

# Un modelo animal de separación materna para el estudio de los efectos de “programación” neurometabólica del estrés neonatal

*An animal model of maternal deprivation for the study of neurometabolic “programming” effects of neonatal stress*

María Paz Viveros<sup>1</sup>, Álvaro Llorente Berzal<sup>2</sup>, Virginia Mela<sup>3</sup>, Ricardo Llorente<sup>4</sup>,  
Eva María Marco<sup>5</sup>, Meritxell López Gallardo<sup>6</sup>

## Resumen

*La aplicación de modelos animales en diversos campos de las neurociencias, incluyendo la psiquiatría, es a pesar de sus limitaciones una herramienta fundamental para la investigación de los mecanismos neurobiológicos subyacentes a diversas enfermedades desde una perspectiva traslacional. En este artículo presentamos y discutimos los datos procedentes de un modelo animal de estrés en etapas tempranas del desarrollo. En particular, exponemos evidencias acerca de diversas alteraciones psiconeuroinmunoendocrinas que aparecen, a lo largo de la vida, como consecuencia de someter a ratas Wistar neonatales a un episodio de estrés por separación materna de 24 horas a día postnatal 9. Discutimos la utilidad de este protocolo como modelo de alteraciones no solo neuropsiquiátricas, sino también metabólicas e inmunológicas, con base en el desarrollo. Finalmente, proponemos una hipótesis-modelo de trabajo en el que la leptina*

<sup>1</sup>Catedrática del Departamento de Fisiología Animal (Fisiología Animal II), Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>2</sup>Colaborador honorífico postdoctoral del Departamento de Fisiología Animal (Fisiología Animal II), Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>3</sup>Estudiante predoctoral del Departamento de Fisiología Animal (Fisiología Animal II), Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>4</sup>Colaborador honorífico postdoctoral del Departamento de Fisiología Humana, Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>5</sup>Profesora ayudante doctor del Departamento de Fisiología Animal (Fisiología Animal II), Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>6</sup>Profesora titular del Departamento de Fisiología Humana, Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

**Correspondencia:** Dra. María Paz Viveros  
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid  
C/ Jose Antonio Novais 12  
28040 Madrid, España.  
E-mail: pazviver@bio.ucm.es

---

podría considerarse como nexo de unión entre los cambios neurales, metabólicos e inmunológicos encontrados en los animales separados de la madre.

**Palabras clave:** Separación materna temprana. Neurodesarrollo. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Leptina.

### Summary

*Animal models are paramount in neuroscience and, in particular, in psychiatry, despite they have a number of limitations in relation to translation to the human condition. In fact, the use of animal models in translational research is fundamental for the investigation of the neurobiological mechanisms underlying several neuropsychiatric disorders. In this review, we present and discuss data from an animal model of early life stress consisting of a single prolonged episode (24h) of early maternal deprivation at postnatal day 9 in Wistar rats. We describe a number of psycho-neuro-immune-endocrine changes shown by the maternally deprived animals from the neonatal period throughout the adulthood. Herein, we discuss the relevance of this procedure not only for its value in modelling neuropsychiatric disorders, but also for inducing important metabolic and immunological changes, with a neurodevelopmental origin. We propose a hypothetical working model in which leptin may play a central role in connecting the neural, metabolic and immune changes reported in the maternally deprived animals.*

**Key words:** Early maternal deprivation. Neurodevelopment. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis. Leptin.

## UTILIDAD DE LOS MODELOS ANIMALES

Una de las limitaciones más evidentes en la aplicación de modelos animales para el estudio de enfermedades psiquiátricas es que resulta imposible reproducir todos los aspectos de la enfermedad, debido a la complejidad de su sintomatología en humanos. Sin embargo, es posible atender a componentes fenotípicos específicos para diseñar modelos animales adecuados que contribuyan a arrojar luz sobre los mecanismos neurobiológicos subyacentes a determinados signos o síntomas, lo que puede resultar muy útil para la mejora de las intervenciones terapéuticas y las estrategias de prevención. Los trabajos en animales de laboratorio, particularmente en rata y ratón, permiten el control de diversos parámetros ambientales, así como cierto tipo de manipulaciones que por razones éticas y/o prácticas son imposibles en humanos. Más aún, si tenemos en cuenta la duración media de la vida en estas especies (unos dos años), podemos realizar estudios que abarquen desde el período prenatal hasta el envejecimiento en unos lapsos de tiempo relativamente cortos que, sin embargo, nos permiten tener una visión completa y dinámica del desarrollo.

## SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA, UN MODELO DE ALTERACIONES NEUROPSIQUIÁTRICAS CON ORIGEN EN EL NEURODESARROLLO

Según numerosas evidencias, las experiencias traumáticas en edades tempranas podrían estar asociadas con el desarrollo de algunas psicopatologías (tales como la esquizofrenia o la depresión) (Kendler, Sheth, Gardner y Prescott, 2002; Morgan, Kirkbride, Leff, Craig, Hutchinson, McKenzie *et al*, 2007), así como con alteraciones neuroendocrinas (Levine, 2005; Moffett, Vicentic, Kozel, Plotsky, Francis y Kuhar, 2007; Tyrka, Wier, Price, Ross, Anderson, Wilkinson *et al*, 2008). Unas inadecuadas interacciones con los padres (abandono, maltrato, abuso...), la malnutrición y otros tipos de estrés en períodos críticos del desarrollo pueden contribuir a la aparición de trastornos psiquiátricos y metabólicos, que se manifiesten en edades posteriores (adolescencia/edad adulta) de la vida del individuo. A este respecto, se han desarrollado diversos protocolos experimentales con objeto de “modelizar” diferentes condiciones de estrés perinatal. Entre ellos, nos interesan en esta ocasión los estudios de separación materna temprana que,

