas de naturaleza intrínsecas o extrínsecas y de características impredecibles e/o incontrolables (1, 2). Las fuerzas adversas son conocidas como “estresores” y la “respuesta de estrés” es la reacción del organismo dirigida a reestablecer la homeostasis (3). Fisiológicamente, la respuesta de estrés se caracteriza por la ausencia de una respuesta anticipatoria (situación impredecible) así como por una baja recuperación después de la reacción neuroendocrina (situación incontrolable) (2). Por otro lado, los organismos pueden cambiar los niveles de referencia de sus mecanismos homeostáticos y de esta forma pueden responder a eventos tales como cambios circádicos o estacionales. Esto se conoce como alostasis, que significa “alcanzar la estabilidad a través del cambio”, y no pretende remplazar al término homeostasis (4, 5). La alostasis por tanto, permite que los organismos puedan hacer frente a las condiciones cambiantes del medio donde viven.

La respuesta de estrés depende del tipo de estresor (físico o emocional), de la intensidad (leve, medio e intenso) de la duración (agudo, de minutos a horas y crónico, de días a años), de la frecuencia (número de exposiciones al estresor); así como del estado y constitución física del organismo (2, 6). Los estresores físicos incluyen las alteraciones del medio interno (anoxia, hipoglucemia, etc.), los externos son el calor o

el frío extremos, y los multifacéticos son los que incluyen los estímulos nocivos y la tensión física, tales como el ejercicio o las lesiones físicas y las enfermedades. Los estresores psicológicos son estímulos que afectan las emociones y pueden producir ansiedad o frustración. Asimismo, diferentes tipos de estresores pueden mezclarse y actuar en combinación (mixtos) (7).

1.2. La respuesta de estrés

El estrés se ha definido como un estado de homeostasis alterada, en la que el organismo responde activando una serie de respuestas adaptativas centrales y periféricas conocida como respuesta de estrés (3, 7, 8). Durante la respuesta adaptativa al estrés se reciben y se integran diversas señales cognitivas, emocionales, neurosensoriales periféricas que llegan a través de diferentes vías (8). La activación del sistema de estrés lleva a cambios conductuales como activación de la atención selectiva, euforia o disforia, incremento en la analgesia, supresión del apetito y de la conducta reproductiva y físicos tales como el re-direccionamiento del oxígeno y nutrientes hacia el sistema nervioso central (SNC) y sitios estresados del cuerpo (órganos o tejidos que están comprometidos durante y/o por la exposición al estresor), incremento de la presión sanguínea, aumento en el ritmo cardiaco, incremento en la tasa respiratoria, incremento en la gluconeogénesis y lipólisis, inhibición del crecimiento, la reproducción, la digestión y de la estimulación en la motilidad del colon. Estos cambios son adaptativos, de corta duración y aumentan las probabilidades de supervivencia del individuo (8).

1.2.1. Efectores de la respuesta de estrés

La respuesta de estrés se da a través del sistema de estrés, el cual tiene componentes del SNC y en órganos periféricos (8-10). Los componentes centrales están localizados en el hipotálamo y en el tallo cerebral. En el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo se encuentran las neuronas parvocelulares, donde se realiza la biosíntesis de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de la hormona arginina-vasopresina (AVP). Asimismo, se biosintetiza CRH en neuronas de los núcleos paragigantocelular y parabraquial de la unión ponto-mesencefálica del bulbo raquídeo. También incluye al sistema Locus Coeruleus/Noradrenalina (LC/NA) que participa con la liberación de noradrenalina durante la respuesta de estrés. Los componentes periféricos del sistema de estrés incluyen a los miembros periféricos del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA); las eferencias del sistema simpático-adrenomedular (8-10) (Fig. 1).

Sistema de Estrés

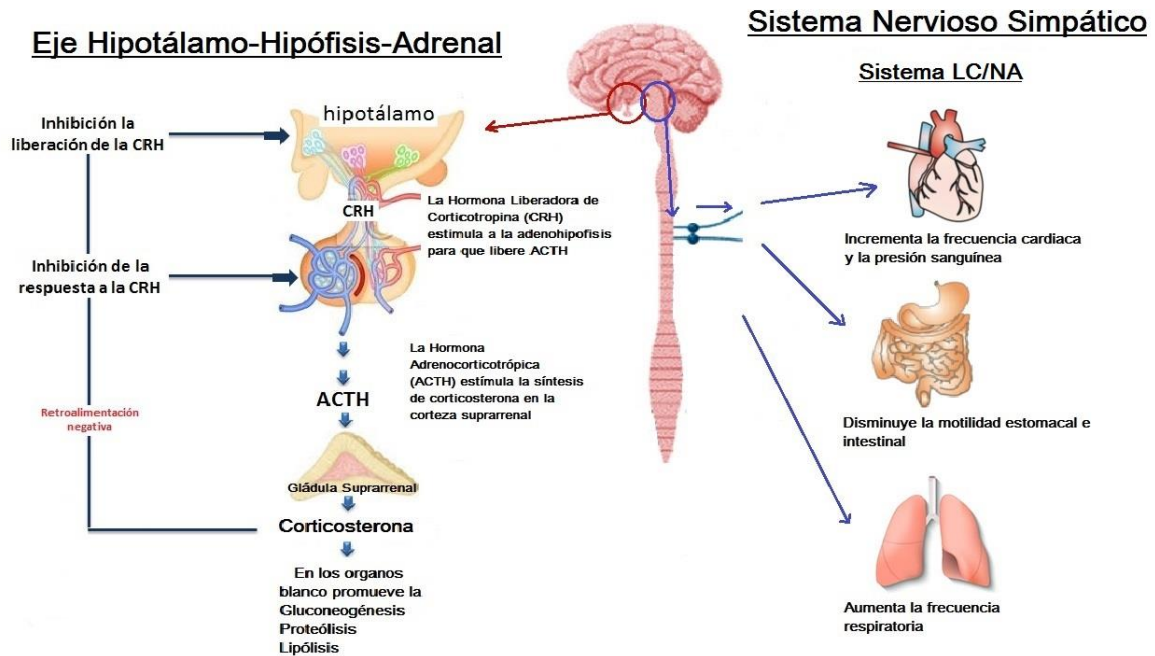


Fig. 1. Esquema de los componentes de la respuesta de estrés. Modificado de <http://victorgrupo5.blogspot.mx/2014/03/eje-hipotalamo-hipofisis-suprarrenal.html>.

1.2.2. Sistema nervioso autónomo

El sistema nervioso autónomo responde rápidamente a los estresores y controla un amplio rango de funciones como son las cardiovasculares, respiratorias, gastrointestinales, renales y endócrinas. Cuando el sistema Locus Coeruleus-sistema nervioso simpático (LC-SNS) se activa durante la exposición a un estresor se libera NA desde una densa red neuronal a través de todo el cerebro (corteza cerebral, sistema límbico, hipotálamo y tallo cerebral) que aumenta el estado de excitación, de

vigilancia y de ansiedad (7, 11). El sistema LC-SNS estimula la secreción de adrenalina y NA desde la médula suprarrenal, así como la liberación de NA en las terminales nerviosas simpáticas, que ocasionan el aumento de la frecuencia respiratoria y cardiaca, así como la movilización de glucosa hepática para hacer frente a la demanda energética que impone la respuesta inmediata a los estresores (12-14). La epinefrina en el cerebro funciona como un sistema general de alarma que disminuye las funciones neurovegetativas, tales como comer y dormir, también contribuyen a incrementar las respuestas autonómicas y neuroendocrinas al estrés, incluyendo la activación del eje HHA (1, 15).

1.2.3. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El eje HHA consta de tres estructuras: el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas suprarrenales. Del hipotálamo se secreta la CRH que es el principal regulador del eje HHA. La CRH es un péptido de 41 aminoácidos que se sintetiza y se libera de las neuronas parvocelulares del PVN del hipotálamo hacia el sistema porta-hipofisiario (16) y estimula la secreción de la hormona adenocorticotropa (ACTH) desde la hipófisis anterior. La AVP actúa en sinergia con la CRH, pero su actividad como secretagogo de la ACTH es mucho menor (8, 17). En situaciones no estresantes, la CRH y la AVP son secretadas en un ritmo circádico, pulsátil y altamente coordinado (18) pero durante el estrés agudo se incrementa la amplitud y sincronización de la liberación pulsátil de la CRH y de la AVP hacia el sistema porta-hipofisiario. Los estímulos como las emociones y los cambios en la presión sanguínea experimentados durante la respuesta de estrés afectan la secreción de la CRH. La presión sanguínea es regulada

por receptores en el seno carotideo, el arco aórtico, las principales venas torácicas y ambas aurículas. Cuando la presión se incrementa, los pulsos que se originan de esos receptores viajan hacia el núcleo del tracto solitario y luego al PVN, donde la secreción de CRH es inhibida. Inversamente, la secreción de CRH se incrementa cuando la presión sanguínea disminuye. Esto último ha sido asociado con una disminución de los impulsos que llegan del PVN vía del núcleo del tracto solitario (1, 7, 19). Asimismo, varios sistemas de neurotransmisión regulan la liberación de la CRH. La adrenalina, la noradrenalina, la acetilcolina y la serotonina estimulan la liberación de la CRH, mientras que el ácido gama-aminobutírico (GABA), el sistema de péptidos opioides, la ACTH y los glucocorticoides (GC) inhiben su liberación (1, 7).

La CRH estimula la síntesis y secreción de la ACTH en los corticotropos adenohipofisarios a partir de la pro-hormona Proopiomelanocortina (POMC), a través de la unión a receptores específicos en esas células (20, 21). La ACTH liberada al torrente sanguíneo se une a receptores de alta afinidad, localizados en la membrana de las células de la corteza suprarrenal, donde estimula la síntesis y liberación de los GC (8, 22, 23).

Los GC (cortisol en humanos y corticosterona en la rata) son hormonas de naturaleza esteroidea sintetizadas a partir del colesterol en la zona *fasciculata* y *reticularis* de la corteza suprarrenal (24), que posteriormente son liberados a la circulación y son los efectores finales del eje HHA (25). Una alta proporción, casi el 95% de la corticosterona (CORT) circula unida a una alfa globulina llamada transcortina o globulina unidora de corticosteroides (CBG). La fracción de CORT unida

es fisiológicamente inactiva y la fracción libre en el plasma es la hormona con actividad biológica; asimismo la fracción libre es la que ejerce los efectos de retroalimentación negativa sobre la liberación de la CRH y la ACTH (7, 26).

Los GC tienen un papel importante en la regulación de la actividad basal del eje HHA, así como en la terminación de la respuesta de estrés ya que actúan sobre centros extrahipotálamicos, en el hipotálamo y en la hipófisis (8). La retroalimentación negativa de los GC sobre la secreción de las hormonas CRH y ACTH sirve para limitar la duración de la exposición de los tejidos del organismo a la acción de los GC, así se minimizan los efectos catabólicos, lipogénicos, antireproductivos e inmunosupresivos de esas hormonas (8).

Las acciones de la CORT en el cerebro están mediadas por los receptores para mineralocorticoides (MRs) o receptores tipo I y los receptores para glucocorticoides (GRs) o receptores tipo II (7, 23, 27-29). En el cerebro los receptores tipo I se encuentran principalmente en las neuronas del hipocampo y del *septum*, pertenecientes al sistema límbico (23, 30). Estos receptores participan en la modulación de la respuesta a los estímulos ambientales y emocionales (miedo, ansiedad, etc.). Los receptores tipo I tienen una alta afinidad por la CORT, aproximadamente de 10 veces más alta que la de los receptores tipo II colocalizados. Los tipo I en el hipocampo responden fuertemente a la CORT (23). Las bajas concentraciones de CORT activan a los receptores tipo I, ésta se suma a la de los receptores tipo II que es ocasionada por las altas concentraciones de CORT teniendo como consecuencia profundos cambios en la integridad y en la función

neuronal (31-34), a su vez está asociado con cambios en la regulación neuroendocrina y en la conducta (23, 35).

Los receptores tipo II están presentes en altas concentraciones en el hipotálamo, particularmente en las neuronas que liberan CRH y en áreas del cerebro que contienen POMC, como es el hipocampo, el septum lateral, la amígdala y el núcleo del tracto solitario (7, 30). Durante el estrés, la ocupación de los receptores tipo I cambia mínimamente, mientras que la de los receptores tipo II cambia considerablemente (7, 29). Los GC ejercen un circuito de retroalimentación negativa para terminar la liberación de la ACTH en respuesta al estrés y tienen efectos a largo plazo sobre el comportamiento adaptativo, presumiblemente por la vía de los receptores tipo II (7). La reducción de los receptores tipo II está asociada con la disminución de la acción de retroalimentación negativa de los GC, que pueden resultar en la elevación persistente de las concentraciones de los mismos en el plasma por efecto del estrés. Adicionalmente, la persistente elevación de las concentraciones circulantes de GC ocasiona que las neuronas hipocámpales sean vulnerables a su acción tóxica con una consecuente degeneración y muerte de las mismas (7, 36, 37).

1.3. Hipocampo y neurogénesis

El hipocampo es una estructura del lóbulo temporal medial del cerebro, rico en receptores para CORT (tipo I y tipo II) como se mencionó con anterioridad y es un componente esencial de las vías neurales que median la respuesta de estrés, a su vez, es esencial para el aprendizaje y la formación de la memoria (38, 39). La formación

hipocampal comprende el giro dentado (GD), donde se alinean las células granulares, el Cuerno de Ammón, formado por neuronas piramidales y sus proyecciones alineadas en una sola capa y se subdivide en 1, 2, 3 y 4 (CA1, CA2, CA3, CA4), el complejo subicular y la corteza entorrinal (Fig. 2). Se ha demostrado que el GD de los machos es más grande que el de las hembras, esto se ha relacionado a un mayor número de células granulares (38). Las diferencias del hipocampo entre sexos inician en el día 27 de vida posnatal y es el resultado de la acción de la testosterona durante la gestación (39, 40). En la vida posnatal, las hormonas sexuales juegan un papel importante en el número de ramificaciones dendríticas (39, 41, 42). Se ha reportado que en la región CA1, el número total de neuronas es menor en las hembras que en los machos, pero no hay diferencias en el tamaño de los árboles dendríticos. Durante la etapa adulta, el número de neuronas de la región CA3, así como el largo de las espinas dendríticas y la complejidad en sus ramificaciones son mayores en las hembras que en los machos (39, 43).

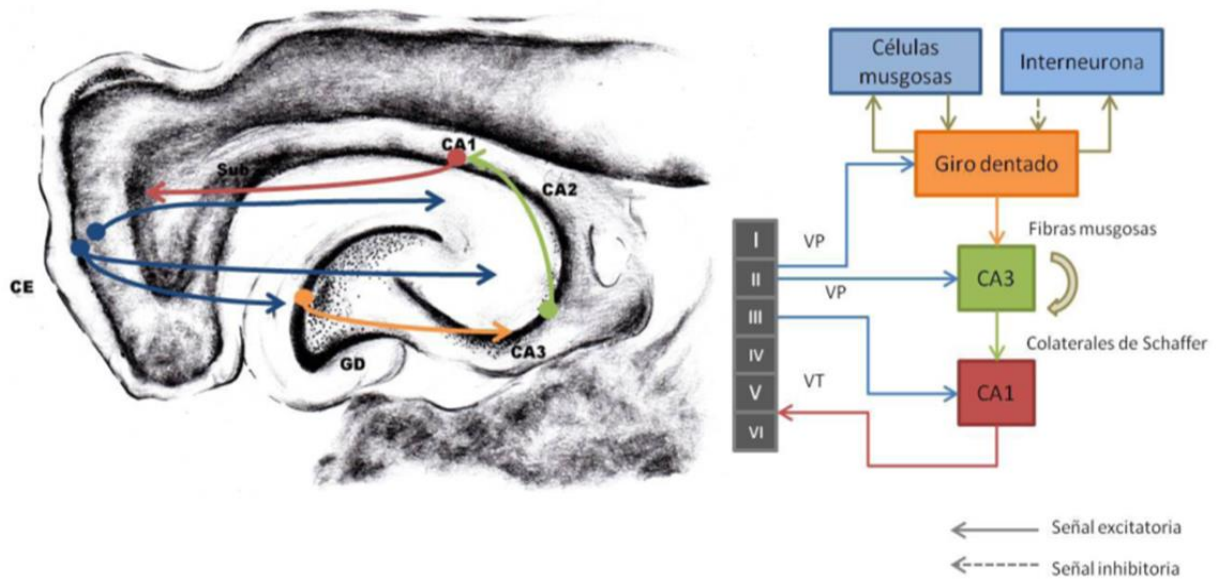


Fig. 2. Esquema del hipocampo adulto donde se muestran los circuitos de conexión entre las regiones hipocampales y otras estructuras cerebrales. “La tradicional vía excitatoria trisináptica (Corteza entorrinal (CE)-giro dentado (GD)-CA3-CA1-CE) es descrita por las flechas de colores (flecha azul: vía perforante; flecha naranja: vía de fibras musgosas; flecha verde: colaterales de Schaffer; flecha roja; proyecciones de CA1 a la CE). Abreviaturas: CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; Sub: subiculum” Tomado de (44) pag. 22.

En la zona subgranular (ZSG) del GD existen células pluripotenciales que participan en el proceso de neurogénesis durante la etapa adulta (39, 45). En los roedores, el pico de génesis de las células granulares del GD se presenta durante la primera semana de vida posnatal y algunas conservan la capacidad de dividirse (células pluripotenciales). La neurogénesis tiene tres etapas caracterizadas por diferentes estados morfológicos de las células: proliferación, sobrevivencia y diferenciación (46, 47). Durante la proliferación las células pluripotenciales parecidas a la glía radial y con propiedades de los astrocitos (48) inician la actividad mitótica que dan lugar a dos células hijas (Tipo 1). Las células Tipo 1 pueden ser identificadas con el marcador de síntesis de

ADN 5´-2´bromodeoxiuridina (BrdU), el cual permanece en la célula (49). Las células Tipo 1 cambian a células Tipo 2 (a y b) y se pueden identificar gracias a una proteína llamada nestina. Las células Tipo 2 presentan un núcleo de forma irregular con la cromatina condensada y tienen procesos neuríticos cortos y rechonchos orientados a la ZSG (46). Durante esa transición, las células multipotenciales pueden diferenciarse a neuronal o glía (46). Las células Tipo 2b y 3 expresan la proteína doblecortina (DCX), misma que se une a los microtúbulos y sirve como marcador de neuronas inmaduras. Las células Tipo 3 son positivas a DCX pero negativas a la nestina y conservan la capacidad de dividirse. Estas células tienen una posición horizontal, similar a la Tipo 2, pero con procesos neuríticos largos y núcleo redondeado; algunas veces se encuentra en posición vertical y pueden presentar prolongaciones neuríticas que cruzan la zona granular del GD (46). El estado Tipo 3 comprende la transición de las células pluripotenciales, que tienen la capacidad de proliferar a un estado postmitótico de neurona inmadura (46, 50). Las neuronas inmaduras expresan la proteína unida al calcio calretinina, Prox 1 y el marcador postmitótico NeuN (46) y migran radialmente dentro de la capa granular, pero éste desplazamiento es limitado (Fig. 3). La mayoría de las nuevas células se mantienen en la ZSG y en la tercera capa de células granulares y muy pocas salen de esa posición, pueden permanecer ahí hasta la fase final de diferenciación donde tienen prolongaciones neuríticas hacia la zona granular y a CA3 (46, 49).

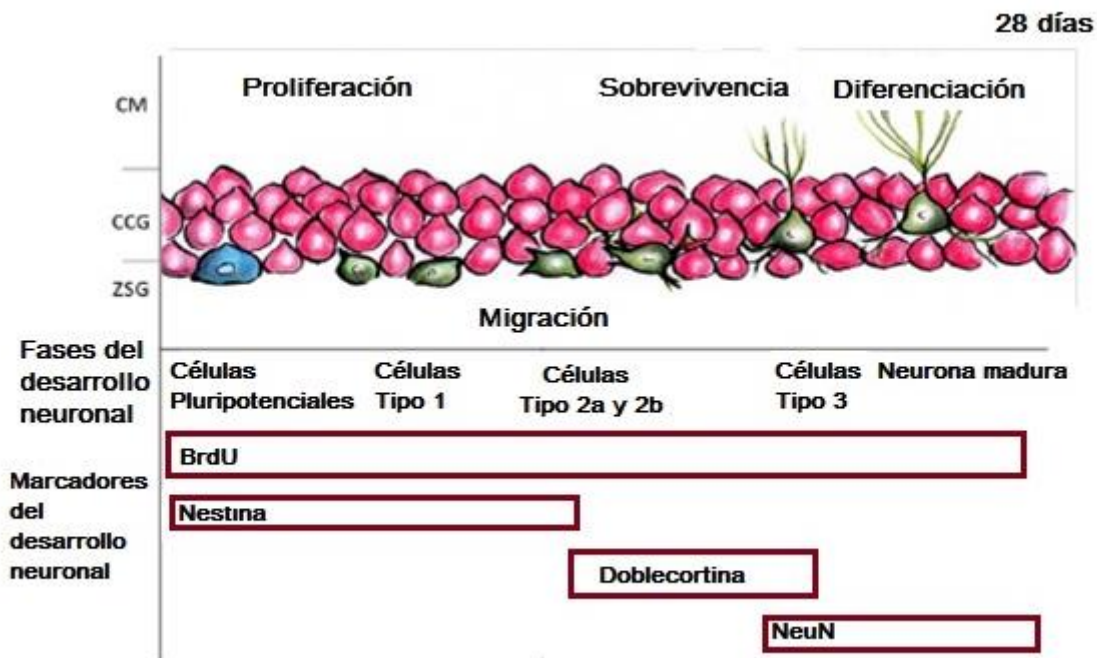


Fig. 3. Esquematación del proceso de neurogénesis en el GD del hipocampo adulto y de alguno de los marcadores utilizados para identificar los diferentes estadios de las células nuevas. Modificado de Olivares Hernández et al., 2015.

La regulación de la neurogénesis responde a factores internos y externos. Los factores internos son el nicho, los neurotransmisores, las hormonas, los factores de crecimiento, el contacto célula-célula, los componentes de la matriz extracelular, entre otros y los factores externos son el estrés, la actividad física, el aprendizaje, la estimulación táctil, etc (46, 47). El estrés, especialmente el distrés (estrés negativo), ocasiona la disminución en la proliferación de las células pluripotenciales (47, 51). De forma opuesta, el aprendizaje y los ambientes enriquecidos incrementan la proliferación y la supervivencia de las células nuevas (46, 52). También existen diferencias en la neurogénesis asociadas al sexo del individuo. Se ha reportado que las hembras producen más células granulares que los machos y, sin embargo, tienen mayores nivel

de GC circulantes en sangre (52, 53). Lo anterior prueba que entre sexos, existen diferencias en los mecanismos que regulan la producción de neuronas granulares.

1.4. Hipocampo y los procesos de aprendizaje y memoria espacial

El hipocampo forma parte del sistema límbico-cognitivo, que es una red integrada implicada en los procesos de aprendizaje y memoria, de atención, estados de motivación y emoción (54). Se ha reportado que el hipocampo (área CA 3 principalmente) participa en la formación de la memoria declarativa (o explícita) en humanos; en los roedores, ésta estructura está implicada en la formación de la memoria de tipo espacial (o relacional) (55, 56). La estructura del GD también recibe múltiples entradas sensoriales provenientes tanto de regiones corticales como subcorticales. La mayor entrada de información llega de la vía perforante que proviene de la capa 2 de la corteza entorrinal, ésta se divide en la vía perforante medial, la cual procesa la información espacial y el componente lateral, que procesa la información no espacial (54). El GD también recibe entradas de regiones subcorticales como son el septum, la región supramamilar, el hipotálamo posterior y de varios núcleos monoaminérgicos del tronco cerebral (locus coeruleus, núcleos del rafe, área tegmental ventral, etc) (54). A diferencia de toda la diversidad de entradas de información a hacia el GD, este último sólo tiene proyecciones hacia CA3; característica que mantiene bajo control el flujo de la información dentro del hipocampo (54) (Fig. 2). El GD se activa durante el aprendizaje y en particular cuando los animales dominan la tarea (57-59). Adicionalmente, se activa cuando los animales recuperan la información durante una sesión realizada 5 días después de la fase de entrenamiento (54, 58). Un papel importante de la vía GD-CA3 ha sido demostrada para

la adquisición y consolidación de la memoria espacial en estudios donde se usó el laberinto acuático (60, 61).

Asimismo, la neurogénesis juega un papel importante en el aprendizaje y la memoria. Para entender esta relación, se creó un modelo en el que se interrumpe de manera selectiva la neurogénesis hipocampal por medio de la sobreexpresión de la proteína pro-apoptótica Bax, con ayuda de la administración de doxiciclina (62). La administración de este compuesto causó deterioro de la adquisición de la memoria de referencia espacial en la prueba del laberinto acuático. Así se corroboró que neuronas nuevas son requeridas para establecer la relación entre las pistas espaciales y de esta forma navegar a través del espacio. Adicionalmente se observaron deficiencias en los animales entrenados en salir desde el mismo punto de partida hacia la plataforma escondida cuando fueron colocados en un nuevo punto de partida. Así, la interrupción de la neurogénesis deteriora la habilidad de usar la información almacenada en una nueva situación, indicando que las nuevas neuronas participan en la expresión de la flexibilidad de la memoria (54, 63) (Fig. 3).

1.5. Estimulación Posnatal

Al final de los años 50's se describieron los efectos de la estimulación posnatal; también llamada manipulación temprana o neonatal (64-67). Se ha reportado que la estimulación repetitiva en la primera etapa de la vida posnatal mejora el desarrollo del sistema neuroendocrino e incrementa la capacidad para tratar con eventos estresantes en etapas posteriores del desarrollo (68, 69). La estimulación posnatal consiste en al

menos tres diferentes tipos de manipulaciones: La separación materna breve (hasta 15 min), la estimulación táctil (aplicada por el experimentador) y los ambientes enriquecidos (exposición a diferentes estímulos olfatorios y visuales) (70). Se han propuesto mecanismos por los cuales la estimulación posnatal afecta el desarrollo de los individuos. Durante la separación materna las crías experimentan cambios fisiológicos ocasionados por la hipotermia (71) y se suman a los cambios de la conducta materna (lamer, acicalar y cubrir las crías) (72). En la exposición a los ambientes enriquecidos existe el aumento de las interacciones sociales y con estímulos no sociales que ocasiona modificaciones neuronales y conductuales en los individuos (65).

La estimulación posnatal modifica estructuralmente al SNC y se ha observado que en los animales estimulados se incrementa el peso total del cerebro (73), aumenta el grosor de la corteza cerebral (65, 74) y aumenta la densidad neuronal, las sinapsis y las ramificaciones dendríticas del hipocampo (65, 75-77). También se ha observado que reduce el número de neuronas en el Locus Coeruleus (78), en el núcleo paraventricular del hipotálamo (79, 80) y en el área preóptica medial (81). Asimismo, la descendencia presenta modificaciones en la conducta, como son la disminución del miedo frente a situaciones novedosas y/o aversivas. También disminuye la respuesta de estrés ocasionada por diferentes estresores (82-84). La rápida finalización de la respuesta de estrés en los animales estimulados posnatalmente es debida al incremento en la retroalimentación negativa ocasionada por el aumento en el número de receptores de GC en el hipocampo (85). Asimismo, los animales de ambos sexos estimulados posnatalmente presentaron incremento de la memoria espacial y no espacial (70, 86,

87). El incremento en el aprendizaje y la memoria espacial se ha relacionado con el aumento de la LTP (88), de la sinaptogénesis, de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), de las sinapsis colinérgicas y del número de receptores NMDA en el hipocampo (89-91).

2. Antecedentes

2.1. Estrés en la vida prenatal

La vida prenatal es un periodo de alta plasticidad cerebral, especialmente del sistema de estrés que es particularmente sensible a los estresores. De esta forma, los eventos que ocurren en la vida temprana, como la exposición a concentraciones anormales de hormonas maternas y/o a la conducta materna alterada (disminución en el acicalamiento y alimentación) pueden influir en la integridad del eje HHA y de su capacidad de respuesta a las situaciones estresantes en la vida posnatal (92).

En los humanos, durante la gestación, el estrés materno causado por desastres naturales o de origen humano, como son, las tensiones interpersonales crónicas, las condiciones adversas en el hogar y/o en el trabajo, se han relacionado con el incremento en la incidencia de desórdenes conductuales observados en niños y adultos (93, 94). En los niños, el estrés prenatal (EP) se ha asociado con el deterioro de la actividad intelectual y el desarrollo del lenguaje (95-97), el autismo (98, 99) y el déficit de atención e hiperactividad (100, 101). En los adultos el EP se relaciona con la esquizofrenia (102) y la depresión (103), así como con la hipertensión, la diabetes tipo 2 y la enfermedad

isquémica cardíaca (104). En modelos animales de EP, se ha observado en las crías, el aumento en la conducta ansiosa (94, 105), en la latencia para iniciar la conducta de juego (106) y la disminución en el aprendizaje y la memoria (94, 107, 108), así como déficit de atención (94, 109).

En modelos animales experimentales, como por ejemplo en la rata, se observó que el estrés prenatal experimentado desde el día 14 al 21 de gestación ocasiona el incremento de la CORT materna en la circulación fetal y reducción en los niveles de la globulina unidora de corticosteroides (CBG) en la descendencia durante la etapa adulta (110). Asimismo, se ha sugerido que el EP induce cambios en la función placentaria, que puede tener consecuencias sobre el desarrollo fetal (94, 111). Durante el EP se incrementa la liberación de la CRH placentaria, ocasionando que se incrementen sus niveles en la sangre fetal, pudiendo llegar a su cerebro (94, 112). Esta CRH puede afectar la función y la integridad del hipocampo en desarrollo, debido a la activación de sus receptores (94, 113, 114). El estrés materno ocasiona la reducción en la expresión y actividad de la enzima placentaria 11β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo dos (11β -HSD2), que transforma la CORT a su forma inactiva 11-dehidrocorticosterona (de cortisol a cortisona en humanos), permitiendo así el paso del glucocorticoide hacia el feto (94, 115, 116). De esta manera, la presencia de grandes concentraciones de la CRH y la CORT provenientes de la madre estresada pueden impedir la formación correcta de las conexiones neuronales y reducir en general la plasticidad del cerebro fetal (93) (Fig. 4). La CORT presente durante el estrés prenatal activa los receptores a GC que están presentes en el hipocampo, el hipotálamo, la hipófisis, la corteza cingulada y la amígdala

de la rata desde el día 13 de gestación (93, 117). Se ha propuesto que el eje HHA del feto podría responder al estrés materno desde el día 15 de gestación; pues se ha observado aumento en la expresión del RNAm para CRH en el PVN fetal (93, 118).

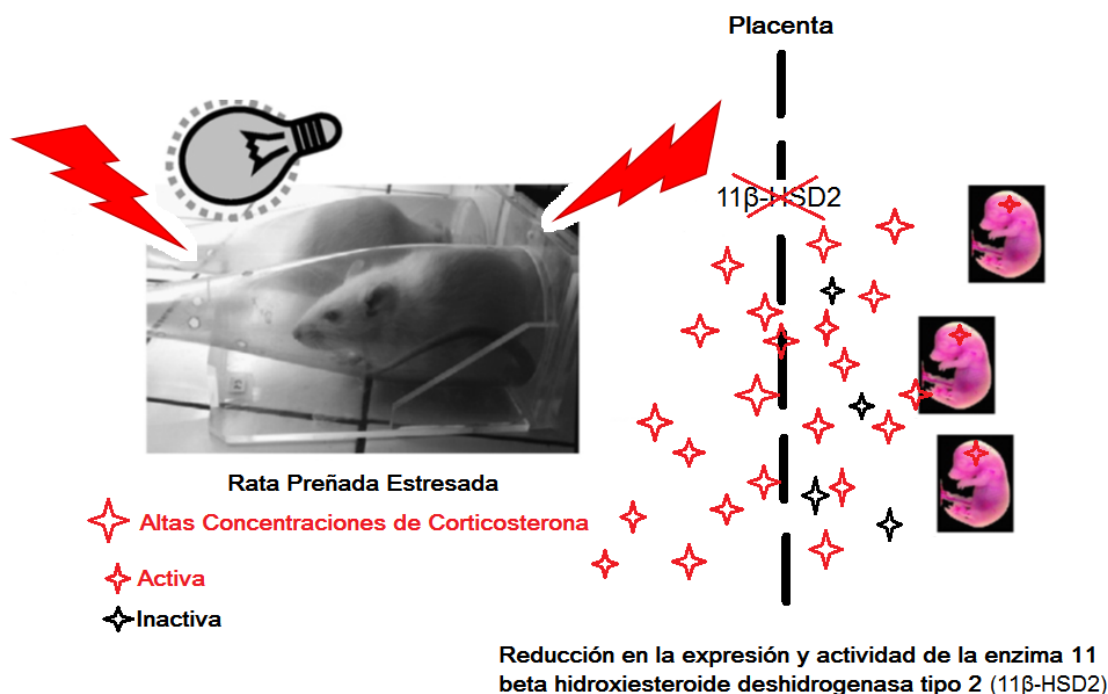


Fig. 4. Representación del estrés prenatal. En la madre estresada las altas concentraciones de corticosterona pueden atravesar la barrera placentaria y llegar a los fetos en desarrollo; debido a que la enzima 11β- hidroxisteroide deshidrogenasa tipo dos (11β-HSD2) se encuentra reducida en expresión y actividad debido al estrés materno. Modificado de (92).

2.2. Alteraciones del eje HHA en la descendencia EP

La evidencia experimental muestra que el estrés materno puede afectar el desarrollo del eje HHA y ocasionar alteraciones en su funcionamiento durante la vida posnatal de la descendencia. Los efectos de las altas concentraciones de CORT materna sobre la retroalimentación negativa del eje HHA de la descendencia fueron corroborados

utilizando hembras gestantes adrenalectomizadas que posteriormente recibieron dosis basales de CORT (119). En ese estudio se observó que la adrenalectomía previene la respuesta prolongada del eje HHA materno al estrés y la regulación negativa de los receptores tipo I y tipo II en los machos de la descendencia. Asimismo, los efectos del estrés en las hembras adrenalectomizadas se reinstalaron cuando fueron inyectadas con una dosis diaria de CORT para igualar los efectos del estrés (120). Efectos similares en la descendencia fueron observados cuando a hembras gestantes a las que se les colocó un pellet de CORT que aumentó la concentración circulante de esa hormona en un 50% en comparación con los animales control (121). De esta forma se confirmó que la exposición a los elementos de respuesta de estrés de la madre influye de forma negativa el funcionamiento del eje HHA de la descendencia.

En las ratas EP de ambos sexos se ha observado que presentan grandes concentraciones libres y totales de CORT al final del periodo de luz, mientras que las hembras EP secretan más CORT durante todo el ciclo diurno (hiperactividad del eje HHA) (122). En otros estudios se ha evaluado la respuesta del eje HHA en la descendencia EP después de la exposición a situaciones estresantes. De esta forma, la liberación de CORT en los machos y las hembras EP en respuesta a un estresor es mayor y más prolongada en comparación con los animales control (hiperreactividad del eje HHA) (93, 123-126). Además, la descendencia EP muestra una lenta recuperación de las concentraciones basales de CORT después de la exposición al estresor (94, 127). Estas alteraciones están asociadas con la disminución en el número de receptores de GC en el hipocampo, un indicativo del deterioro en la regulación del mecanismo de

retroalimentación del eje HHA (93, 128, 129). Sin embargo, los estresores de mediana intensidad, que ocasionan concentraciones de CORT menos elevadas, parecen afectar sólo a las hembras EP (93, 130). Así, a pesar de que la exposición a los GC es necesaria para el desarrollo normal del eje HHA y especialmente del hipocampo, las altas concentraciones de GC generadas por el EP, tienen efectos dañinos sobre el eje HHA fetal y el hipocampo de la descendencia en la vida posnatal (94, 115).

2.3. Efectos del EP sobre la neurogénesis hipocampal

El EP tiene efectos a largo plazo sobre la neurogénesis en la vida posnatal; pero se han reportado variaciones en los efectos dependiendo del tipo de estresor utilizado y del sexo del individuo. De esta forma se ha reportado una disminución en la proliferación de las nuevas células en el hipocampo de las ratas macho estresadas prenatalmente por inmovilización desde la adolescencia hasta la vejez (108) a diferencia de las hembras donde sólo se observó disminución en este mismo parámetro en la vejez (131), lo anterior sugiere que el EP acelera el deterioro de la plasticidad hipocampal relacionada con la edad. En otro estudio se observó una reducción en la sobrevivencia de las células nuevas en las ratas macho estresada prenatalmente por inmovilización, a diferencia de las hembras que no mostraron cambios (132). Por otro lado, el estrés psicológico combinado con estrés físico aplicado en la etapa prenatal, suprime significativamente la proliferación y la sobrevivencia de las células nuevas en hipocampo dorsal de las ratas de ambos sexos (133). Probablemente los efectos del EP sobre la neurogénesis están relacionados con la intensidad del estresor aplicado a la madre gestante.

2.4. Aprendizaje espacial y memoria en los animales EP

De la misma forma que en los humanos, los cambios conductuales que se reportan con mayor frecuencia en las ratas EP son el deterioro del aprendizaje y la memoria, así como la conducta ansiosa ocasionada por situaciones novedosas o estresantes (93, 120). Para estudiar el aprendizaje y la memoria en los animales de experimentación se utilizan diferentes pruebas cognitivas: el laberinto acuático de Morris (LAM), el laberinto radial de ocho brazos, el reconocimiento de objetos, entre otros (39). Con ayuda de las diferentes pruebas cognitivas se ha observado que las ratas macho aprenden más rápido que las hembras (134); sin embargo, se probó que EP influye selectivamente el aprendizaje en ratas hembras, mejorando su ejecución y eliminando las diferencias con los machos (132, 135). Pero en otro trabajo se reportó que el EP deteriora el aprendizaje en ratas juveniles de ambos sexos, pero en la etapa adulta este efecto sólo es observado en las hembras (136).

Se ha reportado que las deficiencias en el aprendizaje de la descendencia EP están relacionadas con la disminución en la arborización dendrítica, en la densidad de las espinas dendríticas y de las sinapsis de las neuronas de CA1 y CA3 del hipocampo (136-142) y también con la reducción en la proliferación celular, del contenido de factores neurotróficos derivados del cerebro (136, 143), en la neurogénesis y del volumen del hipocampo (108, 136, 144) aunado a alteraciones en los sistemas de neurotransmisión (145). Las diferencias encontradas en los procesos de aprendizaje y memoria espacial entre los machos y las hembras EP pueden deberse a las diferencias estructurales y en la inducción de la LTP del hipocampo (93, 146, 147). La reducción de las dendritas en la

región CA1 está ligada a la reducción de la potenciación a largo plazo hipocampal (LTP) y de las subunidades de los receptores NMDA (39, 148, 149). Asimismo, pueden existir factores que estén influenciando los resultados en los diferentes estudios, por ejemplo: la cepa de ratas, el tipo de estrés materno, el tipo de prueba cognitiva; en el caso de las pruebas realizadas con el laberinto acuático de Morris puede estar influyendo: el diseño de la prueba dentro del laberinto, el diámetro de la piscina, el número de sesiones de aprendizaje, el número de días de prueba y la temperatura del agua utilizados en los diferentes protocolos de investigación (39, 149).

2.5. Estimulación posnatal en los animales EP

Se ha reportado que la estimulación posnatal durante las 3 primeras semanas de vida previene los cambios conductuales observados en los animales EP (150). Los animales EP que fueron estimulados posnatalmente (breve separación materna) presentan incremento en la conducta exploratoria en una situación novedosa y a su vez presentan reducción en la secreción de CORT durante la respuesta de estrés (151). A su vez, la estimulación posnatal revierte la reducción en la proliferación celular dentro del proceso de la neurogénesis hipocampal, que trae como consecuencia la mejora en el aprendizaje espacial dentro del laberinto acuático, mismo que pudo ser observado en animales de edad avanzada (152).

3. Planteamiento del problema

Si bien se han demostrado los efectos del estrés prenatal sobre el aprendizaje y la memoria espacial, la neurogénesis hipocampal y la actividad del eje adrenal de la

descendencia, aún no se han realizado un trabajo donde se analicen en conjunto los parámetros anteriormente mencionados en la descendencia de ambos sexos sumados a la aplicación de la estimulación posnatal de largo plazo.

4. Justificación

Se ha establecido que el estrés prenatal afecta la actividad del eje adrenal, deteriora el aprendizaje y la memoria espacial y está asociado a la disminución de la neurogénesis en la etapa adulta. También se ha reportado que la estimulación posnatal regula la actividad del eje adrenal e incrementa la neurogénesis, el aprendizaje y la memoria. Actualmente no existen reportes que relacionen los efectos del estrés prenatal y de la estimulación posnatal sobre el aprendizaje, la memoria, la neurogénesis hipocampal y la actividad del eje adrenal en la descendencia de ambos sexos.

Por lo anterior en este trabajo se evaluó el efecto de la estimulación táctil posnatal de largo plazo sobre el aprendizaje, la memoria espacial, la neurogénesis adulta y la actividad del eje adrenal en ratas adultas de ambos sexos estresados prenatalmente.

5. Pregunta de Investigación

¿De qué forma la estimulación táctil posnatal de largo plazo influye en el aprendizaje, la memoria espacial, la neurogénesis y la actividad del eje adrenal de las ratas adultas de ambos sexos estresadas prenatalmente?

6. Hipótesis

La estimulación táctil posnatal de largo plazo revertirá las deficiencias en el aprendizaje y la memoria de tipo espacial asociadas a una disminución de la neurogénesis causadas por el estrés prenatal en ratas adultas de ambos sexos.

7. Objetivo General

Determinar los efectos de la estimulación táctil de largo plazo sobre el aprendizaje, la memoria espacial y la neurogénesis (sobrevivencia y diferenciación al linaje neuronal) en el hipocampo en las ratas adultas de ambos sexos estresadas prenatalmente.

8. Objetivos Particulares

- Determinar el efecto del estrés por inmersión en agua fría sobre la actividad del eje adrenal de las ratas gestantes.
- Evaluar los efectos de la estimulación táctil de largo plazo sobre el aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris en ratas control y estresadas prenatalmente.
- Determinar el efecto de la estimulación táctil de largo plazo, el estrés prenatal, el aprendizaje y la consolidación de la memoria del laberinto acuático de Morris sobre la sobrevivencia y diferenciación a neuronas de las células nuevas en el giro dentado del hipocampo de la rata macho y hembra.

- Evaluar el efecto de la estimulación táctil de largo plazo y el estrés prenatal sobre la actividad del eje adrenal después de la exposición a la prueba del laberinto acuático de Morris.

9. Diseño Experimental

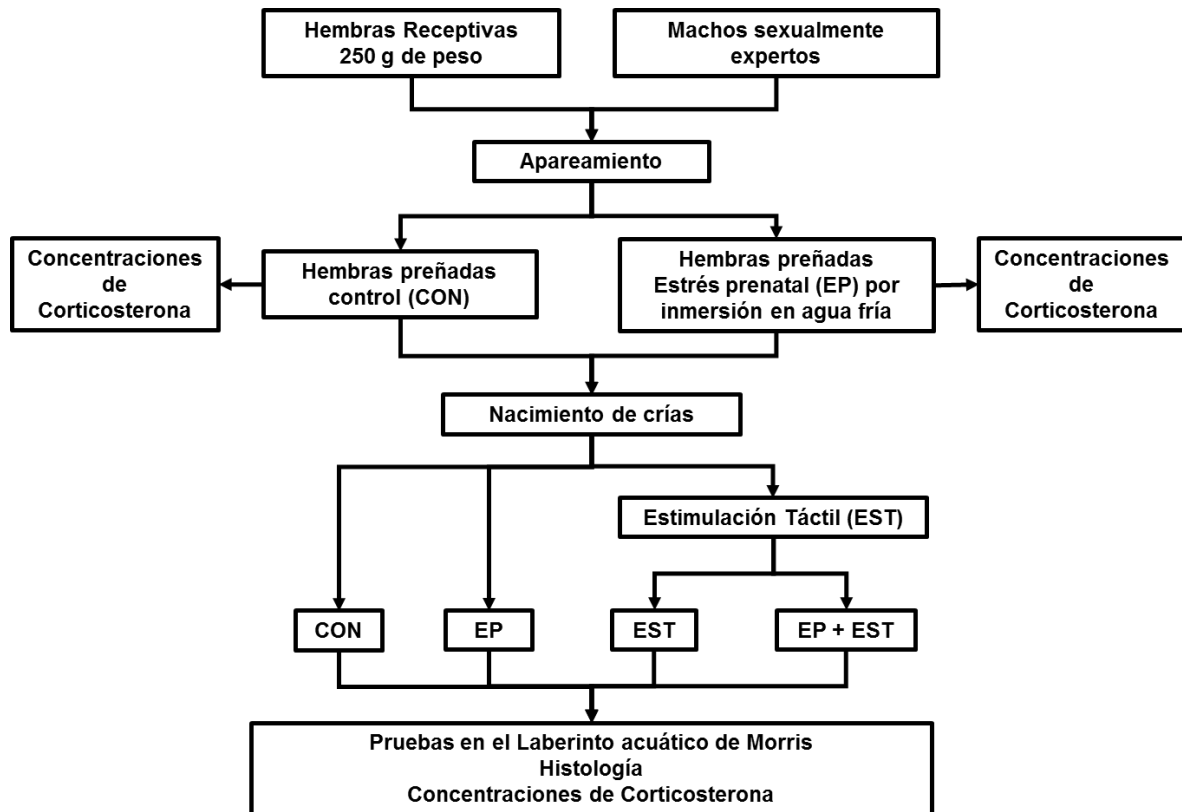


Fig. 6. Diseño experimental

9.1. Materiales y Métodos

9.1.1. Animales

El manejo y la experimentación con los animales se sujetaron a la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999), así como a la reglamentación de animales

domésticos y de laboratorio, publicado en los “Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud” (Mayo 2010).