como su nombre indica, consiste en separar a la madre de la prole durante el período neonatal. Este modelo, desarrollado tanto en roedores como en primates no humanos, presenta dos variantes principales: una de ellas consiste en la separación materna relativamente corta (3-6 horas), que puede realizarse de forma diaria durante períodos de diversa duración dependiendo del protocolo experimental específico empleado, mientras que la otra consiste en un único episodio de separación de la madre, de 24 horas de duración. En roedores, suele realizarse la separación de la prole de su madre durante las dos primeras semanas del desarrollo postnatal (ver para revisión: Cirulli, Francia, Berry, Aloe, Alleva y Suomi, 2009; Marco, Adriani, Llorente, Laviola y Viveros, 2009). Durante los últimos años, nuestro grupo de investigación viene realizando una serie de trabajos encaminados a la caracterización de un procedimiento concreto de separación materna (SM), al que dedicaremos este artículo de revisión. En este protocolo, que realizamos en ratas de la cepa Wistar, la camada se separa de la madre durante 24h a día postnatal (DPN) 9. Estudios previos, fundamentalmente de Ellenbroek y colaboradores (ver por ejemplo: Ellenbroek, de Bruin, van Den Kroonenburg, van Luijtelaaar y Cools, 2004; Ellenbroek, Derks y Park, 2005), habían descrito que las ratas sometidas a este tipo concreto de estrés neonatal presentaban, en la edad adulta, alteraciones comportamentales que recuerdan a signos de tipo psicótico, tales como afectación de la respuesta de inhibición prepulso (PPI), de la respuesta de sobresalto y de la respuesta de inhibición latente, así como hipersensibilidad a agentes “dopamiméticos” como la anfetamina o la apomorfina. Es importante señalar que el procedimiento de SM indujo esas anormalidades comportamentales similares a ciertos signos de tipo esquizofrénico en ratas adultas de la cepa Wistar, pero no en ratas de las cepas Fischer 344 o Lewis, (Ellenbroek y Cools, 2000), lo que apunta a la importancia del *background* genético. En cuanto a posibles correlatos neuroquímicos, los animales adultos expuestos al protocolo de SM mostraron, entre otros cambios, una reducción significativa de los niveles de la molécula de adhesión celular neural polisializada (PSA-NCAM) y del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), así como unos menores niveles

de expresión de ARNm para las subunidades del receptor N-metil-D aspartato (NMDA) de glutamato, NR-2A y NR-2B, en el hipocampo (Roceri, Hendriks, Racagni, Ellenbroek y Riva, 2002). Estos cambios sugieren una pérdida de la plasticidad sináptica, así como una hipofuncionalidad del sistema glutamatérgico, fenómenos que han sido recientemente propuestos como posible sustrato neurobiológico en la etiopatogénesis de la esquizofrenia. Cabe señalar que en un estudio reciente se ha observado que las ratas SM mostraban, al ser estudiadas en edad adulta/joven, alteraciones en el tamaño del neocórtex y del hipocampo, en el número de neuronas en la corteza prefrontal y retrosplenial y en la expresión de NeuN (marcador neuronal) en el hipocampo y la neocorteza, dos regiones íntimamente implicadas en la función cognitiva (Aksić, Radonjić, Aleksić, Jevtić, Marković, Petronijević *et al*, 2013). Probablemente estas alteraciones sean el resultado de una pérdida neuronal durante el desarrollo causada por el estrés neonatal.

## CARACTERIZACIÓN PSICONEUROIMNUNOENDOCRINA DEL MODELO DE SEPARACIÓN MATERNA

En nuestro grupo de investigación hemos realizado durante los últimos años una extensiva caracterización del modelo de SM en ratas de ambos sexos. Exponemos a continuación algunos de los resultados más relevantes. Hemos podido observar que, en edad adolescente, los animales separados de la madre según el protocolo 24h a DPN 9 mostraban alteraciones comportamentales indicativas de una peor respuesta al estrés o sintomatología de tipo depresivo en el test de natación forzada y una tendencia a una mayor impulsividad (Llorente, Arranz, Marco, Moreno, Puerto, Guaza *et al*, 2007; Marco, Adriani, Canese, Podo, Viveros, Laviola, 2007; Marco *et al*, 2009). En cuanto a alteraciones a nivel cerebral, pudimos comprobar que los animales adolescentes SM mostraron una clara modificación de su sistema serotoninérgico, que se tradujo en un incremento de los niveles de serotonina en el hipocampo, el mesencéfalo, la corteza frontal y el estriado, así como una elevación en los niveles de dopamina en el estriado (Llorente, O’Shea, Gutiérrez-López, Llorente-Berzal, Colado, Viveros, 2010). Además, también en pe-

ríoado adolescente, encontramos en los animales SM alteraciones importantes en marcadores neuronales y gliales, y marcadores de plasticidad sináptica en la formación hipocámpal y en la corteza frontal. Por ejemplo: disminuciones en el marcador neuronal NeuN, en el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), en la proteína de densidad postsináptica PSD95, en la proteína presináptica sinaptofisina y en la molécula de adhesión celular neural (NCAM); así como un aumento en la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), marcador astroglial (Marco, Valero, de la Serna, Aisa, Borcel, Ramírez *et al.*, 2013). También hemos descrito en los animales SM adultos un deterioro en la memoria, medida en la prueba de “reconocimiento de objeto nuevo (*novel object recognition test*)”, así como una reducción de sinaptofisina y BDNF (Llorente, Miguel-Blanco, Aisa, Lachize, Borcel, Meijer *et al.*, 2011). Sin embargo, no hemos encontrado en nuestros estudios que este protocolo de SM induzca alteración de la PPI (Llorente-Berzal, Fuentes, Gagliano, López-Gallardo, Armario, Viveros *et al.*, 2011) aunque, tal como hemos indicado anteriormente, algunos autores como Ellenbroek y colaboradores sí encontraron esta alteración. El hecho de que no todos los autores la hayan descrito nos hace pensar que se trata de un modelo experimental muy sensible a factores, no solo genéticos (no en todas las estirpes de rata se encuentra la alteración de la PPI), sino también muy probablemente a factores ambientales, incluida la propia manipulación de los animales que puede variar dependiendo de los experimentos concretos.

## PERÍODO DE HIPO-REACTIVIDAD AL ESTRÉS

Un aspecto muy importante del modelo de SM es que el período preciso en el que se produce la SM parece ser crucial en relación a los efectos que se observan a largo plazo. Por ejemplo, la magnitud del impacto sobre la PPI depende del día en que se realiza la SM, de manera que la reducción más drástica de la PPI ocurría precisamente cuando la separación se hacía a DPN 9 (en comparación con los DPN 3 o 13) (Ellenbroek y Riva, 2003). Otros autores han observado que un procedimiento de separación materna, muy similar al empleado por nosotros, inhibe el refuerzo de la

potenciación a largo plazo (LTP) a nivel celular inducido por un estrés de natación forzada en animales adolescentes, lo que indica un procesamiento distorsionado de la información en estos animales, a nivel celular. De nuevo, la alteración de la mencionada LTP se producía si la separación era a DPN 9, pero no a DPN 4 o a DPN 18 (Gruss, Braun, Frey y Korz, 2008). Así pues, parece que en torno al DPN 9 existe una ventana de mayor vulnerabilidad, al menos en relación con ciertos efectos de la SM. En roedores se ha descrito el denominado período de baja respuesta al estrés (SHRP, del inglés *stress hyporesponsive period*), que abarca, aproximadamente, desde el día 4 al 14 posnatal y que se caracteriza principalmente porque el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) presenta una acusada hipoactividad o capacidad de respuesta disminuida. En efecto, durante este período la glándula adrenal de los roedores tiene una sensibilidad muy reducida a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), y los animales tienen unos niveles plasmáticos de corticosterona (CORT) y ACTH extremadamente bajos si los comparamos con los que presentan los animales adolescentes o adultos. Es más, fenómenos estresantes, que provocarían un aumento significativo en los niveles de CORT en los animales adultos, apenas provocan una activación de este sistema en los animales neonatos. La existencia de este período parece tener una función de carácter protector, dado que una elevación de los glucocorticoides podría tener efectos deletéreos sobre el cerebro en desarrollo. Se supone que el mantenimiento de unos bajos niveles de glucocorticoides, durante este período crítico del desarrollo del cerebro, protege y facilita la consecución de procesos esenciales del neurodesarrollo necesarios para la correcta maduración del sistema nervioso (Vázquez y Levine, 2005; Varga, Ferenci, Kovács, Garafova, Jezova y Zelena, 2013). Hemos demostrado que el protocolo de SM al que nos venimos refiriendo (24h a DPN 9) supone un estrés de suficiente magnitud como para producir un aumento significativo de CORT (el principal glucocorticoide en la rata) observable a DPN 10 e incluso a DPN 13 (Viveros, Llorente, López-Gallardo, Suárez, Bermúdez-Silva, De la Fuente *et al.*, 2009; Viveros, Díaz, Mateos, Rodríguez y Chowen, 2010), es decir, capaz de “superar” de alguna forma esa barrera de protección que supone

el período de hipo-reactividad al estrés. Es plausible que este aumento de CORT justo en el medio del SHRP produzca efectos perjudiciales sobre el desarrollo del cerebro. Desde esta perspectiva, resulta explicable que, según los datos de Ellenbroek y Gruss expuestos anteriormente, el período durante el cual parece tener más “eficacia” el estrés de la SM se corresponda con la parte central del SHRP, es decir, cuando se realiza a DPN 9 en vez de a DPN 3-4 (principio del SHRP) o a DPN 18 (después del SHRP).

### **ALTERACIONES EN EL DESARROLLO DEL CEREBRO INDUCIDAS POR LA SEPARACIÓN MATERNA**

Según la teoría del neurodesarrollo, anomalías y distorsiones del desarrollo del cerebro, causadas por factores tanto genéticos como ambientales, afectarían al comportamiento en etapas posteriores de la vida y conducirían a la emergencia de enfermedades psiquiátricas tales como la esquizofrenia, el trastorno bipolar o el autismo (Fatemi y Folsom, 2009; Owen, O’Donovan, Thapar y Craddock, 2011). De acuerdo con tal hipótesis, nosotros propusimos que las alteraciones comportamentales observadas en los animales SM, tanto en la adolescencia como en la edad adulta, podrían ser consecuencia de un inadecuado proceso de neurodesarrollo, que a su vez podría estar relacionado, al menos en parte, con el incremento en los niveles de CORT inducido por el episodio de SM. Con el fin de confirmar esta hipótesis, nos centramos en dos estructuras que muestran una elevada densidad de receptores para glucocorticoides, la formación hipocampal y el cerebelo, y analizamos por medio de técnicas inmunohistoquímicas, las posibles alteraciones neuronales y gliales que pudieran mostrar en esas regiones ratas SM de 13 días de edad. La SM indujo un aumento de neuronas en proceso de degeneración (Fluor Jade C positivas) y un aumento en el número de células GFAP positivas (células astrogiales puesto que GFAP es un anticuerpo que se une a la proteína glial fibrilar ácida, principal filamento intermedio de las células de astroglia) en la formación hipocampal y en la corteza cerebelosa que, en líneas generales, fueron más marcadas en los machos (Llorente, Llorente-Berzal, Petrosino, Marco, Guaza,