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar (*Ratus Novergicus Albinus*) obtenidas del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa y que permanecieron dentro del mismo durante todos los procedimientos experimentales. Los animales permanecieron a temperatura constante ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), en un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 horas (inicio de la fase de luz a las 9 am), con agua y alimento *ad libitum*. En diferentes días las ratas hembra (n=33) en estro natural de 250 g de peso copularon con machos sexualmente expertos (n=6) de 300 g de peso, a los cuales se les permitió eyacular de dos a tres veces. El día de apareamiento se consideró como el día uno de gestación. Las hembras fueron asignadas al azar a los grupos control (CON n=15) y estrés prenatal (EP n=18) y fueron colocadas individualmente en cajas de plexiglás transparente donde permanecieron durante todo el proceso de gestación, nacimiento y crecimiento hasta el destete (día 21 de vida posnatal).

9.1.2. Estrés Prenatal

Durante la última semana de gestación (día 15 al 21), las hembras gestantes asignadas al grupo de EP, fueron sometidas a dos sesiones de estrés por inmersión en agua fría a las 10 y 15 horas (108). Las ratas fueron colocadas individualmente en cajas de plexiglás llenas de agua a una temperatura de 15°C y una altura de 15 cm

por 15 min en cada una de las sesiones de estrés. La caja fue cubierta con una reja para evitar el escape de las ratas. Las hembras gestantes del grupo CON se mantuvieron en sus cajas y solo recibieron la limpieza de rutina. El número de crías fue homogenizada en número dentro de su respectivo grupo experimental (CON y EP n=10) y permanecieron con sus madres hasta el momento del destete y posterior sexado. Las crías fueron distribuidas en los diferentes grupos: hembras, CON (n=55) y EP (n=50); machos CON (n=54) y EP (n=53).

9.1.3. Estimulación Táctil Posnatal

Las crías asignadas a la estimulación táctil posnatal (EST) fueron: hembras CON con estimulación táctil posnatal (EST), n=26; hembras EP con estimulación táctil posnatal (EP+EST), n=25; machos CON con estimulación táctil posnatal (EST), n=25; machos EP con estimulación táctil posnatal (EP+EST), n=25. La estimulación táctil posnatal consistió en deslizar los dedos sobre el dorso de cada uno de los animales por 60 segundos; este procedimiento se realizó cada día entre las 10 y las 11 am, desde el primer día de vida hasta los tres meses posnatales.

9.1.4. Prueba de Navegación Espacial

La capacidad de aprendizaje y la consolidación de la memoria de la información espacial de las ratas fueron evaluadas usando la prueba del laberinto acuático de Morris (LAM).

9.1.4.1. Instrumentación

El LAM consiste de una piscina circular de color verde oscuro (170 cm de diámetro y 50 cm de altura) llena de agua con una profundidad de 30 cm a una temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ rodeada por 4 paredes de color blanco, en las cuales se colocaron imágenes de colores llamativos en tres de ellas; estas imágenes cumplieron la función de pistas espaciales durante todas las pruebas. La piscina se dividió en cuatro cuadrantes imaginarios a los que se les asignó nombre de los puntos cardinales (noreste NE, noroeste NO, sureste SE y suroeste SO) tomando como referencia la zona de acceso al laberinto. Se colocó una plataforma de acrílico transparente (19 cm x 22 cm) que permaneció sumergida 2 cm por debajo de la superficie del agua en el cuadrante NE y equidistante del centro y de la pared de la piscina.

Se registró la latencia de escape que es el tiempo que tardan las ratas en nadar para encontrar la plataforma sumergida. En las pruebas en las que se retiró la plataforma de la piscina se evaluó: el tiempo de permanencia en el cuadrante donde se encontraba la plataforma, que es el tiempo de nado dentro del cuadrante NE y el número de cruces, que son las veces que el animal pasó sobre la zona específica donde anteriormente estaba la plataforma durante la fase de aprendizaje. El tiempo de duración máxima para cada prueba fue de 60 s.

9.1.4.2. Fase de Aprendizaje

La fase de aprendizaje consistió de cuatro sesiones por día para cada animal durante cuatro días consecutivos (día 1 a 4). En la primera sesión las ratas fueron

liberadas dentro del laberinto en el cuadrante SE, cambiando de cuadrante en cada sesión. Los animales fueron colocados y liberados sobre la superficie del agua con la cabeza apuntando hacia la pared de la piscina. Las ratas que no encontraron la plataforma dentro del tiempo establecido fueron dirigidas por el experimentador hacia la misma sobre la superficie del agua, dejándolas sobre ella por un periodo de 30 s (153), este procedimiento sólo se realizó en la primera sesión. En las demás sesiones, los animales que encontraron la plataforma se les permitió permanecer sobre ella por 30 s.

9.1.4.3. Fase de memoria

La memoria de corto plazo se evaluó el día 6 (48 horas después de finalizada la fase de aprendizaje) y la memoria de largo plazo se evaluó el día 13 (7 días después de finalizada la fase de aprendizaje) con una sola sesión en el LAM por animal.

El día 7 (72 horas después de finalizada la fase de aprendizaje) los animales realizaron una sesión sin la plataforma en las que las ratas permanecieron el tiempo máximo (60 s) y la prueba fue videograbada.

9.1.5. Administración del marcador de síntesis de ADN (BrdU)

A las ratas hembras (n=4) y machos (n=4) de cada grupo experimental fueron inyectados diariamente el marcador de síntesis de ADN 5'-2' bromodeoxiuridina (BrdU Sigma, USA, 50 mg/kg) por vía intraperitoneal disuelta en NaCl al 0.9% dos minutos antes de la primera sesión en el LAM, en los días 1- 4 de la fase de aprendizaje (108,

154). Para determinar la sobrevivencia y el fenotipo de las células nuevas los animales fueron sacrificados 14 días después de la última inyección de BrdU.

9.1.6. Inmunofluorescencia

El día después de la última sesión en el LAM (día 14), las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (Pisabental, México, 100 mg/kg) y perfundidos intracardiamente usando 100 mL de buffer de fosfatos (PBS), pH=7.4 seguidos de 200 mL de paraformaldehído al 4% en PBS y posteriormente se extrajeron los cerebros. Se realizaron cortes coronales de 40 μ m en un Criostato Leica CM1850 y se colectaron en solución amortiguadora de fosfatos PBS.

Para determinar el número de células nuevas y las que se diferencian a neuronas, se realizó doble inmunotinción para BrdU y NeuN. NeuN es una proteína nuclear específica que se expresa en la mayoría de los tipos celulares neuronales en el SNC de los vertebrados (46). Se seleccionaron 4 cortes no seriados de cada animal que fueron enjuagadas en Buffer de trifosfatos (TBS), después fueron lavadas en una solución de TBS más borohidrato de sodio (0.5%) por 15 min. Posteriormente fueron lavadas repetidamente en TBS, seguido por un lavado por 30 min en TBS con Tritón X-100 (1%, JT Baker, USA) y peróxido (1%, JT Baker, USA), después se lavó con TBS más Dimetil Sulfóxido (DMSO, 1%, JT Baker, México) por 10 min. Los cortes fueron lavados tres veces por 10 min cada uno. Posteriormente las secciones se incubaron en HCl 2N durante una hora a 37 °C y después se lavaron con TBS y borohidrato de sodio (0.5%) por 15 min; seguido de otros 3 lavados en TBS de 10 min cada uno. Las

secciones fueron preincubadas en una solución de albúmina 0.1% (10%) y Tritón X-100 (0.3%) por 30 min. Enseguida, se agregó el anticuerpo primario Anti-BrdU (1:800; BD, Biosciences, USA) junto con el anticuerpo primario Anti-NeuN (1:250, Millipore, USA). Los cortes se incubaron por al menos 48 horas y bajo agitación constante. Los cortes se lavaron 5 veces en TBS con Tritón X-100 (0.02%) y albumina 0.1% (1%) por 15 min cada uno y al finalizar se incubaron por 2 horas bajo agitación constante con los anticuerpos secundarios anti rata IgG Alexa Fluor 488 (1:1100; Invitrogen, USA) y anti ratón IgG Alexa Fluor 568 (1:1100; Invitrogen, USA) en solución de albúmina al 0.1% y Tritón X-100 (0.32%). Finalmente, los cortes se montaron en portaobjetos y se cubrieron con medio de montaje AquaPoly/Mount (Polysciences, USA). Los cortes se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 700 (Alemania) con un objetivo 20x. Las células positivas a BrdU fueron contadas en la capa granular y la zona subgranular del giro dentado (GD) del hipocampo dorsal de ambos hemisferios cerebrales con ayuda del software Zeiss LSM Image Examiner. El doble marcaje de las células se confirmó con el corte ortogonal.

9.1.7. Concentraciones de CORT

Las muestras de sangre de las ratas gestantes (CON, n=6; EP, n=6) fueron obtenidas inmediatamente después de la exposición al estresor en el día 18 de gestación. Las muestras de sangre de la descendencia (CON n=6, EST n=6, EP n=6, EP+EST n=6) fueron obtenidas al final de la prueba del LAM. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (100mg/kg; Pisabental, México) y las muestras fueron extraídas por punción cardíaca en tubos de ensaye y centrifugadas a 3000g

durante 25 min a temperatura ambiente. El suero fue congelado a -20°C para la subsecuente determinación de CORT.

9.1.7.1. Extracción de CORT

La CORT fue extraída del suero en 5 ml de dietil-diclorometano (60:40 v/v) por agitación en un vórtex e inmediatamente centrifugados por 5 min. El sobrenadante (fase orgánica) fue mezclado en un vórtex con 1 ml de agua grado-HPLC. Después de la centrifugación, el sobrenadante (fase orgánica, 3 ml) se dejó evaporar a temperatura ambiente. Los residuos se resuspendieron con una mezcla de metanol-agua (60:40 v/v).

9.1.7.2. Procedimiento cromatográfico

La precolumna (Symmetry C18, tamaño de partícula 3.5 μ m, 2.1X10 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA) y la columna fueron equilibradas con una mezcla de agua grado HPLC-acetonitrilo (65:35 v/v) a un flujo de 0.4 ml/min. Las separaciones fueron hechas a una temperatura de 40°C, en una columna Waters Symmetry C18 (tamaño de partícula 5 μ m; tamaño de columna 2.0X150 mm; Waters Corp., USA). Para bombear la fase móvil se utilizó un sistema controlador marca Waters 600-MS.

Los esteroides se evaluaron con un detector de absorbancia UV visible (λ =250 nm; Waters Corp., Milford, MA, USA). Los resultados fueron analizados con una estación de trabajo Milenium 32 (Waters Corp., Mildford, MA, USA).

9.2. Análisis Estadístico

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el paquete estadístico SPSS. Las pruebas en el LAM se analizaron con ANOVA de medidas repetidas. El análisis de permanencia dentro del cuadrante, el número de cruces, el promedio de las latencias y las concentraciones de CORT se realizó con una ANOVA de una vía. Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizó la prueba post hoc de Newman-Keuls. El número de células marcadas con BrdU se analizó con una ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida por la prueba de Dunn. Las diferencias en la proporción de células marcadas con BrdU y BrdU/NeuN se analizaron con la prueba de Chi cuadrada. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

10. Resultados

10.1. Concentraciones séricas de CORT en las ratas hembra gestante estresadas.

La concentración sérica de CORT en las hembras gestantes estresadas en el día 18 de gestación fue superior al doble en comparación con las hembras gestantes asignadas al grupo CON en el día 18 de gestación ($P < 0.01$) (Fig. 7).

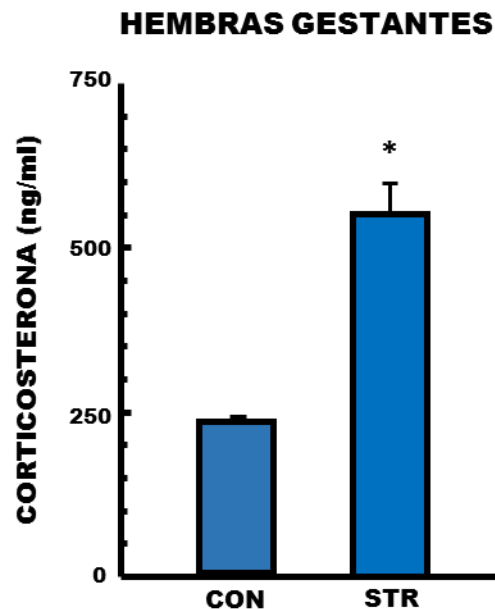


Fig. 7. Concentraciones séricas de corticosterona en las ratas gestantes expuestas a estrés (STR) en la última semana de gestación. Se muestran los datos obtenidos al día 18 después de la cópula. Las hembras gestantes estresadas por inmersión en agua fría presentaron concentraciones séricas de corticosterona mucho mayores que las hembras control. (CON: control; STR: estrés). Datos mostrados como la media \pm E.E.M. * $P < 0.01$ comparado con el grupo CON.

10.2. Aprendizaje y la memoria espacial

En la prueba del LAM los animales CON de ambos sexos obtuvieron menores tiempos de llegada a la plataforma escondida (latencia de escape) conforme transcurrieron los días de prueba. El menor tiempo obtenido en los días 1 a 4 de aprendizaje refleja la mejor capacidad de ubicación que adquirieron los animales dentro del laberinto. Los animales aprendieron a llegar a la plataforma más rápido con ayuda de las pistas espaciales. En los días 6 y 13 donde se evaluó la memoria de corto plazo y largo plazo respectivamente con un solo ensayo dentro del laberinto, los animales CON ubicaron rápidamente a la plataforma, es decir, recordaron la ubicación exacta de la misma en un menor tiempo. Por otro lado, las hembras y los machos EP tuvieron latencias de escape mayores en los días 1 a 4, 6 y solo los machos EP en el día 13 comparados con los animales CON (hembras: $F_{3, 169}=7.99$; $P<0.000297$; machos: $F_{3, 174}=41.25$; $P<0.000289$) (Fig. 8). Las ratas EST y EP + EST de ambos sexos obtuvieron latencias de escape similares a las obtenidas por los animales de los grupos CON. El promedio de las latencias de escape de todos los días de prueba fue mayor en los animales EP de ambos sexos ($P< 0.001$) (Fig. 9).

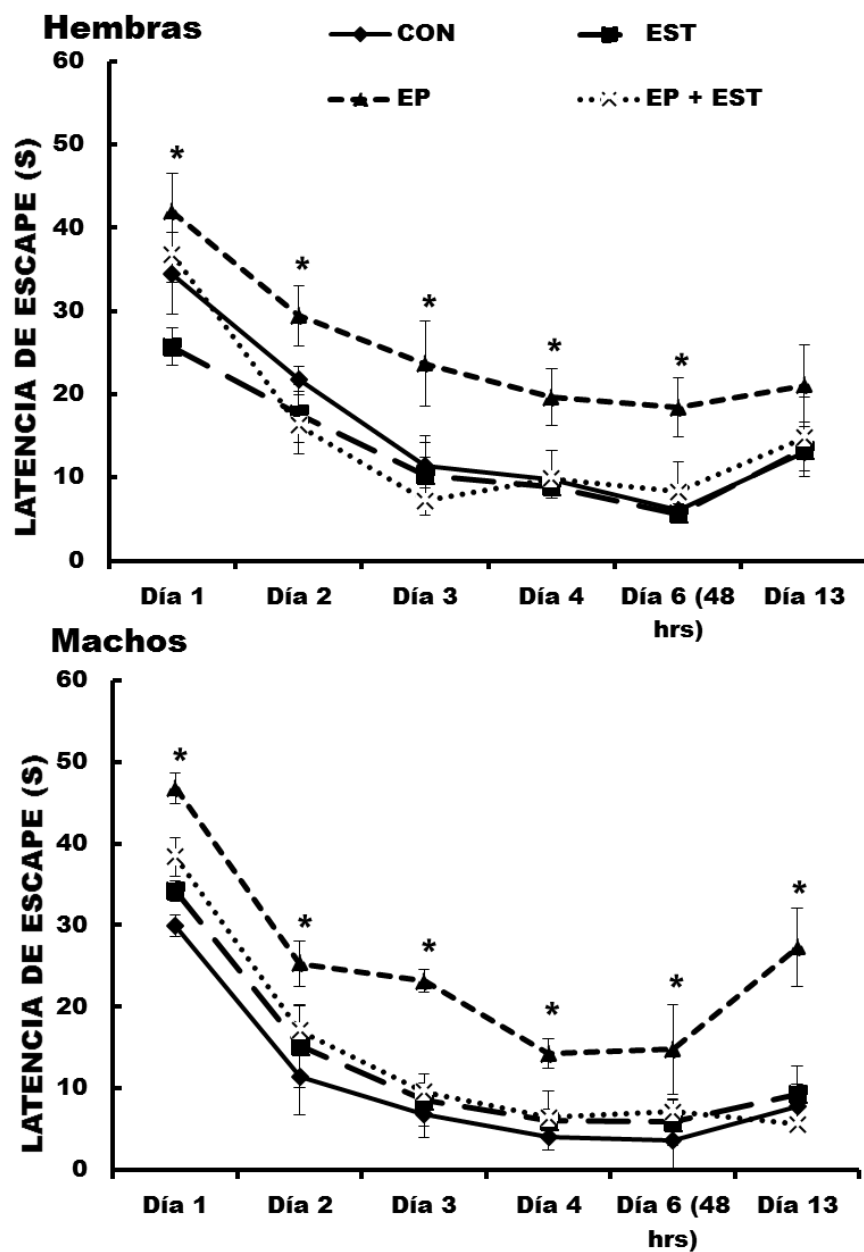


Fig. 8. Latencias de escape en el laberinto acuático de Morris en hembras (panel superior) y machos (panel inferior) CON, EP, EST y EP+EST. En Los días 1 a 4 se evaluó el aprendizaje, la memoria de corto plazo se evaluó el día 6 y la memoria de largo plazo se evaluó el día 13. Las hembras y los machos EP mostraron latencias de escape significativamente mayores en los días 1 a 4 y 6. En el día 13, sólo los machos EP mostraron latencias mayores. Datos mostrados como la media \pm E.E.M. * $P < 0.01$ comparado con el grupo CON.

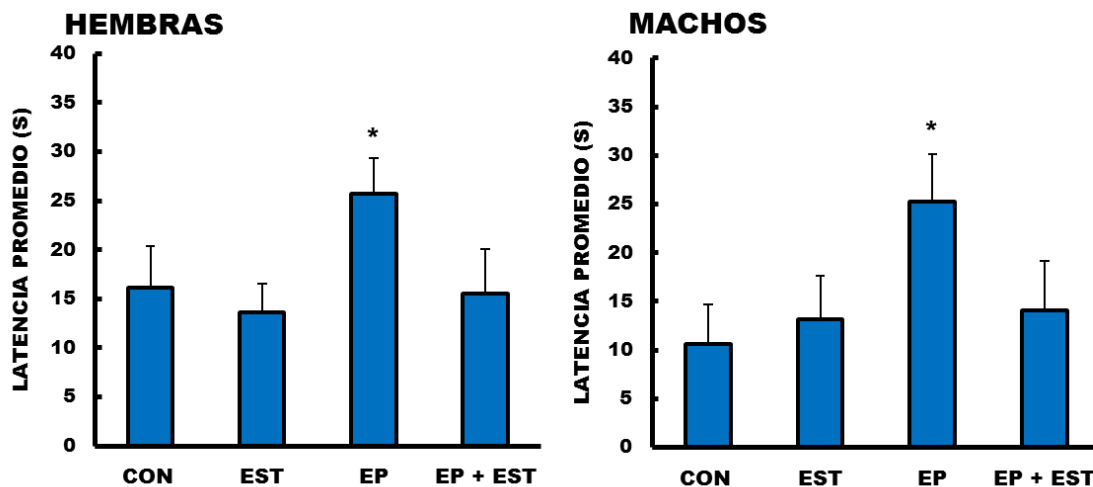


Fig. 9. Latencias promedio de escape en hembras y machos control (CON), estresados prenatalmente (EP), con estimulación táctil (EST) y estresados prenatalmente y con estimulación táctil (EP+EST). Tanto las hembras como los machos EP mostraron que las latencias de escape promedio fueron significativamente mayores comparadas con el resto de los grupos experimentales. Datos mostrados como la media \pm E.E.M. * $P < 0.01$ comparado con el grupo CON.

En el día 7 de prueba los animales realizaron una sola sesión dentro del LAM en la cual se retiró la plataforma y permanecieron el tiempo máximo asignado (60s); las sesiones fueron videograbadas para contar el número de cruces y evaluar el porcentaje de tiempo total de permanencia dentro del cuadrante donde estaba la plataforma durante las sesiones de aprendizaje. Las hembras ($F_{3, 31} = 9.05$ $P < 0.000203$) y los machos ($F_{3, 40} = 14.40$ $P < 0.000$) de los grupos experimentales EST, EP y EP + EST permanecieron un menor porcentaje del tiempo total en el cuadrante donde estuvo la plataforma en comparación con los animales CON (Fig. 10). Asimismo, las hembras EP ($F_{3, 31} = 6.80$ $P < 0.001242$) y los machos EP y EST

cruzaron menor número de veces en la zona donde se encontraba la plataforma (F3, 40= 5.19 $P < 0.004091$) (Fig. 10).