Prada *et al.*, 2008; López-Gallardo, Llorente, Llorente-Berzal, Marco, Prada, Di Marzo *et al.* 2008; Llorente, López-Gallardo, Llorente-Berzal, Prada, García-Segura y Viveros, 2009; Viveros *et al.*, 2009). Además, mediante técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (HRMAS), pudimos comprobar que los animales SM de 13 días de edad mostraban importantes cambios en el perfil metabólico, tanto en la formación hipocampal como en la corteza prefrontal. En concreto, se encontraron alteraciones en los niveles de N-acetil aspartato, glutamina y glutamato, taurina, colina y fosforiletanolamina, cuya naturaleza dependió del sexo de los animales y del área cerebral analizada (Llorente, Villa, Marco y Viveros, 2012). Es importante destacar que, a la misma edad neonatal (DPN 13), encontramos un incremento en los niveles de CORT, así como una reducción significativa en los niveles plasmáticos de leptina (LEPT) en los animales SM (Viveros *et al.*, 2009). El hecho de que los niveles de LEPT permanecieran bajos a DPN 13 nos llamó especialmente la atención. Parecía esperable que los niveles de esta hormona se redujeran durante el período de SM puesto que, durante ese tiempo, los animales son privados de alimentación (leche materna), sin embargo, a los 3 días de volver a reunirse con la madre, la LEPT estaba aún claramente disminuida. Teniendo en cuenta las funciones neuroprotectoras y neurotróficas que recientemente se le han atribuido a la LEPT (Garza, Guo, Zhang y Lu, 2008; Signore, Zhang, Weng, Gao y Chen, 2008; Kumral, Yesilirmak, Sozmen, Ergur, Tugyan, Ozbal *et al.*, 2012) y su función durante el desarrollo (Bouret, 2010), nos planteamos la posibilidad de que no solo el aumento de CORT, sino quizá también una disminución mantenida de la LEPT, pudiera tener un efecto deletéreo sobre el neurodesarrollo temprano. En secciones posteriores se desarrolla este concepto.

### **EFFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA SOBRE EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE**

Como indicamos anteriormente, el grupo de Ellenbroek había demostrado que en la edad adulta los animales separados de la madre mostraban alteraciones comportamentales de tipo psicótico. Existen diversas evidencias que relacionan al sis-

tema endocannabinoide (SEC) con la esquizofrenia, por ejemplo, el consumo de cannabis puede incrementar significativamente el riesgo de padecer ataques psicóticos y esquizofrenia y se han descrito alteraciones del SEC en pacientes esquizofrénicos (ver por ejemplo: Fernández-Espejo, Viveros, Núñez, Ellenbroek y Rodríguez de Fonseca, 2009; Burns, 2013). El SEC desempeña un papel crucial en el desarrollo cerebral (Gaffuri, Ladarre y Lenkei, 2012; Viveros, Llorente, Suárez, Llorente-Berzal, López-Gallardo y de Fonseca, 2012) y actúa como un modulador fisiológico frente al estrés (Viveros, Llorente, Moreno y Marco, 2005; Hill, Patel, Campolongo, Tasker, Wotjak y Bains, 2010). El procedimiento de SM descrito en este artículo supone claramente un estrés importante en una época clave de la vida y afecta al desarrollo del cerebro. Más aún, habíamos mostrado en estudios anteriores que los animales SM mostraban respuestas alteradas a compuestos cannabinoídeos (Llorente *et al.*, 2007) que sugerían una interacción de este tipo de estrés con el SEC. Basándonos en estas premisas, nuestra siguiente hipótesis fue que la SM neonatal podría inducir alteraciones en el SEC y nuestros resultados confirmaron esta hipótesis. Los animales neonatos (DPN 13) que habían sido sometidos al protocolo de SM mostraron unos niveles elevados del endocannabinoide 2-araquidónico glicerol (2-AG) y un descenso de la inmunoreactividad de los receptores CB1 en la formación hipocampal. Una vez más, estas alteraciones fueron más marcadas en los machos. En consonancia con el incremento de 2-AG, también encontramos una reducción significativa de la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL), enzima responsable de la degradación de este endocannabinoide, en la formación hipocampal de los animales SM, y este efecto fue de nuevo más marcado entre los machos (Suárez, Llorente, Romero-Zerbo, Mateos, Bermúdez-Silva, de Fonseca *et al.*, 2009; Suárez, Rivera, Llorente, Romero-Zerbo, Bermúdez-Silva, de Fonseca *et al.*, 2010). Este dimorfismo sexual se encuentra en línea con los resultados previos, en los cuales los efectos neurales y gliales de la SM eran más evidentes entre los animales macho a esta misma edad. En el período adolescente, los animales SM mostraron también una expresión reducida del receptor CB1 en la formación hipocampal y la corteza frontal, que a esta edad fue de-

tectable tanto en machos como en hembras (Marco *et al.*, 2013). En conjunto, estos resultados apuntan a una clara asociación entre la exposición a situaciones de estrés en etapas tempranas de la vida y una desregulación del SEC, asociación que puede ser relevante para los casos de enfermedades mentales con origen en el neurodesarrollo.

### **SEPARACIÓN MATERNA Y ALTERACIONES METABÓLICAS Y ENDOCRINAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO Y LA FUNCIÓN REPRODUCTORA. PAPEL DE LA LEPTINA**