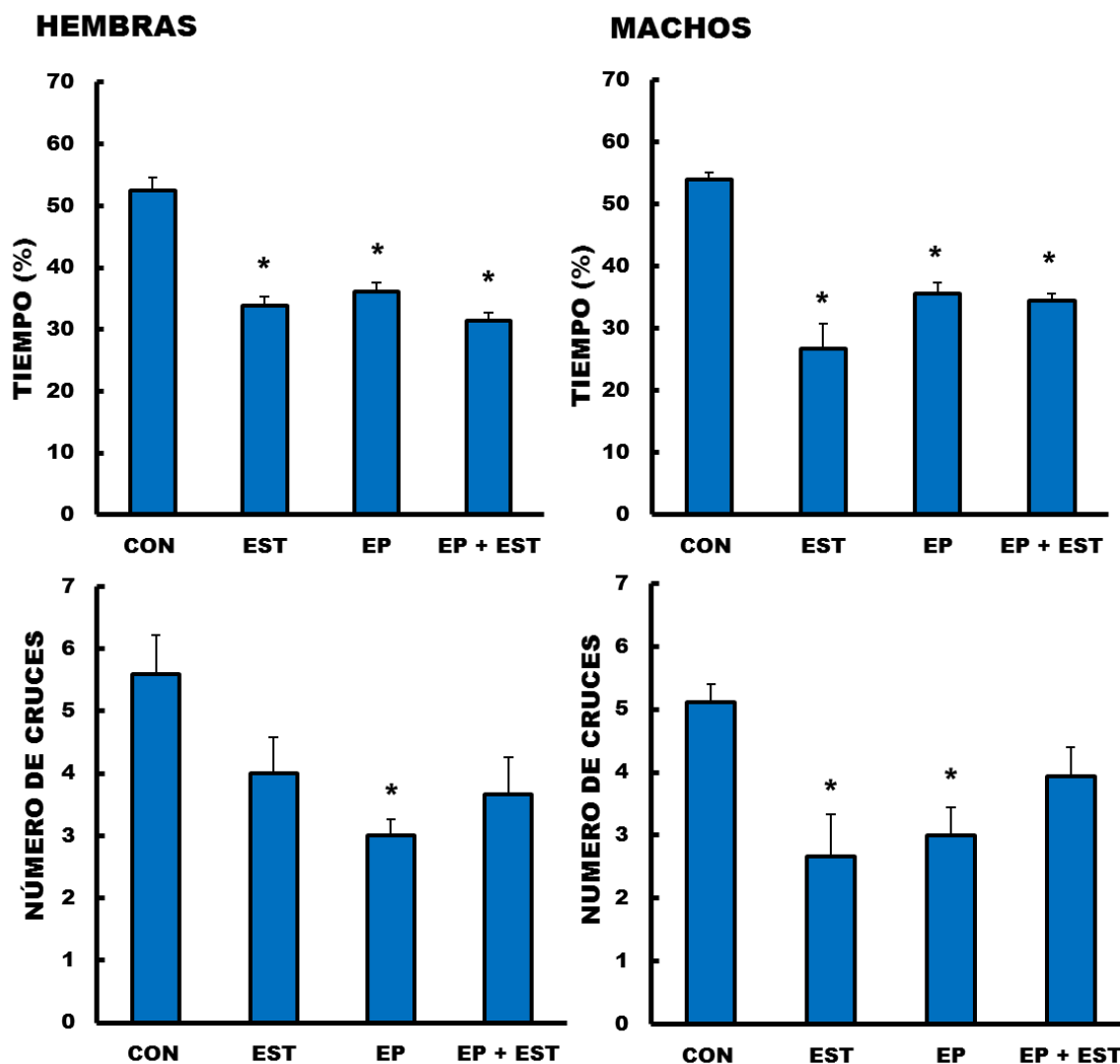
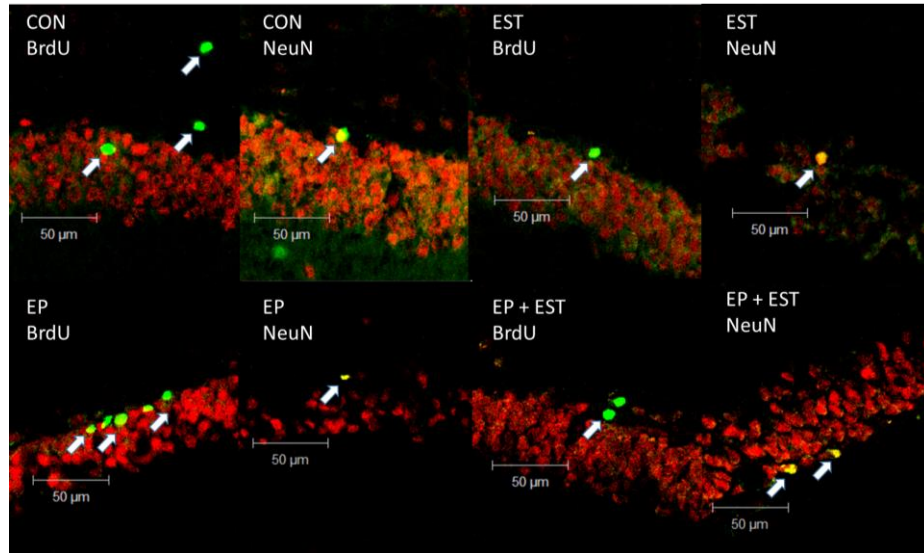


Fig. 10. Porcentaje de tiempo de permanencia y número de cruces evaluados en el día 7 de prueba en el LAM. Las ratas hembras y machos de los grupos EST, EP y EP+EST permanecieron un porcentaje de tiempo menor en el cuadrante donde se encontraba la plataforma en comparación con los animales CON. Las hembras EP y los machos EP y EST cruzaron menor número de veces sobre el sitio de la plataforma. Datos mostrados como la media \pm E.E.M. * $P < 0.01$ comparado con el grupo CON.

10.3. Neurogénesis en el hipocampo

Las células positivas a BrdU (ir-BrdU) en la capa subgranular del GD fueron evidenciadas por inmunofluorescencia como pequeñas marcas circulares en la longitud de onda verde, 488 nm (Fig. 11). La sobrevivencia celular (número de células ir-BrdU por mm²) fue menor en las hembras EST en comparación con las del grupo CON. Una mayor sobrevivencia fue observada en el hipocampo de las hembras EP ($P < 0.001$) comparadas con las hembras CON, EST y EP+EST (Fig. 12). En el hipocampo de los machos de los grupos EST y EP+EST se observó menor sobrevivencia al compararlos con los machos de los grupos CON y EP ($P < 0.001$) (Fig. 12).

HEMBRAS



MACHOS

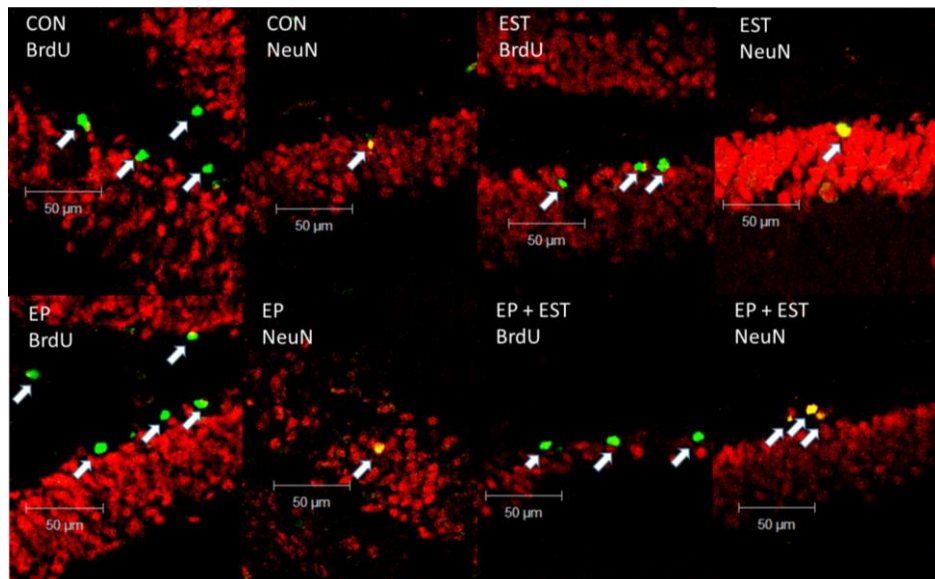


Fig. 11. Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia para detectar a las células ir-BrdU e ir-BrdU/NeuN en el giro dentado (GD) del hipocampo, obtenidas con microscopía confocal a 20x. Los núcleos de las células fluorescentes ir-BrdU se observaron verde; Los núcleos fluorescentes de las células ir-NeuN se observaron en rojo; La doble tinción de BrdU/NeuN en los núcleos se observó en amarillo.

Las nuevas neuronas fueron identificadas usando el doble marcaje BrdU/NeuN (ir-BrdU/NeuN) y se identificaron como pequeños círculos en la longitud de onda 550nm (Fig. 5). El hipocampo de las hembras EP + EST presentaron mayor número de neuronas nuevas en comparación con los otros grupos experimentales ($P < 0.01$). No se observó una disminución en el número de neuronas nuevas en las hembras EP. Los hipocampos de los machos EP mostraron un menor número de neuronas nuevas en comparación con los machos CON, EST y EP + EST. Se observó un número mayor de neuronas nuevas en los hipocampos de los machos EP + EST ($P < 0.000$) (Fig. 6).

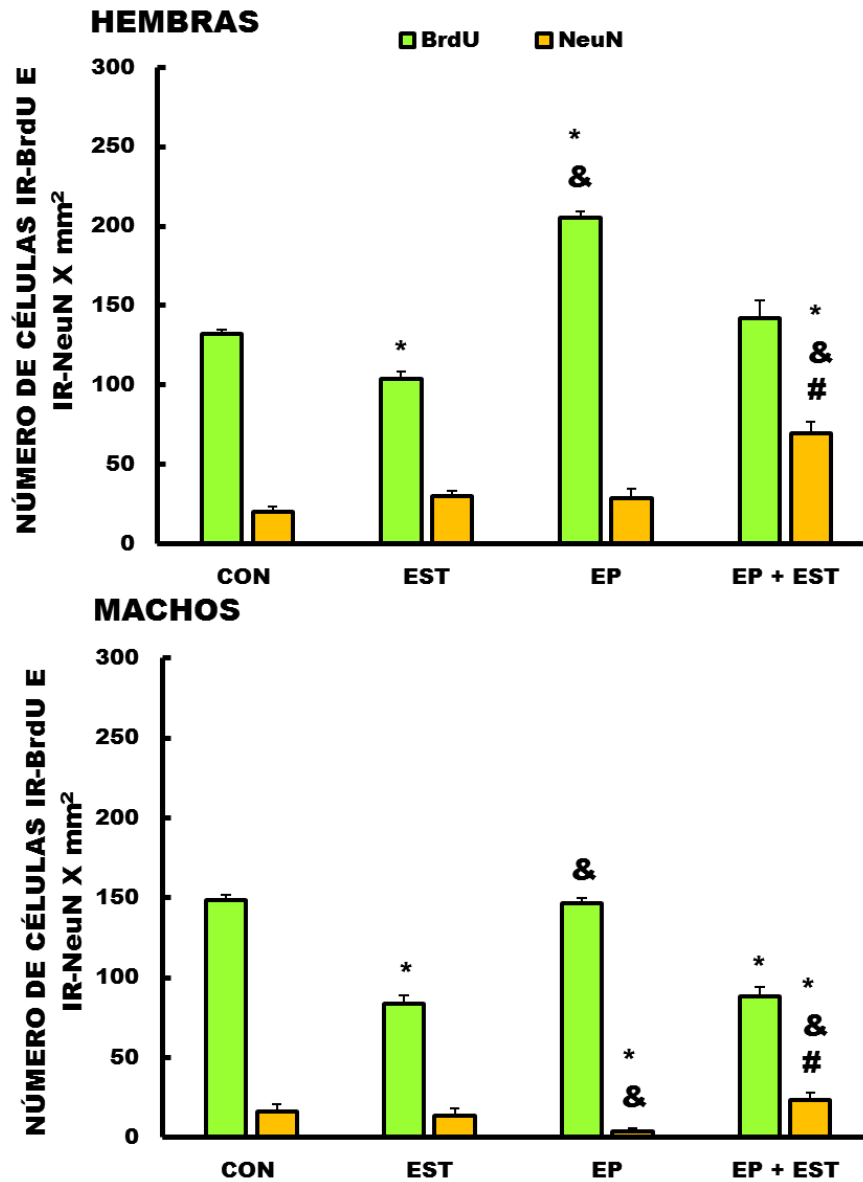


Fig. 12. Sobrevivencia celular y diferenciación en el GD del hipocampo en animales control (CON), estresados prenatalmente (EP), estimulados táctilmente (EST) y estresados prenatalmente y estimulados táctilmente (EP+EST). La sobrevivencia celular fue significativamente menor en los animales EST de ambos sexos, $P < 0.001$. El EP generó incremento en la sobrevivencia de las células nuevas en las hembras y causó disminución en el número de neuronas nuevas en los machos. En los machos EP + EST disminuyó la sobrevivencia celular pero incrementó el número de neuronas nuevas en ambos sexos. Datos mostrados como la media \pm E.E.M. * $P < 0.001$ comparado con el grupo CON; & $P < 0.001$ comparado con el grupo de EST; # $P < 0.001$ comparado con el grupo de EP.

10.4. Concentraciones séricas de CORT en la descendencia al final de las pruebas en el LAM

Las concentraciones séricas de corticosterona fueron mayores en las hembras y los machos EP después de la prueba del LAM en comparación con los CON ($P < 0.01$). Las ratas EST mostraron menores concentraciones séricas de CORT en comparación con el resto de los grupos experimentales ($P < 0.05$) (Fig. 13).

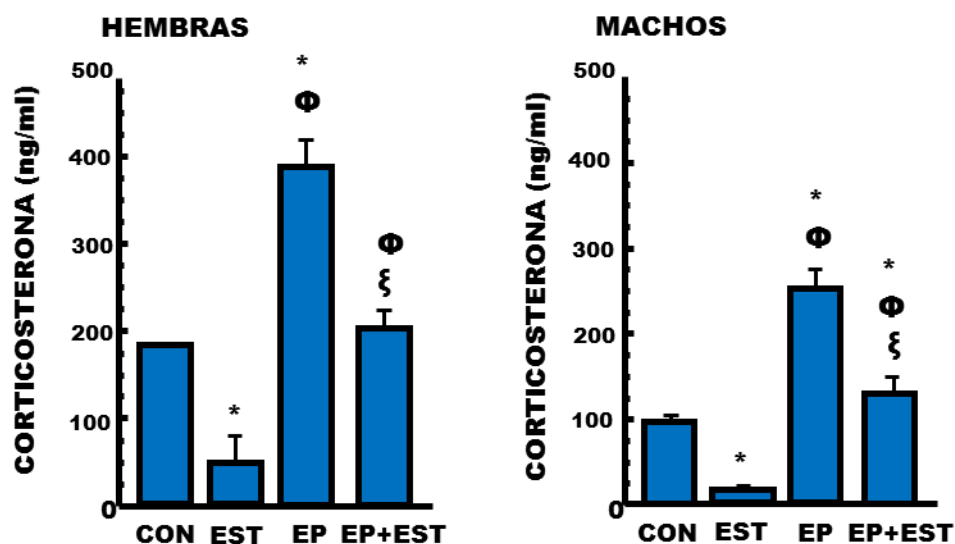


Fig. 13. Concentraciones séricas de CORT en las ratas hembras y machos control (CON), estresados prenatalmente (EP), estimulados táctilmente (EST) y estresados prenatalmente y estimulados táctilmente (EP+EST). Las mayores concentraciones de CORT se observaron en los animales EP de ambos sexos. Los animales con EST presentaron las menores concentraciones de la hormona. Los animales EP con EST tuvieron niveles séricos similares a los CON. Datos mostrados como la media \pm E.E.M. * $P < 0.05$ comparado con el grupo CON; $\Phi P < 0.01$ comparado con el grupo de EST; $\xi P < 0.05$ comparado con el grupo de EP.

11. Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el estrés prenatal causa deterioro del aprendizaje y la memoria espacial. Sin embargo, la sobrevivencia de las células nuevas en el GD aumenta en las hembras y en los machos no se modifica. Además, la reactividad del eje HHA en las ratas EP se incrementa significativamente en la etapa adulta. La estimulación táctil aplicada desde el nacimiento hasta la edad de tres meses es capaz de prevenir los efectos dañinos del EP sobre el aprendizaje y la memoria, además de incrementar la diferenciación neuronal de las células nuevas en el GD y disminuir la reactividad del eje HHA en ratas de ambos sexos. En este estudio se observó que el estrés por inmersión en agua fría incrementa al doble las concentraciones séricas de CORT en las hembras gestantes en el día 18 de gestación, en comparación con las hembras preñadas no estresadas. A diferencia de los efectos del estrés por inmovilización aplicado a hembras gestantes (155), las concentraciones séricas de CORT de las hembras en este estudio son casi del doble. Por lo anterior, el deterioro en la cognición en la descendencia de ambos sexos se puede atribuir a la exposición de los fetos a las altas concentraciones de CORT registrados en las hembras gestantes de este estudio, a diferencia de otros reportes donde sólo se observa en los machos (155). En las evaluaciones del aprendizaje espacial en el LAM se observaron latencias de escape mayores obtenidas por los animales EP de ambos sexos; esto implica un lento aprendizaje de la prueba, así como problemas de memoria de corto y largo plazo. Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de otros estudios donde se reporta que solo los machos son afectados por el EP (108, 149, 155, 156) y apoyan el hecho de que el EP afecta tanto a los machos como a las

hembras (107, 136, 157). Se ha reportado que las diferencias de los efectos del EP entre sexos se atribuyen al efecto neuroprotector de los estrógenos en las hembras (155), los cuales podrían estar atenuando los efectos del EP. Sin embargo, en este estudio no se corrobora esta hipótesis, pues las hembras EP presentaron las mismas deficiencias en el aprendizaje espacial que los machos. Asimismo, es posible que la disminución en la longitud y complejidad de la red neuronal en las regiones hipocampales CA1, CA3 y GD pudiera sumarse a la disminución en el número de neuronas en el hipocampo, como se ha reportado en animales EP en otros estudios (39, 140-142). Otro factor en el deterioro de la capacidad cognitiva de los animales EP por inmersión en agua fría podría ser la hiper-reactividad del eje HHA que se observó después de la prueba en el LAM. Se ha demostrado que la hiperreactividad e hiperactividad del eje adrenal observadas en los animales EP está asociada con la disminución en el número de receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) en el hipocampo (128, 129). Por lo anterior, se puede suponer que las altas concentraciones de CORT observadas en los animales EP al final de las pruebas en el LAM son resultado de la hiperreactividad del eje HHA, ocasionada por la disminución de los receptores GR y MR en el hipocampo. Las altas concentraciones de CORT en los animales EP al final de las pruebas en el LAM indican que no existió una habituación a la misma. Esto sugiere que la prueba siempre fue una situación novedosa y estresante para estos animales. Las altas concentraciones de CORT durante la respuesta de estrés pueden interferir con el aprendizaje espacial (158) y obstaculizar la recuperación de la información almacenada (159, 160). Probablemente este efecto sea más evidente en los machos EP ya que en la última

sesión en el LAM no llegaron a la plataforma, es decir la memoria de largo plazo se encuentra deteriorada en los machos por efecto del EP, a diferencia de las hembras EP, que sí llegaron a la plataforma. Esto podría explicarse por algún efecto neuroprotector de los estrógenos durante los días posteriores al proceso de aprendizaje.

Las alteraciones en la sobrevivencia y la diferenciación de las nuevas células en el GD es otro aspecto que puede estar contribuyendo en las alteraciones cognitivas en la descendencia EP por inmersión en agua fría. El déficit en el desempeño en el LAM en los machos y las hembras EP no parece deberse a cambios en la sobrevivencia de las células nuevas en el GD, ya que ésta no disminuyó, incluso se incrementó en las hembras. En los machos EP, el bajo desempeño cognitivo podría estar asociado a la disminución en la diferenciación de las células nuevas a neuronas. A diferencia de este trabajo, en un estudio anterior se observó que ratas machos EP por inmovilización y que no ejecutaron deficientemente la prueba en el LAM, presentaron disminución en la sobrevivencia de células nuevas en el GD, así como nulo efecto sobre el porcentaje de células nuevas que se diferenciaron a neurona (132), probablemente estas diferencias en los resultados pueden atribuirse a los distintos estresores utilizados, así como en el protocolo utilizado para evaluar la neurogénesis y en la prueba del LAM. En este estudio la neurogénesis se evaluó en ratas que realizaron la prueba de aprendizaje espacial y se observó que el EP por inmersión en agua fría disminuye de la diferenciación de las células nuevas en el GD de las ratas macho, pero no modifica la sobrevivencia de las células nuevas. Estos

resultados difieren de lo reportado anteriormente en relación a que la neurogénesis no se incrementa en los animales EP después del aprendizaje espacial (108). Las diferencias con el trabajo anterior pueden deberse a los distintos protocolos de investigación, donde los animales realizaron la prueba del LAM durante 5 días consecutivos y la neurogénesis se evaluó 24 horas después del quinto día. En este trabajo los animales fueron evaluados en el LAM por cuatro días consecutivos y en los días 6, 7 y 13 después del inicio de las mismas; la neurogénesis se evaluó dos semanas después. Pero como se pudo observar, la diferenciación de las células nuevas a neuronas disminuyó significativamente en las ratas macho EP, lo que explicaría su deficiente desempeño cognitivo, porque se ha reportado que las nuevas neuronas participan activamente en el proceso cognitivo (54, 161). Asimismo, en el hipocampo de las ratas hembra EP de este estudio, se observó mayor sobrevivencia de las células nuevas en el GD después del estímulo en el LAM y la diferenciación a neurona no se vio afectada. Está reportado que en el GD de las hembras se producen más células que en el de los machos, produciendo más células durante el proestro; esas células pueden ejercer una importante influencia en la función hipocampal (162, 163). Asimismo se ha reportado que en crías de rata de ambos sexos, que fueron sometidos a isquemia por hipoxia, se observó sólo en las hembras un marcado incremento en la génesis de nuevas células, y en ambos sexos se presentó un ligero deterioro de la memoria espacial (164). Anteriormente no se había reportado el aumento en la sobrevivencia de las nuevas células dentro del GD después del EP, pero los resultados de este trabajo ratifican que la proliferación y la sobrevivencia de las nuevas células en el giro dentado del hipocampo de ratas hembras adultas no

disminuye por efecto del EP (131, 132). Es probable que las nuevas células que no se diferencian a neuronas correspondan a células de la glía, pues se ha demostrado que el EP tiene la capacidad de acelerar el desarrollo y la migración de la glía hacia diferentes regiones cerebrales (165). De esta forma, la nueva glía en el GD de las hembras EP podría estar contribuyendo con el aporte de nuevos factores neurotróficos que incrementan el crecimiento y redireccionamiento axonal de la red existente en un intento por compensar las deficiencias cognitivas (166). Sin embargo, se requiere más investigación para entender las diferencias en neurogénesis y la conducta ligada al sexo en los individuos estresados prenatalmente.

Por otro lado, los resultados de este trabajo muestran que los animales EST presentaron las concentraciones de CORT más bajas; sin embargo, su desempeño en el LAM no fue mejor en comparación con los animales CON. Esto se explica porque los bajos niveles de CORT no están relacionados con un mejor desempeño cognitivo, incluso bajos niveles del GC pueden interferir con el aprendizaje (167). Aun así, se observó que las bajas concentraciones de CORT en los animales EST de este estudio no afectaron su capacidad de aprendizaje y memoria espacial; esto probablemente por el aumento en el número de receptores para GC en el hipocampo que ha sido observado en los animales estimulados posnatalmente (69). El incremento de receptores para GC podría mejorar la memoria, ya que se ha reportado que los MR participan activamente en ella (168, 169). El modelo de EST utilizado en este estudio no afecta del desempeño cognitivo dentro del LAM en las ratas de ambos sexos y concuerda con otros estudios donde se mostró que la estimulación posnatal reduce la

latencia de llegada a la plataforma, la distancia recorrida hacia la misma (170-172). Sin embargo, los resultados de este trabajo mostraron que las ratas de ambos sexos EST, EP y los EP + EST permanecieron menor tiempo dentro del cuadrante, lo que difiere de otros reportes donde se mostró que la estimulación aumenta el tiempo de permanencia dentro del cuadrante donde se encontraba la plataforma en la fase de aprendizaje (172). Asimismo las hembras y los machos EST y los machos EP + EST cruzaron menor número de veces sobre la zona donde estaba la plataforma. Posiblemente esto se deba a que los animales estimulados táctilmente utilizan diferentes estrategias de búsqueda de la plataforma dentro del laberinto en comparación con los animales de los otros grupos. En este trabajo se observó que los animales EST nadaron dentro de toda el área del laberinto, en cambio los animales EP, al no encontrar la plataforma, nadaron en la periferia del laberinto y eventualmente escaparon del mismo (datos no mostrados). Existen reportes donde se analizaron las estrategias de búsqueda de la plataforma que demuestran que los animales EP buscan de forma azarosa la plataforma escondida y nadan largas distancias, a diferencia de los animales CON y los animales EP estimulados táctilmente, los cuales tienden a usar una estrategia de búsqueda de nado lineal directamente hacia la plataforma (136, 173). Los animales EST usaron una estrategia lineal repetidamente para tratar de encontrar la plataforma, por lo cual el tiempo dentro del cuadrante fue reducido. El uso de una estrategia lineal puede estar asociado con menores latencias de llegada a la plataforma que fueron observadas en el día 6 de prueba. Estos resultados sugieren que la estimulación táctil postnatal puede incrementar el aprendizaje espacial y la habilidad de recordar la información almacenada. El buen desempeño cognitivo en los

animales estimulados táctilmente ha sido atribuido al incremento en las ramificaciones y a la longitud de las dendritas, resultado de la estimulación postnatal (174). Los cambios estructurales debidos a la estimulación se han asociado con el aumento en la expresión de proteínas sinápticas como son la sinaptofisina, espinofilina y GluR2 (subunidad del receptor AMPA), las cuales están implicadas en la formación de sinapsis nuevas y de espinas dendríticas (175). La estimulación táctil también promueve la producción de factores tróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés), que es clave en los procesos cognitivos en el hipocampo (176). Además, la estimulación táctil podría generar en el hipocampo plasticidad sináptica de largo plazo (LTP), de la misma manera en que lo hace en la capa granular del cerebelo (177).

Con respecto a la sobrevivencia y diferenciación de las células nuevas en el GD de los animales EST. La disminución de las células nuevas que sobrevivieron y el nulo efecto sobre la diferenciación al linaje neuronal en el GD de los animales EST no afectó la ejecución en el LAM. Se ha observado que la estimulación posnatal disminuye el número de células en el Locus Coeruleus (LC) (78) y en el área preóptica medial (APM) (81). El LC es la principal agrupación de neuronas noradrenérgicas del sistema nervioso central que proyectan sus axones a regiones como el hipotálamo, la médula espinal, la corteza prefrontal y el hipocampo. Es probable que la estimulación táctil haya causado disminución en el número de neuronas noradrenérgicas del LC y a su vez disminuye la cantidad de noradrenalina en el GD del hipocampo, teniendo como resultado la disminución en la proliferación de las células nuevas (178). Sin embargo,

la disminución de noradrenalina en el GD no tiene efecto sobre la sobrevivencia y la diferenciación de las células nuevas (178), por lo cual el número de neuronas nuevas no se ve afectado. En los animales EP que fueron estimulados táctilmente se observó una disminución en la sobrevivencia de las células nuevas probablemente por la misma causa que en los animales EST, pero la diferenciación a neurona se incrementó en ambos sexos. Probablemente la estimulación táctil favoreció la rápida maduración de las células que proliferaron en el GD durante el aprendizaje, integrándose así a la red neuronal existente. Es probable que éste sea uno de los mecanismos involucrados en el eficiente desempeño de los animales EP + EST de ambos sexos en la prueba cognitiva. Adicionalmente, se ha reportado que los animales estimulados posnatalmente secretan menos CORT durante el estrés y que muestran un rápido regreso a las concentraciones basales de los mismos después de la exposición a diferentes estresores (82, 179, 180). Esto se ha atribuido al incremento en el número de receptores para glucocorticoides en el hipocampo y en la corteza prefrontal (69, 181, 182). Además el incremento en las ramificaciones, en la longitud y en la densidad de las espinas dendríticas en las regiones cerebrales implicadas en la regulación del eje HHA también podrían explicar estos resultados (174).

12. Conclusión

En este trabajo se demostró que el estrés prenatal por inmersión en agua fría deteriora el aprendizaje espacial en ratas de ambos sexos. Estas diferencias no se explican por la disminución de la sobrevivencia celular en el giro dentado, sino probablemente por la menor diferenciación al linaje neuronal. En las hembras, las

deficiencias cognitivas se deben a la hiperreactividad del eje adrenal durante las pruebas en el LAM. La estimulación táctil posnatal aplicada desde el nacimiento hasta la edad adulta puede prevenir el deterioro cognitivo disminuyendo la reactividad del eje adrenal y estimulando la diferenciación neuronal en el giro dentado de los animales estresados prenatalmente.

13. Referencias

1. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*. 2002;53(4):865-71.
2. Koolhaas J, Bartolomucci A, Buwalda Bd, De Boer S, Flügge G, Korte S, et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2011;35(5):1291-301.
3. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*. 2009;5(7):374-81.
4. Sterling P, Eyer J. *Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology*. 1988.
5. McEwen BS. Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;840(1):33-44.
6. De Wied D. Pituitary adrenal system hormones and behaviour. *Acta endocrinologica Supplementum*. 1976;214:9-18.
7. Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1992;16(2):115-30.
8. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Neuroendocrinology of stress. *Ann Rev Physiol*. 2005;67:259-84.
9. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*. 1992;267(9):1244-52.
10. Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2001;30(3):695-728.
11. Nauta WJ, Feirtag M, Donner C. *Fundamental neuroanatomy*: Freeman New York; 1986.
12. Tilders FJ, Berkenbosch F. CRF and catecholamines; their place in the central and peripheral regulation of the stress response. *Acta Endocrinologica*. 1986;113(2 Suppl):S63-S75.
13. Jezova D, Ochedalski T, Glickman M, Kiss A, Aguilera G. Central corticotropin-releasing hormone receptors modulate hypothalamic–pituitary–adrenocortical and sympathoadrenal activity during stress. *Neuroscience*. 1999;94(3):797-802.
14. Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annual review of clinical psychology*. 2005;1:607.
15. Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: the 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;851(1):311-35.
16. Bloom FE, Battenberg EL, Rivier J, Vale W. Corticotropin releasing factor (CRF): immunoreactive neurones and fibers in rat hypothalamus. *Regulatory peptides*. 1982;4(1):43-8.
17. Abou-Samra AB, Harwood JP, Catt KJ, Aguilera G. Mechanisms of action of CRF and other regulators of ACTH release in pituitary corticotrophs. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1987;512(1):67-84.
18. Horrocks P, Jones A, Ratcliffe W, Holder G, White A, Holder R, et al. PATTERNS OF ACTH AND CORTISOL PULSATILITY OVER TWENTY-FOUR HOURS IN NORMAL MALES AND FEMALES. *Clinical endocrinology*. 1990;32(1):127-34.
19. Ganong WF. The stress response—a dynamic overview. *Hospital Practice*. 1988;23(6):155-71.
20. Aguilera G, Subburaju S, Young S, Chen J. The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Progress in brain research*. 2008;170:29-39.
21. Rivier C, Vale W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. 1983.

22. Bornstein S, Chrousos G. Adrenocorticotropin (ACTH)-and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(5):1729-36.
23. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease 1. *Endocrine reviews*. 1998;19(3):269-301.
24. Ganong WF, Alpert LC, Lee TC. ACTH and the regulation of adrenocortical secretion. *New England Journal of Medicine*. 1974;290(18):1006-11.
25. Seasholtz A. Regulation of adrenocorticotrophic hormone secretion: lessons from mice deficient in corticotropin-releasing hormone. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(9):1187-8.
26. Siiteri PK, Murai JT, Hammond G, Nisker JA, Raymoure W, Kuhn RW. The serum transport of steroid hormones. *Recent progress in hormone research*. 1982;38:457-510.
27. McEwen BS, De Kloet E, Rostene W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiological Reviews*. 1986;66(4):1121-88.
28. De Kloet E. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Frontiers in neuroendocrinology*. 1991;12(2):95-164.
29. Reul J, Kloet Ed. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*. 1985;117(6):2505-11.
30. McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. 1968.
31. McEwen BS. Corticosteroids and hippocampal plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;746(1):134-42.
32. Magariños AMa, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *The Journal of Neuroscience*. 1996;16(10):3534-40.
33. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience*. 1997;17(7):2492-8.
34. Joëls M, de Kloet ER. Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends in neurosciences*. 1992;15(1):25-30.
35. Oitzl MS, De Kloet ER. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behavioral neuroscience*. 1992;106(1):62.
36. Sapolsky RM, McEwen BS. Down-regulation of neural corticosterone receptors by corticosterone and dexamethasone. *Brain research*. 1985;339(1):161-5.
37. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis*. *Endocrine reviews*. 1986;7(3):284-301.
38. Madeira MD, Lieberman AR. Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Progress in neurobiology*. 1995;45(4):275-333.
39. Weinstock M. Sex-dependent changes induced by prenatal stress in cortical and hippocampal morphology and behaviour in rats: an update. *Stress*. 2011;14(6):604-13.
40. Wimer CC, Wimer RE. On the sources of strain and sex differences in granule cell number in the dentate area of house mice. *Developmental Brain Research*. 1989;48(2):167-76.
41. Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat [published erratum appears in *J Neurosci* 1992 Oct; 12 (10): following table of contents]. *The Journal of Neuroscience*. 1992;12(7):2549-54.
42. Meyer G, Ferres-Torres R, Mas M. The effects of puberty and castration on hippocampal dendritic spines of mice. A Golgi study. *Brain research*. 1978;155(1):108-12.

43. Gould E, Westlind-Danielsson A, Frankfurt M, McEwen BS. Sex differences and thyroid hormone sensitivity of hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Neuroscience*. 1990;10(3):996-1003.
44. Olivares Hernández JD, Juárez Aguilar E, García García F. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. 2015;15(1):20-8.
45. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological reviews*. 2005;85(2):523-69.
46. Kempermann G. *Adult neurogenesis: stem cells and neuronal development in the adult brain*: Oxford University Press, USA; 2006.
47. Ramirez-Rodriguez G, Benitez-King G, Kempermann G. Formacion de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: neurogenesis [the new neuron formation in the adult hippocampus: neurogenesis]. *Salud Mental*. 2007;30(3):12-9.
48. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(18):7153-60.
49. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2003;130(2):391-9.
50. Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *Journal of Comparative Neurology*. 2003;467(4):455-63.
51. Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*. 2006;16(3):239-49.
52. Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry*. 1999;46(11):1472-9.
53. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Hormones and behavior*. 1994;28(4):464-76.
54. Koehl M, Abrous DN. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*. 2011;33(6):1101-14.
55. Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 2000;1(1):41-50.
56. Gabrieli JD. Cognitive neuroscience of human memory. *Annual review of psychology*. 1998;49(1):87-115.
57. Bertaina-Anglade V, Tramu G, Destrade C. Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *European Journal of Neuroscience*. 2000;12(10):3803-12.
58. Ros J, Pellerin L, Magara F, Dauguet J, Schenk F, Magistretti PJ. Metabolic activation pattern of distinct hippocampal subregions during spatial learning and memory retrieval. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2006;26(4):468-77.
59. Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, Aggleton JP. Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20(7):2711-8.
60. Florian C, Roullet P. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behavioural brain research*. 2004;154(2):365-74.
61. Lassalle J-M, Bataille T, Halley H. Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiology of learning and memory*. 2000;73(3):243-57.

62. Dupret D, Revest J-M, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, et al. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PloS one*. 2008;3(4):e1959.
63. Eichenbaum H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behavioural brain research*. 2001;127(1):199-207.
64. Levine S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *European journal of pharmacology*. 2000;405(1):149-60.
65. Chapillon P, Patin V, Roy V, Vincent A, Caston J. Effects of pre-and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: A review. *Developmental psychobiology*. 2002;41(4):373-87.
66. Levine S. A further study of infantile handling and adult avoidance learning. *Journal of Personality*. 1956;25(1):70-80.
67. Levine S, Chevalier JA, Korchin SJ. The effects of early shock and handling on later avoidance learning. *Journal of personality*. 1956;24(4):475-93.
68. Zhang M, Cai J-X. Neonatal tactile stimulation enhances spatial working memory, prefrontal long-term potentiation, and D1 receptor activation in adult rats. *Neurobiology of learning and memory*. 2008;89(4):397-406.
69. Meaney MJ, Aitken DH, Van Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science*. 1988;239(4841):766-8.
70. Daskalakis NP, Kaperoni M, Koros C, de Kloet ER, Kitraki E. Environmental and tactile stimulation modulates the neonatal handling effect on adult rat spatial memory. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2009;27(8):747-55.
71. Durand M, Sarrieau A, Aguerre S, Mormede P, Chaouloff F. Differential effects of neonatal handling on anxiety, corticosterone response to stress, and hippocampal glucocorticoid and serotonin (5-HT) 2A receptors in Lewis rats. *Psychoneuroendocrinology*. 1998;23(4):323-35.
72. Smotherman W, Brown C, Levine S. Maternal responsiveness following differential pup treatment and mother-pup interactions. *Hormones and Behavior*. 1977;8(2):242-53.
73. Wainwright P, Levesque S, Krempulec L, Bulman-Fleming B, McCutcheon D. Effects of environmental enrichment on cortical depth and Morris-maze performance in B6D2F 2 mice exposed prenatally to ethanol. *Neurotoxicology and teratology*. 1993;15(1):11-20.
74. Uylings H, Kuypers K, Diamond MC, Veltman W. Effects of differential environments on plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats. *Experimental neurology*. 1978;62(3):658-77.
75. Greenough WT, Withers GS, Wallace CS, editors. Morphological changes in the nervous system arising from behavioral experience: What is the evidence that they are involved in learning and memory. *The Biology of Memory, Symposia Medica Hoechst*; 1990: F. K. Schattauder, New York.
76. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997;386(6624):493-5.
77. Winkelmann-Duarte EC, Padilha-Hoffmann CB, Martins DF, Schuh AF, Fernandes MC, Santin R, et al. Early-life environmental intervention may increase the number of neurons, astrocytes, and cellular proliferation in the hippocampus of rats. *Experimental brain research*. 2011;215(2):163-72.
78. Lucion AB, Pereira FM, Winkelmann EC, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavioral neuroscience*. 2003;117(5):894.
79. Winkelmann-Duarte EC, Todeschin AS, Fernandes MC, Bittencourt LC, Pereira GA, Samios VN, et al. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain research*. 2007;1170:20-30.

80. Todeschin AS, Winkelmann-Duarte EC, Jacob MHV, Aranda BCC, Jacobs S, Fernandes MC, et al. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Hormones and Behavior*. 2009;56(1):93-100.
81. Camozzato TS, Winkelmann-Duarte EC, Padilha CB, Miguel SP, Bonzanini L, Anselmo-Franci JA, et al. Neonatal handling reduces the number of cells in the medial preoptic area of female rats. *Brain research*. 2009;1247:92-9.
82. Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky P, Meaney M. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of neuroendocrinology*. 2000.
83. Severino GS, Fossati IA, Padoin MJ, Gomes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, et al. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiology & behavior*. 2004;81(3):489-98.
84. Raineki C, Lutz ML, Sebben V, Ribeiro RA, Lucion AB. Neonatal handling induces deficits in infant mother preference and adult partner preference. *Developmental psychobiology*. 2013;55(5):496-507.
85. Meaney M, Aitken D, Viau V, Sharma S, Sarrieau A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*. 1989;50(5):597-604.
86. Tang AC. Neonatal exposure to novel environment enhances hippocampal-dependent memory function during infancy and adulthood. *Learning & Memory*. 2001;8(5):257-64.
87. Tang AC, Akers KG, Reeb BC, Romeo RD, McEwen BS. Programming social, cognitive, and neuroendocrine development by early exposure to novelty. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(42):15716-21.
88. Tang AC, Zou B. Neonatal exposure to novelty enhances long-term potentiation in CA1 of the rat hippocampus. *Hippocampus*. 2002;12(3):398-404.
89. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 1997;277(5332):1659-62.
90. Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature neuroscience*. 2000;3(8):799-806.
91. Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ. Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain research*. 2007;1154:144-53.
92. Darnaudéry M, Maccari S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain research reviews*. 2008;57(2):571-85.
93. Weinstock M. Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. *Neurochemical research*. 2007;32(10):1730-40.
94. Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. *Brain research reviews*. 2010;65(1):56-79.
95. King S, Laplante DP. The effects of prenatal maternal stress on children's cognitive development: Project Ice Storm. *Stress*. 2005;8(1):35-45.
96. King S, Mancini-Marie A, Brunet A, Walker E, Meaney MJ, Laplante DP. Prenatal maternal stress from a natural disaster predicts dermatoglyphic asymmetry in humans. *Development and psychopathology*. 2009;21(02):343-53.
97. Talge NM, Neal C, Glover V. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2007;48(3-4):245-61.
98. Beversdorf DQ, Manning S, Hillier A, Anderson S, Nordgren R, Walters S, et al. Timing of prenatal stressors and autism. *Journal of autism and developmental disorders*. 2005;35(4):471-8.

99. Kinney DK, Munir KM, Crowley DJ, Miller AM. Prenatal stress and risk for autism. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2008;32(8):1519-32.
100. Grizenko N, Shayan YR, Ter-Stepanian M. Relation of maternal stress during pregnancy to symptom severity and response to treatment in children with ADHD. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*. 2008;33(1):10.
101. Li J, Olsen J, Vestergaard M, Obel C. Attention-deficit/hyperactivity disorder in the offspring following prenatal maternal bereavement: a nationwide follow-up study in Denmark. *European child & adolescent psychiatry*. 2010;19(10):747-53.
102. Kinney DK. Prenatal stress and risk for schizophrenia. *International Journal of Mental Health*. 2000;29(4):62-72.
103. Watson JB, Mednick SA, Huttunen M, Wang X. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Development and psychopathology*. 1999;11(03):457-66.
104. Maccari S, Morley-Fletcher S. Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus–pituitary–adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32:S10-S5.
105. Estanislau C, Morato S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behavioural brain research*. 2005;163(1):70-7.
106. Takahashi LK, Haglin C, Kalin NH. Prenatal stress potentiates stress-induced behavior and reduces the propensity to play in juvenile rats. *Physiology & behavior*. 1992;51(2):319-23.
107. Gué M, Bravard A, Meunier J, Veyrier R, Gaillet S, Recasens M, et al. Sex differences in learning deficits induced by prenatal stress in juvenile rats. *Behavioural brain research*. 2004;150(1):149-57.
108. Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous D. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(20):11032-7.
109. Schneider ML, Roughton EC, Koehler AJ, Lubach GR. Growth and development following prenatal stress exposure in primates: an examination of ontogenetic vulnerability. *Child development*. 1999;70(2):263-74.
110. Takahashi LK, Turner JG, Kalin NH. Prolonged stress-induced elevation in plasma corticosterone during pregnancy in the rat: implications for prenatal stress studies. *Psychoneuroendocrinology*. 1998;23(6):571-81.
111. Eunson P. 6 PLACENTAL PATHOLOGY, INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION, AND SUBSEQUENT CHILD DEVELOPMENT. *Clinics in Developmental Medicine*. 2004(169):70-87.
112. Kastin AJ, Akerstrom V. Differential interactions of urocortin/corticotropin-releasing hormone peptides with the blood-brain barrier. *Neuroendocrinology*. 2002;75(6):367-74.
113. Sandman CA, Wadhwa P, Glynn L, CHICZ-DEMET A, Porto M, Garite TJ. Corticotrophin-releasing Hormone and Fetal Responses in Human Pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;897(1):66-75.
114. Wadhwa PD, Sandman CA, Garite TJ. The neurobiology of stress in human pregnancy: implications for prematurity and development of the fetal central nervous system. *Progress in brain research*. 2001;133:131-42.
115. Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ. Stressed-out, or in (utero)? Trends in neurosciences. 2002;25(10):518-24.
116. Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, et al. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007;292(6):E1526-E33.