Otro hallazgo interesante, realizado por otros autores y ratificado en varios estudios por nuestro grupo, es que los animales SM muestran una reducción del peso corporal que se extiende hasta bien entrada la adolescencia o incluso la edad adulta, lo que sugiere una disfunción metabólica (Llorente *et al.*, 2011; Llorente-Berzal *et al.*, 2011; Mela, Llorente-Berzal, Díaz, Argente, Viveros y Chowen, 2012). También en este caso resulta ser crucial el período en el que las crías se someten a la separación de la madre, de hecho, solo los animales expuestos al estrés de SM durante 24 horas el DPN 9 mostraron este efecto a largo plazo sobre el peso corporal, mientras que este efecto no se encontraba si la separación se realizaba los DPNs 4 o 18 (Gruss *et al.*, 2008). Estos resultados nos hicieron pensar en algún otro factor que pudiera ser relevante durante el período de SM y que estuviera asociado con factores nutricionales y metabólicos. En concreto, enfocamos nuestro interés en la LEPT, cuyos niveles habíamos visto disminuidos a DPN 13 en los animales SM. Además de su papel en la regulación del equilibrio energético en la vida adulta, datos recientes sugieren que la LEPT puede tener un rango más amplio de acciones, particularmente durante el crecimiento y el desarrollo. Diversos estudios en animales han demostrado un aumento posnatal notable en los niveles de LEPT. Se ha observado que, en ratas macho, la LEPT en plasma aumenta entre los DPNs 4 y 14 y llega a un nivel máximo en el DPN 10 (Delahaye, Breton, Risold, Enache, Dutriez-Casteloot, Laborie *et al.*, 2008; Cottrell, Cripps, Duncan, Barrett, Mercer, Herwig *et al.*, 2009). El

origen de este aumento posnatal es aún controvertido. Se ha sugerido que la leche materna podría constituir una de las principales fuentes de la LEPT circulante en ratas neonatales. Lo que parece claro es que estos niveles elevados de LEPT no ejercen el mismo efecto que en el adulto, de hecho, la LEPT no es capaz de modular la alimentación o el gasto de energía hasta después de la segunda semana postnatal, a pesar de que el receptor de LEPT se expresa y es funcional durante este tiempo. Estudios recientes han proporcionado evidencia de un papel crucial de la LEPT en el desarrollo neonatal del sistema de circuitos hipotalámicos implicados en la regulación central del balance energético. El momento de la oleada de LEPT posnatal coincide con un período de sensibilidad de las neuronas en desarrollo a un efecto neurotrófico de la LEPT, y esta exposición posnatal a la LEPT parece ser crítica para el crecimiento de las proyecciones neuronales que parten desde el núcleo arqueado (Bouret y Simerly, 2006; Cottrell y Ozanne, 2008; Bouret, 2010). Como se ha mencionado arriba, los estudios de Gruss y colaboradores (2008) mostraron que el protocolo de SM es solo efectivo en cuanto a su capacidad de inducir un descenso del peso corporal a largo plazo si se realiza a DPN 9, mientras que este efecto no se encontraba si la separación se realizaba a DPN 4 o a DPN 18. Este intervalo de eficacia coincide con el aumento fisiológico posnatal de la LEPT, que alcanza el máximo, precisamente el DPN 10. Por tanto, el estrés de la SM podría estar interfiriendo con ese pico fisiológico de LEPT que parece ser crucial para el desarrollo de los circuitos hipotalámicos que, en la edad adulta, se encargan de la correcta regulación del balance energético. Decidimos pues profundizar en los efectos de la SM sobre la LEPT circulante, realizando un estudio de la evolución de los niveles de LEPT en varios puntos antes (punto 0), durante (12 h) y después (24 h y 36 h) de la separación de la madre, así como sobre el desarrollo del hipotálamo. La SM redujo de forma drástica los niveles de LEPT durante todo el período de estudio en ambos sexos (también se observaron CORT aumentada y glucosa disminuída durante el mismo período en los animales SM). Por mencionar algunos parámetros que se vieron afectados de forma sex-dependientes en el hipotálamo. A las 12 h y 24 h del co-

mienzo de la SM, se encontraron disminuciones significativas en los niveles de ARNm de factor de crecimiento insulínico y de BDNF en el hipotálamo de los machos, mientras que en hembras se encontraron niveles de nestina disminuidos a las 24 de iniciada la SM (Viveros *et al*, 2010a). Es decir, que la SM produjo efectos sexo dependientes sobre el desarrollo del hipotálamo. En otro estudio confirmamos que a DPN 13, es decir, 3 días después de volver a reunir a las crías con su madre, siguen observándose una significativa reducción de LEPT y modificaciones en marcadores de *turn-over*/maduración celulares en el hipotálamo (Viveros, Llorente, Díaz, Romero-Zerbo, Bermúdez-Silva, Rodríguez de Fonseca *et al*, 2010), lo que refuerza la idea de un efecto de la SM sobre el desarrollo del hipotálamo, en el que la reducción de los niveles de LEPT podría tener un papel crucial. De forma interesante, la reducción de los niveles de LEPT en los animales sometidos a SM está presente también cuando estos animales alcanzan la edad adulta. Además, los animales SM adultos también mostraron unos niveles significativamente reducidos de adiponectina en plasma (Viveros *et al*, 2010b). Los cambios endocrinos en los niveles de LEPT y adiponectina a largo plazo parecen apoyar la idea de que nuestro modelo de SM ejerce un efecto de “programación”, que afecta a importantes mecanismos relacionados con los procesos reguladores del balance energético, lo que probablemente explique el efecto duradero sobre el peso corporal. Más aún, también hemos encontrado recientemente que los animales SM adultos muestran una respuesta alterada a una dieta alta en grasa (Mela *et al*, 2012), lo que de nuevo parece apoyar la hipótesis de que la SM podría modificar de forma persistente la capacidad de regulación metabólica. Las alteraciones hormonales de los animales SM adultos alcanzan también a hormonas relacionadas con la reproducción, de manera que otra consecuencias de la SM, observada a largo plazo, es una marcada reducción en los niveles de testosterona y estradiol en los machos SM adultos, que sugieren alteraciones en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG) y en la función reproductora (Llorente *et al*, 2011). Además, la SM indujo a largo plazo una reducción significativa en los niveles del receptor glucocorticoide tipo GR hipocampal, lo que sugiere

una alteración en los mecanismos de *feed-back* del eje HHA que, como se sabe, es crucial en la regulación de la respuesta al estrés (Llorente *et al*, 2011). Resulta interesante recordar aquí dos aspectos que podrían relacionar las alteraciones del eje HHA y de la función reproductiva de los machos SM con su déficit de LEPT. Por un lado, esta hormona ejerce acciones sobre el funcionamiento del eje HHA (Roubos, Dahmen, Kozicz y Xu, 2012). Por otra parte, diversos estudios indican un papel de la LEPT en la regulación de la función reproductora. De hecho, la LEPT parece actuar a todos los niveles del eje HHG en los machos (Landry, Cloutier y Martin, 2013).

## EFFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNA SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

La SM provocó un deterioro significativo de la función inmune a lo largo de la vida de los individuos. Así, tan solo tres días después de la SM, a DPN 13, se observó en los animales SM una reducción en el número de células *natural killer* (NK) en timo, así como una menor respuesta linfoproliferativa frente a un antígeno y quimiotaxis reducida en timo y bazo, efectos que también se observaron en la adolescencia (DPN 40). En edad adulta (DPN 75) los animales SM siguieron mostrando una disminución de la actividad de las células NK en timo y bazo y de la actividad linfoproliferativa frente a mitógeno y de la quimiotaxis en timo (ver para revisión: De la Fuente, Llorente, Baeza, De Castro, Arranz, Cruces *et al*, 2009; Viveros *et al*, 2009).

Al analizar los distintos componentes estresantes del modelo de SM, es importante considerar el impacto que un episodio agudo pero duradero (24 h) de ayuno (leche materna) y de falta de contacto físico con la madre pueden tener sobre el desarrollo del sistema inmunológico. La nutrición en etapas tempranas de la vida puede afectar a la competencia del sistema inmunitario en edades posteriores, incluyendo la capacidad para organizar una respuesta inmune apropiada frente a una infección o para reconocer adecuadamente determinados antígenos, y en el desarrollo de trastornos inmunológicos (Calder, Krauss-Etschmann, de Jong, Dupont, Frick, Frokiaer *et al*, 2006; Palmer, 2011). Los sistemas inmunológico y endo-

crino están relacionados entre sí a través de una red bidireccional en el que las hormonas afectan la función inmune y, a su vez, la respuesta inmune se refleja en cambios neuroendocrinos. En este contexto, la hiper-activación del eje HHA de las crías al ser separadas de la madre (y muy probablemente el estrés ocasionado en la propia madre al verse privada de sus crías) podrían también contribuir con un efecto de “programación” en el sentido de afectar negativamente el desarrollo del sistema inmunitario de los animales SM (Charmandari, Kino, Souvatzoglou y Chrousos, 2003; Bjorksten, 2008; Palmer, 2011). Conviene también tener en cuenta que, además de sus funciones metabólicas, tanto la LEPT como la adiponectina están implicadas en la regulación de las respuestas inmunes (Fantuzzi, 2008; Carbone, La Rocca y Matarese, 2012). Por ejemplo, condiciones que conllevan una reducción de la producción de LEPT tales como la deficiencia genética de LEPT, la anorexia nerviosa o la desnutrición, se asocian con un aumento de la susceptibilidad a las infecciones. Lo que nos lleva a pensar que los niveles reducidos de estas hormonas en los animales SM adultos pueden también estar relacionados con las alteraciones de su sistema inmunológico. La LEPT podría representar el “eslabón perdido” entre la respuesta inmune, la función metabólica y el *status* nutricional (Farooqi, Matarese, Lord, Keogh, Lawrence, Agwu *et al*, 2002; La Cava y Matarese, 2004). Nuestros hallazgos sugieren que el modelo de SM puede ser útil para investigar más a fondo cómo una deficiencia de LEPT, ocasionada por ejemplo por problemas de desnutrición en períodos tempranos del desarrollo –particularmente durante la lactancia–, podría tener cierto efecto de “programación” que distorsionara el correcto desarrollo del sistema inmunológico.

## CONSIDERACIONES FINALES

El presente protocolo de SM puede constituir un modelo animal, no solo de alteraciones comportamentales que recuerdan signos de tipo psiquiátrico, sino también de alteraciones endocrino-metabólicas e inmunológicas, con un origen en el neurodesarrollo. Respecto a las perturbaciones de la programación neuroendocrina, presuntamente causadas por la SM, tienen especial relevancia el



período de hipo-reactividad al estrés y el pico fisiológico de LEPT que coinciden, básicamente, con el período en el que se realiza el protocolo de SM en el modelo descrito (DPN 9 a 10). La elevación de CORT inducida por el estrés de la SM consigue superar los mecanismos que mantienen una hipo-actividad corticoadrenal de carácter neuroprotector. Por otra parte, la SM induce una marcada disminución de los niveles de LEPT justo en el intervalo temporal en el que, en condiciones fisiológicas, aparece un pico de esta hormona que, durante este período del desarrollo temprano, ejerce funciones neurotróficas. Hemos descrito alteraciones en los niveles plasmáticos de glucocorticoides, de hormonas sexuales y de LEPT, sistemas endocrinos cuya regulación reside de manera fundamental en el hipotálamo. Por tanto, cabe hipotetizar que la SM temprana haya producido un desarrollo inadecuado de los correspondientes circuitos hipotalámicos que, a su vez, haya comprometido la funcionalidad de estos sistemas fisiológicos. Más aún, en vista de las acciones extrahipotalámicas y las implicaciones en alteraciones psiquiátricas que recientemente se han atribuido a la LEPT (Oomura, Hori, Shiraishi, Fukunaga, Takeda, Tsuji *et al*, 2006; Udagawa, Hashimoto, Suzuki, Hatta, Sotomaru, Hioki *et al*, 2006; Walker, Naef, d'Asti, Long, Xu, Moreau *et al*, 2008; Paz-Filho, Wong y Licinio, 2010; Zupancic y Mahajan, 2011), resulta plausible que los niveles reducidos de LEPT de los animales SM estén relacionados con sus alteraciones comportamentales, e incluso que la interferencia con el pico fisiológico neonatal de LEPT por el estrés de la SM, pueda contribuir también a perturbar el desarrollo de otras estructuras cerebrales como la formación hipocámpal o el córtex prefrontal. Según el modelo-hipótesis de trabajo que proponemos, estas alteraciones del neurodesarrollo inducidas por unos niveles de CORT aumentados y unos niveles de LEPT disminuidos tendrían consecuencias comportamentales (alteraciones en respuestas emocionales, función cognitiva...), observables en la edad adolescente y en la edad adulta. Nuestros resultados indican que el modelo de SM que venimos utilizando es capaz de inducir efectos persistentes sobre mecanismos implicados en el control metabólico, así como alteraciones en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal y en el sistema inmuni-