117. Cintra A, Solfrini V, Bunnemann B, Okret S, Bortolotti F, Gustafsson J-Å, et al. Prenatal development of glucocorticoid receptor gene expression and immunoreactivity in the rat brain and pituitary gland: a combined in situ hybridization and immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology*. 1993;57(6):1133-47.
118. Fujioka T, Sakata Y, Yamaguchi K, Shibasaki T, Kato H, Nakamura S. The effects of prenatal stress on the development of hypothalamic paraventricular neurons in fetal rats. *Neuroscience*. 1999;92(3):1079-88.
119. Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *The Journal of Neuroscience*. 1996;16(12):3943-9.
120. Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2008;32(6):1073-86.
121. Wilcoxon JS, Redei EE. Maternal glucocorticoid deficit affects hypothalamic–pituitary–adrenal function and behavior of rat offspring. *Hormones and behavior*. 2007;51(3):321-7.
122. Koehl M, Darnaudéry M, Dulluc J, Van Reeth O, Moal ML, Maccari S. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo–pituitary–adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *Journal of neurobiology*. 1999;40(3):302-15.
123. Henry C, Kabbaj M, Simon H, Moal M, Maccari S. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *Journal of neuroendocrinology*. 1994;6(3):341-5.
124. Richardson HN, Zorrilla EP, Mandyam CD, Rivier CL. Exposure to repetitive versus varied stress during prenatal development generates two distinct anxiogenic and neuroendocrine profiles in adulthood. *Endocrinology*. 2006;147(5):2506-17.
125. Smith JW, Seckl J, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2004;29(2):227-44.
126. Vallée M, Maccari S, Dellu F, Simon H, Le Moal M, Mayo W. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *European Journal of Neuroscience*. 1999;11(8):2906-16.
127. Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *The Journal of Neuroscience*. 1995;15(1):110-6.
128. Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena A, Cinque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2003;27(1):119-27.
129. Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, McEwen BS. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain research*. 1992;595(2):195-200.
130. Fujioka T, Fujioka A, Endoh H, Sakata Y, Furukawa S, Nakamura S. Materno-fetal coordination of stress-induced Fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus during pregnancy. *Neuroscience*. 2003;118(2):409-15.
131. Koehl M, Lemaire V, Le Moal M, Abrous DN. Age-dependent effect of prenatal stress on hippocampal cell proliferation in female rats. *European Journal of Neuroscience*. 2009;29(3):635-40.
132. Zuena AR, Mairesse J, Casolini P, Cinque C, Alemà GS, Morley-Fletcher S, et al. Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. 2008.
133. Odagiri K, Abe H, Kawagoe C, Takeda R, Ikeda T, Matsuo H, et al. Psychological prenatal stress reduced the number of BrdU immunopositive cells in the dorsal hippocampus without affecting the

- open field behavior of male and female rats at one month of age. *Neuroscience letters*. 2008;446(1):25-9.
134. Williams CL, Barnett AM, Meck WH. Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. *Behavioral neuroscience*. 1990;104(1):84.
135. 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*. 2004;145(8):3778-87.
136. Wu J, Song T-B, Li Y-J, He K-S, Ge L, Wang L-R. Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKC β 1 expression and translocation in offspring rats. *Brain research*. 2007;1141:205-13.
137. Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 1998;16(3):209-16.
138. Ishiwata H, Shiga T, Okado N. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. *Neuroscience*. 2005;133(4):893-901.
139. Barros VG, Duhalde-Vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC. Astrocyte–neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. *Journal of neuroscience research*. 2006;83(5):787-800.
140. Hosseini-sharifabad M, Hadinedoushan H. Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anatomical science international*. 2007;82(4):211-7.
141. Jia N, Yang K, Sun Q, Cai Q, Li H, Cheng D, et al. Prenatal stress causes dendritic atrophy of pyramidal neurons in hippocampal CA3 region by glutamate in offspring rats. *Developmental neurobiology*. 2010;70(2):114-25.
142. Martínez-Téllez RI, Hernández-Torres E, Gamboa C, Flores G. Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. *Synapse*. 2009;63(9):794-804.
143. Van den Hove DL, Steinbusch HW, Bruschetti M, Gazzolo D, Frulio R, Scheepens A, et al. Prenatal stress reduces S100B in the neonatal rat hippocampus. *Neuroreport*. 2006;17(10):1077-80.
144. Coe CL, Kramer M, Czéh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, et al. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biological psychiatry*. 2003;54(10):1025-34.
145. Meunier J, Gué M, Récasens M, Maurice T. Attenuation by a sigma1 (σ 1) receptor agonist of the learning and memory deficits induced by a prenatal restraint stress in juvenile rats. *British journal of pharmacology*. 2004;142(4):689-700.
146. Andrade JP, Madeira M, Paula-Barbosa M. Sexual dimorphism in the subiculum of the rat hippocampal formation. *Brain research*. 2000;875(1):125-37.
147. McEwen BS, Lieberburg I, Chaptal C, Krey LC. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Hormones and behavior*. 1977;9(3):249-63.
148. Son GH, Geum D, Chung S, Kim EJ, Jo J-H, Kim C-M, et al. Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience*. 2006;26(12):3309-18.
149. 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. *Behavioural brain research*. 2007;179(1):126-32.

150. Wakshlak A, Weinstock M. Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. *Physiology & behavior*. 1990;48(2):289-92.
151. Vallée 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. *The Journal of Neuroscience*. 1997;17(7):2626-36.
152. Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza P-V, Abrous DN. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry*. 2006;59(9):786-92.
153. Kapoor A, Kostaki A, Janus C, Matthews SG. The effects of prenatal stress on learning in adult offspring is dependent on the timing of the stressor. *Behavioural brain research*. 2009;197(1):144-9.
154. Hancock A, Priester C, Kidder E, Keith JR. Does 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) disrupt cell proliferation and neuronal maturation in the adult rat hippocampus in vivo? *Behavioural brain research*. 2009;199(2):218-21.
155. Zagron G, Weinstock M. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behavioural brain research*. 2006;175(2):323-8.
156. Salomon S, Bejar C, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Corticosterone mediates some but not other behavioural changes induced by prenatal stress in rats. *Journal of neuroendocrinology*. 2011;23(2):118-28.
157. Li H, Li X, Jia N, Cai Q, Bai Z, Chen R, et al. NF- κ B regulates prenatal stress-induced cognitive impairment in offspring rats. *Behavioral neuroscience*. 2008;122(2):331.
158. Schwabe L, Schächinger H, de Kloet ER, Oitzl MS. Stress impairs spatial but not early stimulus-response learning. *Behavioural brain research*. 2010;213(1):50-5.
159. Roozendaal B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of learning and memory*. 2002;78(3):578-95.
160. Roozendaal B. Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*. 2003;27(8):1213-23.
161. Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nature neuroscience*. 2007;10(3):355-62.
162. Mandyam CD, Crawford EF, Eisch AJ, Rivier CL, Richardson HN. Stress experienced in utero reduces sexual dichotomies in neurogenesis, microenvironment, and cell death in the adult rat hippocampus. *Developmental neurobiology*. 2008;68(5):575-89.
163. Tanapat P, Hastings NB, Gould E. Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose-and time-dependent manner. *Journal of Comparative Neurology*. 2005;481(3):252-65.
164. Waddell J, Hanscom M, Edwards NS, McKenna MC, McCarthy MM. Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioral outcomes in a rat model of neonatal HI. *Experimental neurology*. 2016;275:285-95.
165. Gómez-González B, Escobar A. Prenatal stress alters microglial development and distribution in postnatal rat brain. *Acta neuropathologica*. 2010;119(3):303-15.
166. Kaur C, Dheen ST. From blood to brain: amoeboid microglial cell, a nascent macrophage and its functions in developing brain1. *Acta pharmacologica sinica*. 2007;28(8):1087-96.
167. Rimmele U, Besedovsky L, Lange T, Born J. Emotional memory can be persistently weakened by suppressing cortisol during retrieval. *Neurobiology of learning and memory*. 2015;119:102-7.
168. de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in neurosciences*. 1999;22(10):422-6.

169. Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain and cognition*. 2007;65(3):209-37.
170. Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A. Environmental enrichment and postnatal handling prevent spatial learning deficits in aged hypoemotional (Roman high-avoidance) and hyperemotional (Roman low-avoidance) rats. *Learning & Memory*. 1995;2(1):40-8.
171. Fenoglio KA, Brunson KL, Avishai-Eliner S, Stone BA, Kapadia BJ, Baram TZ. Enduring, handling-evoked enhancement of hippocampal memory function and glucocorticoid receptor expression involves activation of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *Endocrinology*. 2005;146(9):4090-6.
172. Stamatakis A, Stamatakis A, Pondiki S, Stamatakis A, Pondiki S, Kitraki E, et al. Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress. *Stress*. 2008;11(2):148-59.
173. Zhang Z, Zhang H, Du B, Chen Z. Neonatal handling and environmental enrichment increase the expression of GAP-43 in the hippocampus and promote cognitive abilities in prenatally stressed rat offspring. *Neuroscience letters*. 2012;522(1):1-5.
174. Richards S, Mychasiuk R, Kolb B, Gibb R. Tactile stimulation during development alters behaviour and neuroanatomical organization of normal rats. *Behavioural brain research*. 2012;231(1):86-91.
175. Kozorovitskiy Y, Gross CG, Kopil C, Battaglia L, McBreen M, Stranahan AM, et al. Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(48):17478-82.
176. Pham TM, Söderström S, Henriksson BG, Mohammed AH. Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behavioural brain research*. 1997;86(1):113-20.
177. Roggeri L, Riviaccio B, Rossi P, D'Angelo E. Tactile stimulation evokes long-term synaptic plasticity in the granular layer of cerebellum. *The Journal of Neuroscience*. 2008;28(25):6354-9.
178. Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA. Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 2002;16(10):2008-12.
179. Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of neuroendocrinology*. 1999;11(12):925-34.
180. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular brain research*. 1993;18(3):195-200.
181. Avishai-Eliner S, Eghbal-Ahmadi M, Tabachnik E, Brunson KL, Baram TZ. Down-Regulation of Hypothalamic Corticotropin-Releasing Hormone Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Precedes Early-Life Experience-Induced Changes in Hippocampal Glucocorticoid Receptor mRNA 1. *Endocrinology*. 2001;142(1):89-97.
182. Meaney MJ, Aitken DH. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Developmental Brain Research*. 1985;22(2):301-4.



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainresbull

Research report

Tactile stimulation effects on hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory in prenatally stressed rats



Guerrero Aguilera María de los Angeles^a, Rubio Osornio María del Carmen^b,
Portillo Martínez Wendy^c, Retana-Márquez Socorro^{d,*}

^a Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México

^b Departamento de Neurofisiología, INNN "Manuel Velasco Suárez", Ciudad de México, México

^c Instituto de Neurobiología UNAM campus Juriquilla, Santiago de Querétaro, México

^d Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2015

Received in revised form 25 February 2016

Accepted 11 March 2016

Available online 16 March 2016

Keywords:

Prenatal stress
Tactile stimulation
Neurogenesis
Spatial learning
Corticosterone

ABSTRACT

Neurogenesis in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus is increased by spatial learning and postnatal stimulation. Conversely, prenatal stress (PS) produces a decrease in the proliferation of hippocampal granular cells. This work evaluated the effect of postnatal tactile stimulation (PTS), when applied from birth to adulthood, on cognitive performance and hippocampal neurogenesis (survival and differentiation) in PS female and male rats. The response of the adrenal axis to training in the Morris water maze (MWM) was also analyzed. PS was provided during gestational days 15 through 21. Hippocampal neurogenesis and cognitive performance in the MWM were assessed at an age of three months. Results showed that escape latencies of both female and male PS rats were longer compared to those of their controls (CON). DG cell survival increased in the PS female rats. Corticosterone concentrations were significantly higher in the male and female PS rats after MWM training. PTS improved escape latencies and increased the number of new neurons in the DG of PS animals, and their corticosterone concentrations were similar to those in CON. In CON, PTS diminished DG cell survival but increased differentiation and reduces latency in the MWM. These results show that long-term PTS in PS animals might prevent learning deficits in adults through increase in the number of DG new cells and decrease of the reactivity of the adrenal axis to MWM training.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Prenatal stress (PS) has been associated with a variety of pathologies and behavioral alterations during postnatal life (Politch and Herrenkohl, 1984; Maccari et al., 1995; Tuchscherer et al., 2002), probably, due to exposure to high corticosterone and catecholamine levels released by the mother as a response before stress, which increases blood concentration of these molecules in the fetus (Ward and Weisz, 1984; Takahashi et al., 1998; Weinstock et al., 1988; Rohde et al., 1983). Several studies have shown the association between PS and diverse alterations such as hyper reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (Koehl et al., 1999;

Szuran et al., 2000; Welberg and Seckl 2001), anxiety (Archer and Blackman 1971; Vallée et al., 1997), and learning and memory deficits during the offspring adult life (Hayashi et al., 1998; Vallée et al., 1999; Szuran et al., 2000; Gué et al., 2004) being males more severely altered than females (Lemaire et al., 2000; Zagron and Weinstock, 2006; Yaka et al., 2007; Salomon et al., 2011).

PS, produced either by immobilization for 20–30 min three times a day or by paw electric shocks, results in slow acquisition during spatial learning (Weinstock, 2007). These effects have only been observed in males (Zagron and Weinstock, 2006). However, deterioration in spatial learning due to PS by immobilization has also been reported in females (Gué et al., 2004; Li et al., 2008; Wu et al., 2007). Cognitive deficits due to PS have been associated with changes in neuronal morphology in the hippocampus, a structure highly responsive to stress, with a key role in stress inhibition and playing a role in cognitive and emotional processes (McEwen 2003; Abrous et al., 2005). PS causes reduction in the number of stem cells derived from the sub ependymal lateral ventricle from birth through adult life (Kippin et al., 2004). This reduction has been asso-

Abbreviations: DG, dentate gyrus; LTD, long term depression; MWM, Morris water maze; PS, prenatal stress; PTS, postnatal tactile stimulation.

* Corresponding author at: Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, C.P. 09340, México D.F., México.

E-mail address: rems@xanum.uam.mx (R.-M. Socorro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.003>

0304-3940/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

ciated to suppression of long-term potentiation (LTP), and increase of long-term depression (LTD) (Ishiwata et al., 2005; Lemaire et al., 2000; Son et al., 2006; Yang et al., 2006). Synaptic density reduction in dendrites of pyramidal neurons of the hippocampal CA3 region has also been reported (Ishiwata et al., 2005; Hosseini-sharifabad and Hadinedoushan, 2007).

Generation of new neurons, neurogenesis, in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus occurs during adult life, as well (Abrous et al., 2005), and is related with learning and memory processes (Marín-Burgin and Schinder, 2012). Thus, the number of granular cells and their survival rate increase during spatial learning, which is a hippocampus-dependent task (Gould et al., 1999; Gould and Gross, 2002). This way, neurogenesis plays an important role in cognitive processes. As opposed, PS and glucocorticoid administration during gestation inhibit neuronal proliferation in the hippocampus (Yu et al., 2004), and has been related to deterioration in spatial-learning performance (Abrous et al., 2005; Lemaire et al., 2000; Lemaire et al., 2006).

Otherwise, experiences acquired during the newborn stage might modify behavior, neuroendocrine function and brain structure (Champagne et al., 2009; Daskalakis et al., 2009). These experiences could redirect the development of the immature brain, which is highly plastic, and permanently alter the cognitive and behavioral development of the organism (Greenough 1987; Rainekei et al., 2013). Animals with maternal separation during the early postnatal stage show long-term improvement in spatial learning and memory (Kosten et al., 2012). In addition, corticosterone secretion during stress response is decreased in these animals (Levine, 1962; Meaney et al., 1988; Ogawa et al., 1994; Vallée et al., 1997). Adult animals exposed to an enriched environment for a month show increased length and complexity of dendritic arborization and increased density of dendritic spines in prefrontal cortex and hippocampus (Kozorovitskiy et al., 2005). Moreover, decreased neurogenesis in the hippocampal DG due to PS in male rats may be reverted by postnatal stimulation through maternal separation during the first three weeks of postnatal life (Lemaire et al., 2006). Currently there are no reports which examine simultaneously the effect of postnatal stimulation on cognitive processes, neurogenesis as well as the activity of the HPA axis in PS offspring, females and males. Hence, the objective of this work was to test if long-term tactile stimulation in PS female and male rats improves cognitive performance as well as cellular survival and differentiation in the DG of the hippocampus and reduces the reactivity of the adrenal axis. Corticosterone serum levels in the gestating rats were also measured.

2. Materials and methods

Animal management and experiments were carried out in accordance with Mexican official norms (NOM-062-ZOO-1999), and the domestic and laboratory animal regulation published in the Ethical conduction guidelines for research, teaching and dissemination of the *Division de Ciencias Biológicas y de la Salud* (2010).

2.1. Animals

Three-month-old, pregnant Wistar female rats ($n = 33$) from the vivarium of the Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa housed in transparent plexiglas individual cages were used. Animals were maintained in optimal conditions of constant room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), reverse light-dark cycle (12-h; 12-h, lights of at 1000) and continuous *ad libitum* access to food and water.

2.2. Prenatal stress

During the last gestational week (days 15 through 21), pregnant females of the PS group ($n = 18$), went through two stress sessions by immersion in cold water at 1000 and 1500 h (Lemaire et al., 2000). Rats were individually set in a Plexiglas cage filled with water at 15°C and a height of 15 cm for 15 min per stress session. The cage was covered with a grill to prevent rats to escape. Females of the control group ($n = 15$) were kept in their cages and were only exposed to routine cage cleaning. After delivery, number of offspring in litters were homogenized within their respective group. Pups remained with their mother until weaning (day 21 of postnatal life). Pups were distributed into groups as follows: females, CON ($n = 55$) and PS ($n = 50$); males, CON ($n = 54$) and PS ($n = 53$).

2.3. Postnatal tactile stimulation

Pups undergoing postnatal tactile stimulation (PTS) from PS and CON groups were distributed as follows: CON females with PTS (female PTS group), $n = 26$; PS females with PTS (female PS+PTS group), $n = 25$; CON males with PTS (male PTS group), $n = 25$; PS males with PTS (male PS+PTS group), $n = 25$. PTS involved the researcher to slide her fingers on the back of every rat (using index, middle, ring and little fingers) in a cephalo-caudal direction during 60 s (Imanaka et al., 2008). The procedure was carried out daily between 1000 and 1100 h, from birth to the age of three months.

2.4. Spatial navigation task

Spatial learning and memory were evaluated using the Morris water maze (MWM) task. MWM consisted of a cylindrical pool (170 cm of diameter and 50 cm of height) surrounded by white walls. The pool was filled with water to a height of 30 cm and water was kept at a temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

The pool was divided into four imaginary quadrants tagged according to the cardinal points (NE, north-east; north-west, NW; SE, south-east; SW, south-west) and considering the starting quadrant as the reference. Three colorful images were set on the walls of the room as special visual cues. An acrylic transparent platform (19 cm \times 22 cm) was set 2 cm under the water surface in the NE quadrant, equidistantly to the wall and the center of the maze.

When the animals reached three months of age, they underwent learning sessions consisting of four trials per session during four consecutive days (days 1–4). At day 6 (48 h later), a single-trial memory session with the platform was carried out and the latencies were registered. Also, a memory session was carried out 24 h after the single trial session (day 7) consisting of a single trial without the platform, and letting the rat to swim for 60 s. All the trials were recorded. Thirteen days after the first learning session, a single-trial session with the platform inside the maze was carried out. Trials started when the rat was set on the water with the snout pointing at the pool wall. The starting quadrant changed from trial to trial. For the first trial, if a rat did not find the platform within a period of 60 s, the experimenter guided the rat to the platform and left it on the platform for 30 s (Kapoor et al., 2009). When rats found the platform within the 60 s period, they were left there for 30 s.

The behavioral measurements analyzed were: latency to reach the platform for the learning sessions, and time spent in the platform quadrant and number of platform-site crossovers for the memory sessions.

2.5. Administration of the DNA-synthesis marker 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

Female ($n = 4$) and male ($n = 4$) rats of every group were daily i.p. injected with BrdU (Sigma, USA, 50 mg/kg) dissolved in 0.9% NaCl

two minutes before each first MWM learning session during the first, second, third and fourth days of training (Lemaire et al., 2000; Hancock et al., 2009). In order to determine the survival (but not proliferation) and phenotype of the newly born cells the animals were euthanized 14 days after the first BrdU injection."

2.6. Histological procedure

The day after the last MWM session (day 14), rats were deeply anesthetized with pentobarbital sodium (100 mg/kg; Pisabental, Mexico) and intracardially perfused using 100 ml phosphate buffer (PBS; pH = 7.4) followed by a 200 ml solution of 4% paraformaldehyde PBS. Then, brains were extracted, and 40- μ m-thick coronal sections were obtained in a Leica CM1850 cryostat to be collected in a PBS solution.

To determine the number of new cells and those differentiated into neurons, double immunostaining for BrdU and NeuN was performed. NeuN is a specific nuclear protein expressed in most of the neuronal types in the vertebrate central nervous system (Kempermann, 2006). Briefly, sections were washed in triphosphate buffer (TBS), and then washed in a TBS and sodium borohydrate (0.5%) solution during 15 min. Afterwards, sections were profusely washed in TBS, followed by a 30-minute wash in TBS containing 10X Triton (1%; Jt Baker, USA) and peroxide (1%; Jt Baker, USA). Later, sections went through 3 \times 10-minute washes in TBS and dimethyl sulfoxide (DMSO; 1%; Jt Baker, Mexico). Then, sections were incubated in HCL 2N for an hour at 37 °C and washed in a TBS and sodium borohydrate (0.5%) for 15 min. Three additional 10-minute TBS washes were performed, after which the primary antibodies Anti-BrdU (1:800; BD, Biosciences, USA) and Anti-NeuN (1:250, Millipore, USA) were added. Sections were incubated during, at least, 48 h with constant stirring, after that, sections were 5X washed in a 10X Triton (0.02%) and 0.1% albumin (1%) TBS solution for 15 min. Next, sections were incubated in the secondary antibodies anti-rat IgG Alexa Fluor 488 (1:1100; Invitrogen, USA) and anti-mouse IgG Alexa Fluor 568 (1:1100; Invitrogen, USA) in a 0.1% albumin and 0.32% Triton X-100 solution with constant stirring. Finally, sections were mounted on slides and covered with AquaPoly/Mount media (Polysciences, USA). Sections were observed in a confocal Zeiss LSM 700 microscope (Germany) using a 20 \times lens. BrdU-positive cells were counted exhaustively in the granule cell layer and subgranular zone of DG in dorsal hippocampus of both hemispheres with the Zeiss LSM Image Examiner software. Double staining was confirmed for every cell through orthogonal view.

2.7. Corticosterone concentrations

Blood samples were obtained from gestating rats (CON, n = 6; PS, n = 6), in the last case immediately after exposure to stressor on gestational day 18. Blood samples were obtained from the offspring (CON n = 6, PTS n = 6, PS n = 6, PS + PTS n = 6) after the MWM test. Animals were anesthetized with pentobarbital sodium (100 mg/kg; Pisabental, México), samples were extracted by cardiac puncture into test tubes and centrifuged at 3000g during 25 min at room temperature. Serum was frozen at -20 °C for corticosterone determination.

2.7.1. Corticosterone extraction

Corticosterone was extracted from serum into diethyl ether-dichloromethane (60:40 v/v) by constant stirring in a vortex mixer and then immediately centrifuged for 5 min. The organic phase was shaken in a vortex mixer with 1 ml HPLC-grade water. After centrifugation, the organic phase (3 ml) was left to evaporate at

room temperature. Residuals were re-dissolved in methanol-water (60:40 v/v).

2.7.2. Chromatographic procedure

Both the guard column (Symmetry C18, particle size 3.5 μ m, 2.1 \times 10 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA) and the column were equilibrated using HPLC-grade acetonitrile-water (65:35 v/v) at a flow rate of 0.4 ml/min. Separations were made at a temperature of 40 °C in a Waters Symmetry C18 column (particle size 5 mm; column size 2.0 m 150 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA). A system controller (Waters 600-MS; Waters Corp., Milford, MA, USA) was utilized to empty out the mobile phase.