tario, funciones todas ellas en las que se halla implicada la LEPT. Esta hormona podría tener un papel clave en la “intersección” de estas alteraciones funcionales (Dalamaga, Chou, Shields, Papa-georgiou, Polyzos y Mantzoros, 2013). Hasta lo que nosotros conocemos, no existen datos sobre un posible período crítico de elevación de LEPT neonatal/perinatal en humanos, que pudiera ejercer funciones neurotróficas. Sugerimos que podría ser interesante una mayor profundización en cuanto a las funciones de la LEPT durante el período perinatal en la especie humana y las posibles repercusiones del estrés perinatal sobre las múltiples funciones en las que parece estar implicada esta hormona “pleiotrópica”.

Por cuestiones de limitación de espacio, no podemos discutir en profundidad las diferencias sexuales que hemos encontrado a lo largo de nuestros estudios de separación materna. Hemos indicado algunos efectos sexo-dependientes de la SM sobre estructuras cerebrales en desarrollo. Remitimos al lector a algunas de nuestras revisiones sobre el interés de los dimorfismos sexuales que afectan a aspectos tanto psicofisiológicos como psicopatológicos; y hacemos hincapié en la importancia del período crítico de diferenciación sexual del cerebro, así como en las diferencias en la temporalidad del neurodesarrollo entre ambos sexos (ver para revisiones: Viveros *et al*, 2009; Viveros *et al*, 2012a; Viveros, Mendrek, Paus, López-Rodríguez, Marco, Yehuda *et al*, 2012). La existencia de una o más ventanas de especial vulnerabilidad durante el período perinatal sugiere la existencia de etapas clave en las que el cerebro pueda ser particularmente vulnerable a sucesos estresantes, probablemente porque se estén llevando a cabo procesos clave del neurodesarrollo. La identificación de estas etapas en la especie humana y las posibles diferencias temporales en ambos sexos requiere una mayor investigación.

## AGRADECIMIENTOS

MICINN BFU2009-10109, MINECO: BFU2012-38144, Financiación GRUPOS UCM-BSCH GRUPO UCM 951579, Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de Investigación Cooperativa en salud, RTA: RD2012/0028/0021.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Aksić, M., Radonjić, NV., Aleksić, D., Jevtić, G., Marković, B., Petronijević, N., Radonjić, V. y Filipović, B.** (2013). Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 73(3): 394-403.
2. **Björkstén, B.** (2008). Environmental influences on the development of the immune system: consequences for disease outcome. Nestlé Nutrition workshop series. *Paediatric programme*, 61: 243-254.
3. **Bouret, SG.** (2010). Neurodevelopmental actions of leptin. *International Brain Research Organization*, 1350: 2-9.
4. **Bouret, SG. y Simerly, RB.** (2006). Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clinical genetics*, 70(4): 295-301.
5. **Burns, JK.** (2013). Pathways from Cannabis to Psychosis: A Review of the Evidence. *Frontiers in psychiatry*, 4(128).
6. **Calder, PC., Krauss-Etschmann, S., de Jong, EC., Dupont, C., Frick, JS., Frokiaer, H., Heinrich, J., Garn, H., Koletzko, S., Lack, G., Mattelio, G., Renz, H., Sangild, PT., Schrezenmeir, J., Stulnig, TM., Thymann, T., Wold, AE. y Koletzko, B.** (2006). Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *The British journal of nutrition*, 96(4): 774-790.
7. **Carbone, F., La Rocca, C. y Matarese, G.** (2012). Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie*, 94(10): 2082-2088.
8. **Charmandari, E., Kino, T., Souvatzoglou, E. y Chrousos, GP.** (2003). Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Hormone research*, 59(4): 161-179.
9. **Cirulli, F., Francia, N., Berry, A., Aloe, L., Alleva, E. y Suomi, SJ.** (2009). Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 33(4): 573-585.
10. **Cottrell, EC., Cripps, RL., Duncan, JS., Barrett, P., Mercer, JG., Herwig, A. y Ozanne, SE.** (2009). Developmental changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 296(3): R631-639.
11. **Cottrell, EC. y Ozanne, SE.** (2008). Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiology & behavior*, 94(1): 17-28.
12. **Dalamaga, M., Chou, SH., Shields, K., Papageorgiou, P., Polyzos, SA. y Mantzoros, CS.** (2013). Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell metabolism*, 18(1): 29-42.
13. **De la Fuente, M., Llorente, R., Baeza, I., De Castro, NM., Arranz, L., Cruces, J., Viveros, MP.** (2009). Early maternal deprivation in rats: a proposed animal model for the study of developmental neuroimmunoendocrine interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153: 176-186.
14. **Delahaye, F., Breton, C., Risold, PY., Enache, M., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., Lesage, J. y Vieau, D.** (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology*, 149(2): 470-475.
15. **Ellenbroek, BA., de Bruin, N., van Den Kroonenburg, P., van Luijtelaaar, E. y Cools, A.** (2004). The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult Wistar rats. *Biological psychiatry*, 55(7): 701-707.
16. **Ellenbroek, BA. y Cools, AR.** (2000). The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background. *Neuropsychopharmacology*, 23(1): 99-106.
17. **Ellenbroek, BA., Derks, N. y Park, HJ.** (2005). Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress*, 8(4): 247-257.
18. **Ellenbroek, BA., Riva, MA.** (2003). Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia. *Clinical neuroscience research*, 3: 297-302.
19. **Fantuzzi, G.** (2009). Three questions about leptin and immunity. *Brain, behavior, and immunity*, 23(4): 405-410.
20. **Farooqi, IS., Matarese, G., Lord, GM., Keogh, JM., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, SA., Perna, F., Fontana, S., Lechler, RI., DePaoli, AM. y O'Rahilly, S.** (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congeni-