Steroids were evaluated with a detector of ultraviolet-visible absorption (λ = 250 nm; Waters Corp., Milford, MA, USA). Results were analyzed with a Milenium 32 work station (Waters Corp., Milford, MA, USA).

2.8. Statistical analysis

All the statistical analysis were carried out using the SPSS statistical software. MWM measurements (time spent in the platform quadrant, number of platform-site crossovers, and latency to reach the platform) and corticosterone levels were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by the Newman-Keuls *post hoc* test. The number of cells stained with BrdU was analyzed with a non-parametric ANOVA test (Kruskal-Wallis) followed by the Dunn test. The differences in the number of BrdU and BrdU/NeuN cells were analyzed with the Chi squared test. The significance level was established at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Corticosterone concentrations in serum in the stressed pregnant female rats

Maternal serum corticosterone concentrations were doubled in stressed pregnant female rats as compared to control pregnant female rats on gestational day 18 ($p < 0.01$) (Fig. 1).

3.2. Prenatal stress and tactile stimulation effects on spatial learning and memory

PS females showed longer latencies to reach the platform on days 1–4, and 6 in the MWM as compared to females from CON, PTS and PS + PTS groups ($F_{3,169} = 7.99$; $p < 0.000297$) (Fig. 2). The same effect was observed in PS males, as they presented longer latencies to reach the platform on days 1–4, 6 and 13 in the MWM as compared to male from CON, PTS and PS + PTS groups ($F_{3, 174} = 41.25$; $p < 0.000289$) (Fig. 2). PTS appears to rescue the decline in memory performance seen in the PS group, since both female and male PS + PTS offspring obtained latencies to reach the platform similar to those of CON and PTS. Female and male from PTS groups showed escape latencies similar to control group.

PS animals, both female and male obtained the longest mean latencies to reach the platform in all the test days ($p < 0.001$). Males and females from CON, PTS, and PS + PTS groups showed similar mean latencies (Fig. 3).

On day 7 (without platform), female ($F_{3,31} = 9.05$ $p < 0.000203$) and male ($F_{3,40} = 14.40$ $p < 0.000$) experimental rats, PS, PTS and PS + PS, remained a lower percentage of total time in the platform quadrant compared to CON animals (Fig. 4). In addition, PS females ($F_{3,31} = 6.80$ $p < 0.001242$) and PS and PTS males showed less platform-site crossovers ($F_{3,40} = 5.19$ $p < 0.004091$) (Fig. 4).

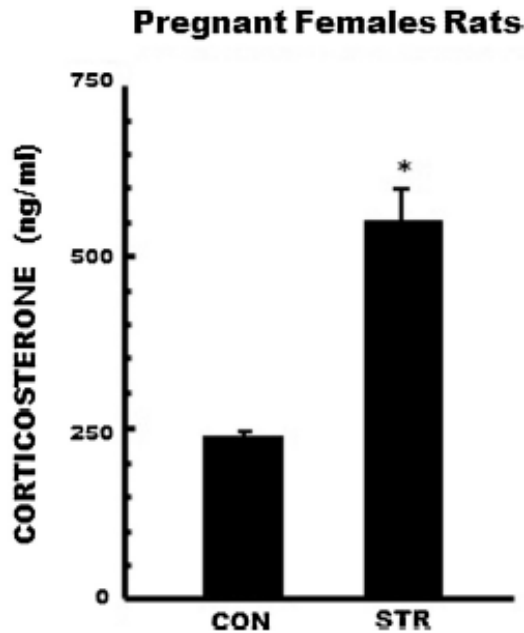


Fig. 1. Corticoid concentrations in serum of gestating female rats after exposure to the stressor on gestational day 18. The stressor by immersion in cold water increases corticosterone concentrations in serum (Control, CON; Stress, STR). Data shown as $X \pm SEM$. * $p < 0.01$ compared to CON group.

3.3. Neurogenesis in the hippocampus

Positive cells to BrdU (ir-BrdU) in the subgranular layer of the DG were evidenced by immunofluorescence as small circles in the green wavelength band, 488 nm (Fig. 5). Cellular survival (number of ir-BrdU cells per mm^2) was lower in the PTS female compared to the CON group. Higher cell survival was observed in the hippocampus from PS females ($p < 0.001$) compared to the CON, PTS and PS + PTS females (Fig. 6). Less cell survival was observed in the hippocampus from PTS and PS + PTS groups when compared to CON and PS males ($p < 0.001$) (Fig. 6).

New neurons (wavelength band, 550 nm) were identified using double-staining immunofluorescence BrdU/NeuN (ir-BrdU/NeuN) as small circles in yellow (Fig. 5). Hippocampus from PS + PTS females presented a larger number of new neurons compared with the other experimental groups ($p < 0.01$). No decrease in the number of new neurons was observed in PS females. The hippocampus from PS males showed the smallest number of new neurons compared to CON, PTS and PS + PTS males. A larger number of new neurons were observed in the hippocampus from PS + PTS males ($p < 0.001$) (Fig. 6).

3.4. Corticosterone concentrations in serum in offspring after MWM tasks

Corticosterone concentrations in serum were larger in PS females and males after the MWM tasks compared with CON ($p < 0.01$). PTS rats showed smaller corticosterone concentrations in serum compared with the rest of the experimental groups ($p < 0.05$) (Fig. 7).

4. Discussion

The results obtained in this work show that PS causes spatial learning and memory deterioration. However, new-cell survival is

increased in the hippocampal DG of PS females, while it remains unchanged in PS males. As well, the HPA-axis reactivity is significantly increased in PS rats in the adult stage. Tactile stimulation dispensed from birth to three months of age may prevent the harming effects of PS on learning and memory, and increases neuronal differentiation of new cells in the DG and diminishes the HPA-axis reactivity in rats of both genders. Longer latencies to reach the MWM platform in PS animals imply learning delay, as well as problems to remember the task (Markham et al., 2010) each day. The results obtained in the MWM in this work differ from findings of other where only males are affected by PS (Lemaire et al., 2000; Zagron and Weinstock, 2006; Yaka et al., 2007; Salomon et al., 2011) and support the fact that PS alter males and females (Gué et al., 2004; Wu et al., 2007; Li et al., 2008).

Hyper reactivity and hyperactivity of the adrenal axis observed in the PS animals are associated with the decrease in the number of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the hippocampus (Maccari et al., 2003; Weinstock et al., 1992). Thus, the high corticosteroid concentrations observed in the PS animals after the MWM tasks might be occurring as a result of the HPA-axis hyper reactivity due to a decrease of the glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the hippocampus, with the resulting spatial learning deterioration. Consequently, the animal does not get habituated to the task, which can lead to poor performance. The poor performance in the MWM in PS males seems unrelated to the changes in the survival of the new cell in the DG, but it does relate to the decrease in differentiation of the new cells into neurons. These results are not in accordance with a previous study where immobilization-induced PS in males produced no changes in normal MWM performance, but did show a decrease in the survival of new cells in the DG and no effect on the percentage of new cells differentiated into neurons (Zuena et al., 2008). These differences in results could be attributed to the differences in the protocols used to induce PS (PS by restraint), in the MWM task, and in the neurogenesis assessment in rats exposed to the MWM task of the present work. Our results differ also from the reported in other studies where neurogenesis diminished in PS animals after spatial learning (Lemaire et al., 2000). Differences with these findings may be explained in terms of the protocol discrepancies; neurogenesis was evaluated 24 h after MWM day 5, while this work set the evaluation on day 13. Though, survival of new cells in the hippocampus of male PS rats by immobilization did not warrant an improvement in cognitive performance.

Conversely, there were more surviving new cells and no changes in differentiation in the DG of PS females after the MWM task. To our best knowledge, there are no studies reporting increases in survival of new cells in the DG after PS; hence, the results of this work support the hypothesis that survival of new cells in the hippocampal DG of female rats do not decrease by effect of PS (Koehl et al., 2009; Zuena et al., 2008). This fact may be associated to estrogen levels in females, since a neuroprotective effect has been attributed to that sexual hormone. Moreover, it has been reported that estrogen stimulates cell proliferation and exerts significant effects on survival of new cells in the DG (Tanapat et al., 1999). Furthermore, females produce more cells than males in the DG, producing more cells during proestrus, and these new cells could exert an important influence on hippocampal function (Mandyam et al., 2008; Tanapat et al., 2005).

To our knowledge, there are no reports about these sex-based differences in cell production/differentiation with any change in behavior in prenatally stressed animals, and this need more investigation in future studies. However, in hypoxia-ischemia subjected infant rats, markedly increased cell genesis was reported only in females, and both sexes were modestly impaired in spatial memory (Waddell et al., 2016). The fact that increased cell survival does not match an increase in differentiation into neuron in PS animals,

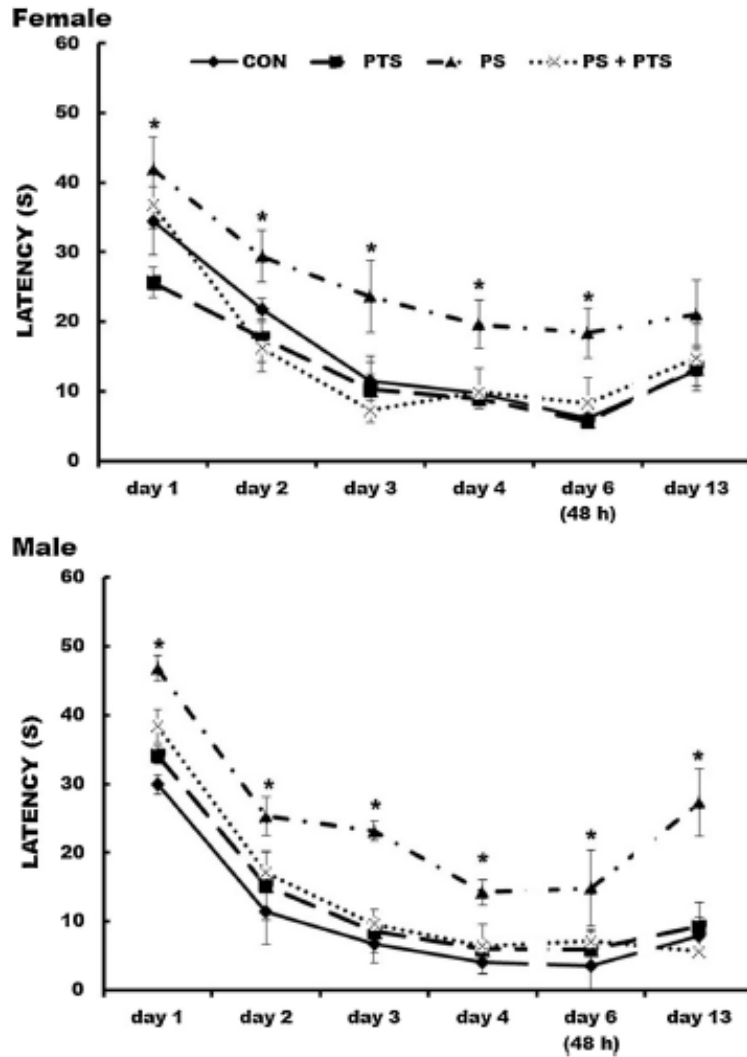


Fig. 2. Effects of prenatal stress (PS) and postnatal tactile stimulation (PTS) on spatial learning and memory in the Morris water maze. Female and male PS animals showed latencies to reach the platform significantly longer on days 1–4 and 6. On day 13, only PS males showed longer latencies. Data shown as X ± SEM. *p < 0.01 compared to CON group.

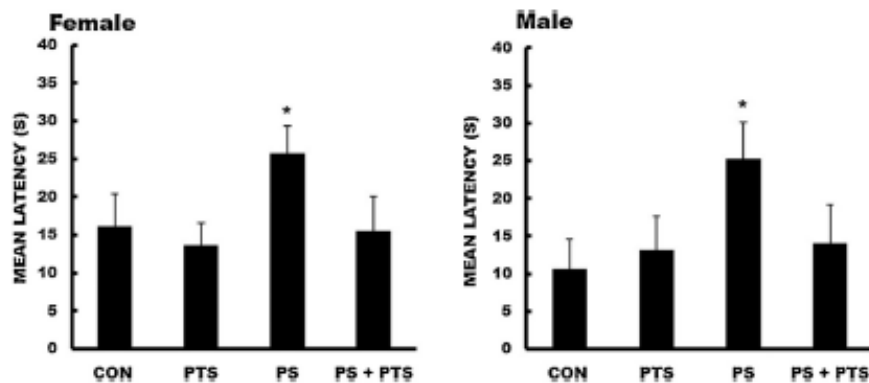


Fig. 3. Effect of prenatal stress (PS) in the mean latencies to reach the platform. Female and male PS animals showed longer latencies compared to the rest of the experimental groups. Data shown as X ± SEM. *p < 0.01 compared to CON group.

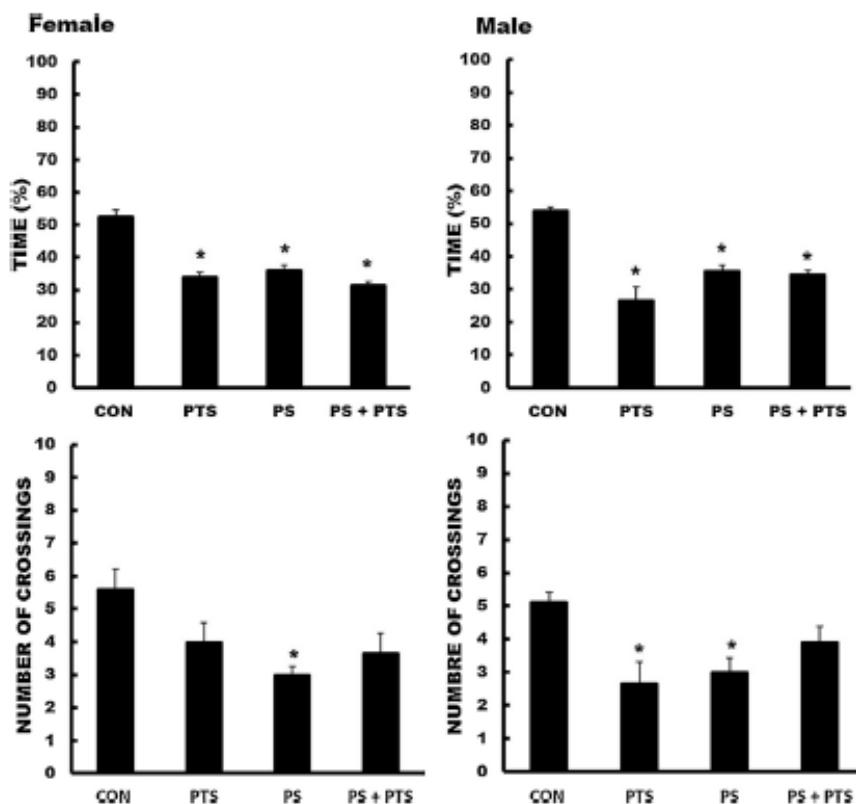


Fig. 4. Effects of prenatal stress (PS) and postnatal tactile stimulation (PTS) on the percentage of time spent in the platform quadrant and platform-site crossovers. Female and male experimental animals remained lower percentage of time in the platform quadrant compared to controls. PS females, and PS and PTS males crossed less times the platform site. Data shown as $X \pm SEM$. * $p < 0.01$ compared to CON group.

specifically in females, could be explained by the differentiation into glial cells, because there is evidence that PS may accelerate glial development and migration in various cerebral regions (Gómez-González and Escobar, 2010). Thus, new glia in the DG of PS animals of both sexes could supply new neurotrophic factors that increase axonal growth and redirection (Kaur and Thameem Dheen, 2007) from the existing network in an attempt to compensate cognitive deficiencies.

The cognitive alterations in PS animals reported in this work can also be attributed to other factors such as the probable deficiencies in the existing neuronal connections in the hippocampus, because PS produces a decrease in the length and complexity of dendritic spines in the hippocampal regions CA1, CA3 and DG (Jia et al., 2010; Martínez-Téllez et al., 2009; Hosseini-sharifabad and Hadinedoushan, 2007; Weinstock, 2011), as well as the high concentrations of corticosterone, which increases due to the exposure to the MWM paradigm. PS induce permanently high corticosterone basal levels during the adult stage when animals are exposed to new environments or stressor situations (de Vries et al., 2007; Levitt et al., 1996; Welberg et al., 2000; Welberg and Seckl, 2001). In this study, hyper reactivity of the adrenal axis in PS females and males may have a role in their deficient performance in cognitive tasks because high

corticosterone concentrations may interfere with spatial learning (Schwabe et al., 2010). However, PTS animals, in which corticosterone levels were lowest, their performance in memory retrieval in MWM was not better than control, probably because low levels of corticosteroids can also interfere with learning. This has been extensively studied in several reports. Memory retrieval

is not only impaired at strongly elevated corticosteroid levels, but also at minimum levels after suppression of corticosteroids. Thus, an inverted U-shaped function describes the relationship between memory retrieval and corticosteroid concentrations (for review see Rimmele et al., 2015).

Our results show that postnatal tactile stimulation does not improve cognitive performance in PTS animals, since their latencies were not shorter than those of control group. Moreover, results in this work show that PTS female and male experimental animals spent less time in the platform quadrant, and male PTS, and PS + PTS males showed less platform-site crossings. These results differ from other studies where postnatal stimulation reduced the latency and distance traveled to reach the platform (Escorihuela et al., 1995; Fenoglio et al., 2005; Stamatakis et al., 2008), and increases the time spent in the platform quadrant in the learning phase (Stamatakis et al., 2008). The differences can be explained by the different stimulation methods (environmental enrichment or separation from the dam) used in those studies.

The less time spent in the platform quadrant observed in this study may be due to the searching strategies used by the tactile stimulated animals as compared to the animals of the other groups. There are reports analyzing the strategies to find the hidden platform demonstrating that PS animals tend to seek randomly platform and swim longer distances, unlike the control and neonatal handling PS animals, which tend to use linear search strategy to swim directly to the platform (Wu et al., 2007; Zhang and Du, 2012). Probably in this study PTS animals used linear strategy repeatedly, thus decreasing the time spent in the quadrant. Moreover, the use of linear strategy can be associated with small latencies arrival at

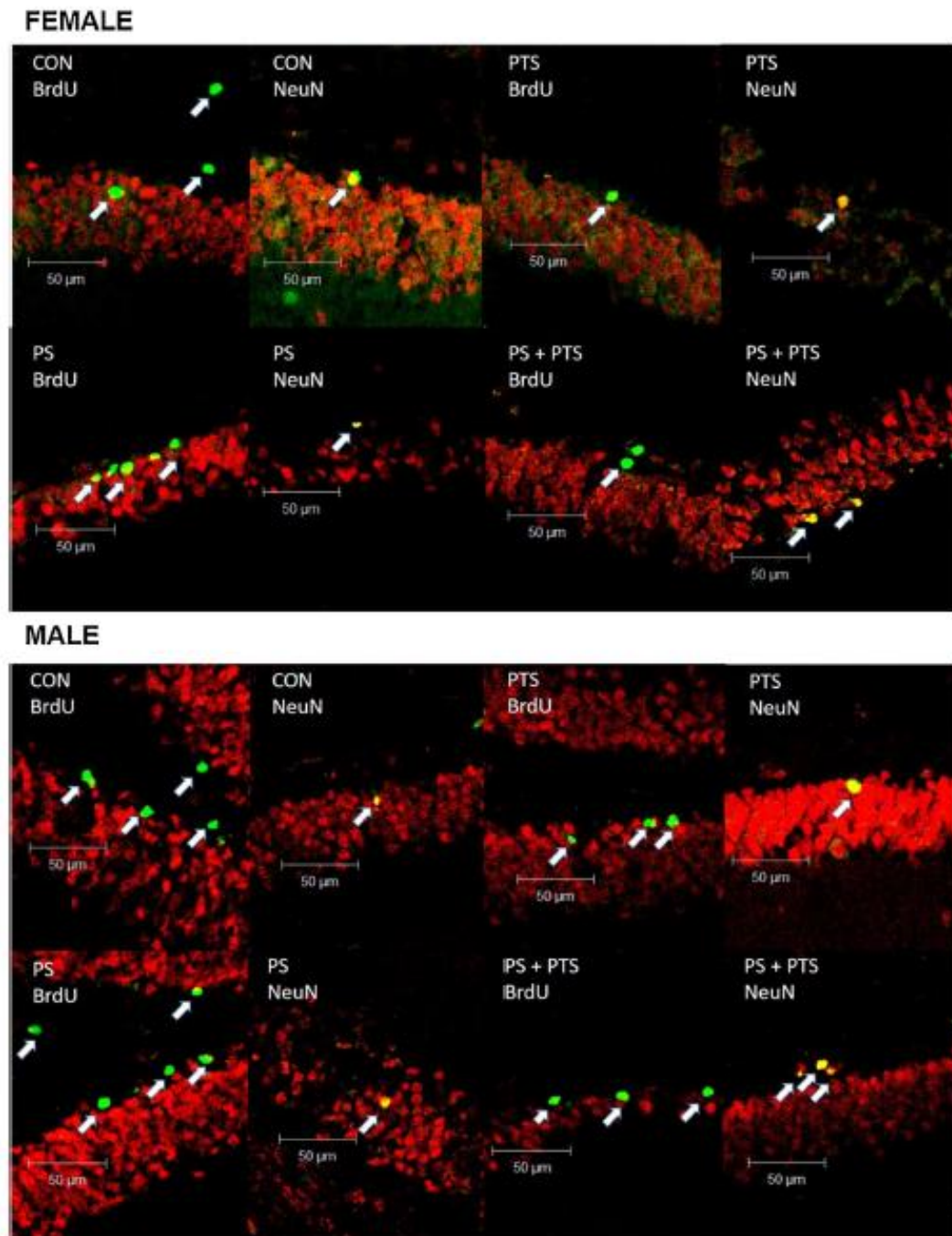


Fig. 5. Microphotographs of BrdU and ir-BrdU/NeuN staining in the dentate gyrus of the hippocampus obtained with confocal microscopy at 20 \times . ir-BrdU, fluorescent cell nuclei in the green wavelength band; NeuN, fluorescent cell nuclei in the red wavelength band; BrdU/NeuN, double staining in the yellow wavelength band. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

the test platform registered at day 6. These results suggest that postnatal tactile stimulation might increase spatial learning and the ability to recall the stored information. The performance in the tactile stimulated animals has been attributed to the increase in the arborization and dendrite length as a result of postnatal stimulation (Richards et al., 2012). It has been proposed that structural changes

due to stimulation are associated with the increase in the expression of synaptic proteins such as synaptophysin, spinophilin, and GluR2 (AMPA-receptor subunit), which are implicated in the formation of new dendritic synapses and spines (Kozorovitskiy et al., 2005). Tactile stimulation promotes the production of trophic factors such as the nerve growth factor, key to hippocampal cognitive

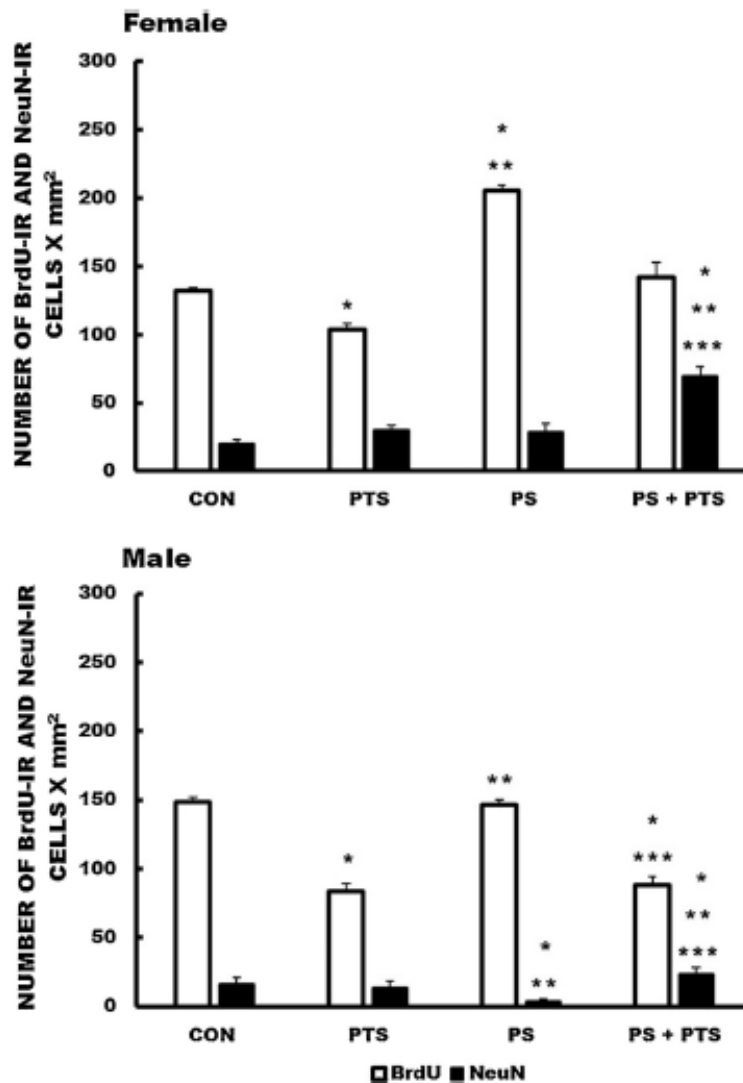


Fig. 6. Effects of prenatal stress (PS) and postnatal tactile stimulation (PTS) on cell survival and differentiation in the dentate gyrus of the hippocampus. Cell survival was significantly less in PTS females and males, $p < 0.001$. PS increased survival of new cells in females and decreased the number of new neurons in males. PS+PTS decreased cell survival in males but increased the number of new neurons in both sexes. Data show as $\bar{X} \pm \text{SEM}$. * $p < 0.001$ compared to CON group; ** $p < 0.001$ compared to PTS group, *** $p < 0.001$ compared to PS group.

processes (Pham et al., 1997). In addition, tactile stimulation may generate synaptic plasticity in the hippocampus, similar to that of the granular layer of the cerebellum (Roggeri et al., 2008).

Concerning survival and differentiation of new cells in the DG, PTS caused decrease in the surviving new cells, but did not modify their differentiation into neurons in the DG and did not affect learning, even though recalling information in the MWM decreased. It is known that postnatal stimulation decreases the number of cells in the locus coeruleus (Lucion et al., 2003), that projects connections to the hippocampus; however, the decrease in the amount of norepinephrine in the DG has no effect on the survival and differentiation of new cells (Kulkarni et al., 2002), so the number of new neurons remains unchanged. A decrease in the survival of new cells was observed in the PS+PTS animals, but differentiation into neurons increased in both genders. Therefore, tactile stimulation may favor the quick maturation of surviving cells in DG during learning, thus

integrating to existing neuronal network and might be one of the possible mechanisms ameliorating the performance of the PS+PTS animals in the cognitive test compared to PS animals. Additionally, it is known that postnatally stimulated animals release less corticosterone during stressor situations and show a fast return to basal concentrations (Liu et al., 2000; Meerlo et al., 1999; Plotsky and Meaney, 1993). This has been attributed to the increase in the number of glucocorticoid receptors in the hippocampus and prefrontal cortex (Avishai-Eliner et al., 2001; Meaney and Aitken, 1985; Meaney et al., 1988). Furthermore, increase in dendritic arborization, length and spine density in the cerebral regions involved in the HPA axis regulation could explain these results (Richards et al., 2012).

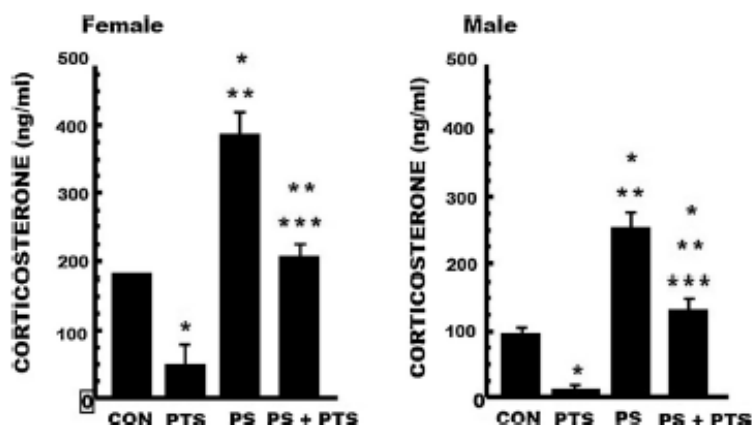


Fig. 7. Effects of prenatal stress (PS) and postnatal tactile stimulation (PTS) in the corticosterone concentrations in serum. PS increases corticoid concentrations in serum and PTS decreases them in females and males. Data shown as $X \pm SEM$. * $p < 0.05$ compared to CON; ** $p < 0.01$ compared to PTS; *** $p < 0.05$ compared to PS.

5. Conclusion

As a conclusion, this work shows that prenatal stress induced by immersion in cold water interferes with spatial learning in female and male rats. These differences are not explained by decrease of cell survival in the dentate gyrus, but probably by the decreased cell differentiation in male. Cognitive differences in females could be explained by hyper reactivity of the adrenal axis during MWM performance. Postnatal tactile stimulation applied from birth to adult stage appears to rescue the decline in memory performance seen in the PS group and can ameliorate cognitive deterioration by stimulating neuronal differentiation in the dentate gyrus and decreasing the reactivity of the adrenal axis in the prenatally stressed animals.

Acknowledgment

The authors wish to thank Susana Castro Chavira for the translation of this text.

References

Abrous Djoher, Nora, Koehl, Muriel, Le Moal, Michel, 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol. Rev.* 85, 523–569.

Archer, John E., Blackman, Derek E., 1971. Prenatal psychological stress and offspring behavior in rats and mice. *Dev. Psychobiol.* 4, 193–248.

Avishai-Eliner, Sarit, Eghbal-Ahmadi, Mariam, Tabachnik, Elvan, Brunson, Kristen L., Baram, Tallie Z., 2001. Down-Regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (mRNA) precedes early-life experience-induced changes in hippocampal glucocorticoid receptor mRNA 1. *Endocrinology* 142, 89–97.

Champagne, Frances A., Curley, James P., Swaney, William T., Hasen, N.S., Keverne, Eric B., 2009. Paternal influence on female behavior: the role of Peg3 in exploration, olfaction, and neuroendocrine regulation of maternal behavior of female mice. *Behav. Neurosci.* 123, 469.

Daskalakis, Nikolaos P., Kaperoni, Maria, Koros, Christos, de Kloet, E. Ronald, Kitraki, Efthimia, 2009. Environmental and tactile stimulation modulates the neonatal handling effect on adult rat spatial memory. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 747–755.

Escorihuela, Rosa Maria, Tobeña, Adolf, Fernández-Teruel, Albert, 1995. Environmental enrichment and postnatal handling prevent spatial learning deficits in aged hypoemotional (Roman high-avoidance) and hyperemotional (Roman low-avoidance) rats. *Learn. Mem.* 2, 40–48.

Fenoglio, Kristina A., Brunson, Kristen L., Avishai-Eliner, Sarit, Stone, Blale A., Kapadia, Bhumika J., Baram, Tallie Z., 2005. Enduring, handling-evoked enhancement of hippocampal memory function and glucocorticoid receptor expression involves activation of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *Endocrinology* 146, 4090–4096.

Gómez-González, Beatriz, Escobar, Alfonso, 2010. Prenatal stress alters microglial development and distribution in postnatal rat brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 303–315.

Gould, Elizabeth, Beylin, Anna, Tanapat, Patima, Reeves, Alison, Reeves, Tracey J., 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.* 2, 260–265.

Gould, Elizabeth, Gross, Charles G., 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J. Neurosci.* 22, 619–623.

Greenough, WT. 1987. 'Experience effects on the developing and the mature brain: dendritic branching and synaptogenesis', *Perinatal development: A psychobiological perspective*: 195–221.

Gué, Michèle, Bravard, Audrey, Meunier, Johann, Veyrier, Renaud, Gaillet, Sylvie, Recasens, Max, Maurice, Tangui, 2004. Sex differences in learning deficits induced by prenatal stress in juvenile rats. *Behav. Brain Res.* 150, 149–157.

Hancock, Aneeka, Priester, Carolina, Kidder, Emily, Keith, Julian R., 2009. Does 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) disrupt cell proliferation and neuronal maturation in the adult rat hippocampus in vivo? *Behav. Brain Res.* 199, 218–221.

Hayashi, Aska, Nagaoka, Masaaki, Yamada, Kazuo, Ichitani, Yukio, Miake, Yoshiaki, Okado, Nobuo, 1998. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 209–216.

Hosseini-sharifabad, Mohammad, Hadedineoushan, Hossein, 2007. Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anat. Sci. Int.* 82, 211–217.

Imanaka, Akihiko, Morinobu, Shigeru, Toki, Shigeru, Yamamoto, S., Matsuki, A., Kozuru, T., Yamawaki, S., 2008. Neonatal tactile stimulation reverses the effect of neonatal isolation on open-field and anxiety-like behavior, and pain sensitivity in male and female adult Sprague-Dawley rats. *Behav. Brain Res.* 186, 91–97.

Ishiwata, H., Shiga, T., Okado, N., 2005. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. *Neuroscience* 133, 893–901.

Jia, Ning, Yang, Kun, Sun, Qinru, Cai, Qing, Li, Hui, Cheng, Daxin, Fan, Xiaoli, Zhu, Zhongliang, 2010. Prenatal stress causes dendritic atrophy of pyramidal neurons in hippocampal CA3 region by glutamate in offspring rats. *Dev. Neurobiol.* 70, 114–125.

Kapoor, Amita, Kostaki, Alice, Janus, Christopher, Matthews, Stephen G., 2009. The effects of prenatal stress on learning in adult offspring is dependent on the timing of the stressor. *Behav. Brain Res.* 197, 144–149.

Kaur, Charanjit, Thameem Dheen, S., 2007. From blood to brain: amoeboid microglial cell, a nascent macrophage and its functions in developing brain 1. *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 1087–1096.

Kempermann, Gerd, 2006. *Adult Neurogenesis: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain*. Oxford University Press.

Kippin, Tod E., Cain, Sean W., Masum, Zahra, Ralph, Martin R., 2004. Neural stem cells show bidirectional experience-dependent plasticity in the perinatal mammalian brain. *J. Neurosci.* 24, 22832–22836.

Koehl, Muriel, Darnaudéry, Muriel, Dulluc, Josette, Van Reeth, Olivier, Le Moal, Michel, Maccari, Stefania, 1999. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J. Neurobiol.* 40, 302–315.

Koehl, Muriel, Lemaire, Valerie, Le Moal, Michel, Abrous, Djoher N., 2009. Age-dependent effect of prenatal stress on hippocampal cell proliferation in female rats. *Eur. J. Neurosci.* 29, 635–640.

Kosten, Therese A., Kim, Jeansok J., Lee, Hongjoo J., 2012. Early life manipulations alter learning and memory in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1985–2006.

Kozorovitskiy, Yevgenia, Gross, Charles G., Kopil, Catherine, Battaglia, Lisa, McBrean, Meghan, Stranahan, Alexis M., Gould, E., 2005. Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17478–17482.

- Kulkarni, Vaishali A., Jha, Shanker, Vaidya, Vidita A., 2002. Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2008–2012.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., Abrous, D.N., 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 11032–11037.
- Lemaire, Valerie, Lamarque, Stephanie, Le Moal, Michel, Piazza, Pier-Vincenzo, Nora Abrous, Djohar, 2006. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 59, 786–792.
- Levine, Seymour, 1962. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science* 135, 795–796.
- Levitt, Naomi S., Lindsay, Robert S., Holmes, Megan C., Seckl, Jonathan R., 1996. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* 64, 412–418.
- Li, Hui, Li, Xia, Jia, Ning, Cai, Qing, Bai, Zhuanli, Chen, Rui, Song, Tianbao, Zhu, Zhongliang, Liu, Jiankang, 2008. NF- κ B regulates prenatal stress-induced cognitive impairment in offspring rats. *Behav. Neurosci.* 122, 331.
- Liu, D., Caldi, C., Sharma, S., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 2000. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.*
- Lucion, Aldo B., Pereira, Francine M., Winkelman, Elisa C., Sanvito, Gilberto L., Anselmo-Franci, Janete A., 2003. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behav. Neurosci.* 117, 894.
- Maccari, Stefania, Vincenzo Piazza, Pier, Kabbaj, Mohamed, Barbazanges, Arnaud, Simon, Hervé, Le Moal, Michel, 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J. Neurosci.* 15, 110–116.
- Maccari, Stefania, Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A.R., Cinque, C., Van Reeth, Olivier, 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 119–127.
- Mandyam, Chitra, Crawford, Elena F., Eisch, Amelia J., Rivier, Catherine L., Richardson, Heather N., 2008. Estrogen appears to both enhance proliferation and protect against cell death. *Dev. Neurobiol.* 68 (5), 575–589.
- Marín-Burgin, Antonia, Schinder, Alejandro F., 2012. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav. Brain Res.* 227, 391–399.
- Markham, Julie A., Taylor, Adam R., Taylor, Sara B., Bell, Dana B., Koenig, James I., 2010. Characterization of the cognitive impairments induced by prenatal exposure to stress in the rat. *Front. Behav. Neurosci.* 4.
- Martínez-Téllez, Rubelia Isaura, Hernández-Torres, Elizabeth, Gamboa, Gitalli, Flores, Gonzalo, 2009. Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. *Synapse* 63, 794–804.
- McEwen, Bruce S., 2003. Early life influences on lifelong patterns of behavior and health. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 9, 149–154.
- Meaney, Michael J., Aitken, David H., 1985. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Dev. Brain Res.* 22, 301–304.
- Meaney, Michael J., Aitken, David H., Van Berkel, Chayann, Bhatnagar, Seema, Sapolsky, Robert M., 1988. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 239, 766–768.
- Meerlo, Peter, Horvath, Katalin M., Nagy, György M., Bohus, Béla, Koolhaas, Jaap M., 1999. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J. Neuroendocrinol.* 11, 925–934.
- Ogawa, Testsuo, Mikuni, Masahiko, Kuroda, Yasukazu, Muneoka, Katsumasa, John Mori, Kazuhiro, Takahashi, Kiyohisa, 1994. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 961–967.
- Pham, Therese M., Söderström, Stine, Henriksson, Bengt G., Mohammed, Abdul H., 1997. Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behav. Brain Res.* 86, 113–120.
- Paul, Paul M., Meaney, Michael J., 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Mol. Brain Res.* 18, 195–200.
- Politch, Joseph A., Herrenkohl, Lorraine Roth, 1984. Effects of prenatal stress on reproduction in male and female mice. *Physiol. Behav.* 32, 95–99.
- Raineki, Charis, Lutz, Maiara Lenise, Sebben, Vanise, Ribeiro, Rosane Aparecida, Lucion, Aldo Bolten, 2013. Neonatal handling induces deficits in infant mother preference and adult partner preference. *Dev. Psychobiol.* 55, 496–507.
- Richards, S., Mychasiuk, R., Kolb, B., Gibb, R., 2012. Tactile stimulation during development alters behaviour and neuroanatomical organization of normal rats. *Behav. Brain Res.* 231, 86–91.
- Rimmele, Ulrike, Besedovsky, Luciana, Lange, Tanja, Born, Jan, 2015. Emotional memory can be persistently weakened by suppressing cortisol during retrieval. *Neurobiol. Learn. Mem.* 119, 102–107.
- Roggeri, Leda, Rivieccio, Bruno, Rossi, Paola, D'Angelo, Egidio, 2008. Tactile stimulation evokes long-term synaptic plasticity in the granular layer of cerebellum. *J. Neurosci.* 28, 6354–6359.
- Rohde, W., Ohkawa, T., Dobashi, K., Arai, K., Okinaga, S., Dörner, G., 1983. Acute effects of maternal stress on fetal blood catecholamines and hypothalamic LH-RH content. *Exp. Clin. Endocrinol.* 82, 268–274.
- Salomon, S., Bejar, C., Schorer-Apelbaum, D., Weinstock, M., 2011. Corticosterone mediates some but not other behavioural changes induced by prenatal stress in rats. *J. Neuroendocrinol.* 23, 118–128.
- Schwabe, Lars, Schächinger, Hartmut, de Kloet, E Ron, Oitzl, Melly S., 2010. Stress impairs spatial but not early stimulus–response learning. *Behav. Brain Res.* 213, 50–55.
- Son, Gi Hoon, Geum, Dongho, Chung, Sooyoung, Kim, Eun Joo, Jo, Ji-Hoon, Kim, Chang-Mee, Lee, Kun Ho, Kim, Hyun, Choi, Sukwoo, Kim, Hyun Taek, 2006. Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 26, 3309–3318.
- Stamatiki, A., Stamatiki, A., Pondiki, S., Stamatiki, A., Pondiki, S., Kitraki, E., Diamantopoulou, A., Panagiotaropoulos, T., Raftogianni, A., Stylianopoulou, F., 2008. Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress. *Stress* 11, 148–159.
- Szuran, Thomas F., Pliška, Vladimir, Pokorný, Jana, Welzl, Hans, 2000. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol. Behav.* 71, 353–362.
- Takahashi, Lorey K., Turner, Joel G., Kalin, Ned H., 1998. Prolonged stress-induced elevation in plasma corticosterone during pregnancy in the rat: implications for prenatal stress studies. *Psychoneuroendocrinology* 23, 571–581.
- Tanapat, Patima, Hastings, Nicholas B., Reeves, Alison J., Gould, Elizabeth, 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J. Neurosci.* 19, 5792–5801.
- Tanapat, Patima, Hastings, Nicholas B., Gould, Elizabeth, 2005. Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J. Comp. Neurol.* 481, 252–265.
- Tuchscherer, M., Kanitz, E., Otten, W., Tuchscherer, A., 2002. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86, 195–203.
- Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa, 2010. Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
- Vallée, Monique, Mayo, Willy, Deltu, Françoise, Le Moal, Michel, Simon, Hervé, Maccari, Stefania, 1997. 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.
- Vallée, Monique, Maccari, Stefania, Deltu, Françoise, Simon, Hervé, Le Moal, Michel, Mayo, Willy, 1999. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2906–2916.
- Waddell Jaylyn, Hanscom, Marie, Edwards N., Shalton, McKenna, Mary, C., McCarthy, Margaret M., 2015. Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioral outcomes in a rat model of neonatal HI. *Exp. Neurol.* 275, 285–295.
- Ward, Ingeborg L., Weisz, Judith, 1984. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology* 114, 1635–1644.
- Weinstock, Marta, 2007. Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. *Neurochem. Res.* 32, 1730–1740.
- Weinstock, Marta, Fride, Ester, Hertzberg, Raya, 1988. Prenatal stress effects on functional development of the offspring. *Prog. Brain Res.* 73, 319.
- Weinstock, Marta, Matlina, Erlena, Maor, Gilmor I., Rosen, Haim, McEwen, Bruce S., 1992. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res.* 595, 195–200.
- Weinstock, M., 2011. Sex-dependent changes induced by prenatal stress in cortical and hippocampal morphology and behaviour in rats: an update. *Stress* 14, 604–613.
- Welberg, Leonie A.M., Seckl, Jonathan R., Holmes, Megan C., 2000. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1047–1054.
- Welberg, Leonie A.M., Seckl, Jonathan R., 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J. Neuroendocrinol.* 13, 113–128.
- Wu, Jie, Song, Tian-Bao, Li, Yuan-Jie, He, Kan-Sheng, Ge, Ling, Wang, Li-Rong, 2007. Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKC β 1 expression and translocation in offspring rats. *Brain Res.* 1141, 205–213.
- Yaka, Rami, Salomon, Shiri, Matzner, Henry, Weinstock, Marta, 2007. 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.
- Yang, Jianli, Han, Huili, Cao, Jun, Li, Jingjiang, Xu, Lin, 2006. Prenatal stress modifies hippocampal synaptic plasticity and spatial learning in young rat offspring. *Hippocampus* 16, 431–436.
- Yu, In Tae, Lee, Sang-Hun, Lee, Yong-Sung, Son, Hyeon, 2004. Differential effects of corticosterone and dexamethasone on hippocampal neurogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 484–490.
- Zagron, Gal, Weinstock, Marta, 2006. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behav. Brain Res.* 175, 323–328.
- Zhang, Zhengyu, Zhang, Hua, Du, Baoling, Chen, Zhigiang, 2012. Neonatal handling and environmental enrichment increase the expression of GAP-43 in the

- hippocampus and promote cognitive abilities in prenatally stressed rat offspring. *Neurosci. Lett.* 522, 1–5.
- Zuena, Anna Rita, Mairesse, Jerome, Casolini, Paola, Cinque, Carlo, Sebastiano Alemà, Giovanni, Morley-Fletcher, Sara, Chiodi, Valentina, Giusto Spagnoli, Luigi, Gradini, Roberto, Catalani, Assia, 2008. Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PLoS One* 3, e2170.
- de Vries, Annick, Holmes, Megan C., Heijnis, Areke, Seier, Jürgen V., Heerden, Joritha, Louw, Johan, Wolfe-Coote, Sonia, Meaney, Michael J., Levitt, Naomi S., Seckl, Jonathan R., 2007. Prenatal dexamethasone exposure induces changes in nonhuman primate offspring cardiometabolic and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *J. Clin. Invest.* 117, 1058.