- tal leptin deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 110(8): 1093-1103.
21. **Fatemi, S. y Folsom, T.** (2009). The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophrenia bulletin*, 35(3): 528-548.
  22. **Fernández-Espejo, E., Viveros, MP., Nunez, L., Ellenbroek, BA. y Rodríguez de Fonseca, F.** (2009). Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 206(4): 531-549.
  23. **Gaffuri, AL., Ladarre, D. y Lenkei, Z.** (2012). Type-1 cannabinoid receptor signaling in neuronal development. *Pharmacology*, 90(1-2): 19-39.
  24. **Garza, JC., Guo, M., Zhang, W. y Lu, XY.** (2008). Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *Journal of chemical biology*, 283(26): 18238-18247.
  25. **Gruss, M., Braun, K., Frey, JU. y Korz, V.** (2008). Maternal separation during a specific postnatal time window prevents reinforcement of hippocampal long-term potentiation in adolescent rats. *Neuroscience*, 152(1): 1-7.
  26. **Hill, MN., Patel, S., Campolongo, P., Tasker, JG., Wotjak, CT. y Bains, JS.** (2010). Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(45): 14980-14986.
  27. **Kendler, K., Sheth, K., Gardner, C. y Prescott, C.** (2002). Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychological medicine*, 32(7): 1187-1194.
  28. **Kumral, A., Yesilirmak, DC., Sozmen, S., Ergur, BU., Tugyan, K., Ozbal, S., Guclu, S., Duman, N. y Ozkan, H.** (2012). Effect of leptin treatment on neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *The Journal of maternal-fetal medicine*, 25(2): 141-146.
  29. **La Cava, A. y Matarese, G.** (2004). The weight of leptin in immunity. *Nature reviews. Immunology*, 4(5): 371-379.
  30. **Landry, D., Cloutier, F. y Martin, LJ.** (2013). Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. *Reproductive biology*, 13(1): 1-14.
  31. **Levine, S.** (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*, 30(10): 939-946.
  32. **Llorente, R., Arranz, L., Marco, EM., Moreno, E., Puerto, M., Guaza, C., De la Fuente, M. y Viveros, MP.** (2007). Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(6): 636-650.
  33. **Llorente, R., Gallardo, ML., Berzal, AL., Prada, C., García-Segura, LM. y Viveros, MP.** (2009). Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience.*, 27(3): 233-241.
  34. **Llorente, R., Llorente-Berzal, A., Petrosino, S., Marco, EM., Guaza, C., Prada, C., López-Gallardo, M., Di Marzo, V. y Viveros, MP.** (2008). Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. *Developmental neurobiology*, 68(11): 1334-1347.
  35. **Llorente, R., Miguel-Blanco, C., Aisa, B., Lachize, S., Borcel, E., Meijer, OC., Ramírez, MJ., De Kloet, ER. y Viveros, MP.** (2011). Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. *Journal of neuroendocrinology*, 23(4): 329-344.
  36. **Llorente, R., O'Shea, E., Gutiérrez-López, MD., Llorente-Berzal, A., Colado, ML., Viveros, MP.** (2010). Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. *Neuroscience letters*, 479(2): 112-117.
  37. **Llorente, R., Villa, P., Marco, EM. y Viveros, MP.** (2012). Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain: a proton nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroscience*, 201: 12-19.
  38. **Llorente-Berzal, A., Fuentes, S., Gagliano, H., López-Gallardo, M., Armario, A., Viveros, MP. y Nadal, R.** (2011). Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addiction biology*, 16(4): 624-637.
  39. **López-Gallardo, M., Llorente, R., Llorente-Berzal, A., Marco, EM., Prada, C., Di Marzo, V. y Viveros, MP.** (2008). Neuronal and glial alterations in the cerebellar cortex of maternally deprived rats: gender differences and modulatory effects of two inhibitors of endocannabinoid inactivation. *Developmental neurobiology*, 68(12): 1429-1440.

40. **Marco, E., Adriani, W., Llorente, R., Laviola, G. y Viveros, M.** (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 33(4): 498-507.
41. **Marco, EM., Adriani, W., Canese, R., Podo, F., Viveros, MP. y Laviola, G.** (2007). Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: Modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 86(2): 334-345.
42. **Marco, EM., Valero, M., de la Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramírez, MJ. y Viveros, MP.** (2013). Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology*, 68: 223-231.
43. **Mela, V., Llorente-Berzal, Á., Díaz, F., Argentine, J., Viveros, MP. y Chowen, JA.** (2012). Maternal deprivation exacerbates the response to a high fat diet in a sexually dimorphic manner. *PLoS One*, 7(11): e48915.
44. **Moffett, MC., Vicentic, A., Kozel, M., Plotsky, P., Francis, DD., Kuhar, MJ.** (2007). Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochemical pharmacology*, 73(3): 321-330.
45. **Morgan, C., Kirkbride, J., Leff, J., Craig, T., Hutchinson, G., McKenzie, K., Morgan, K., Dazzan, P., Doody, GA., Jones, P., Murray, R. y Fearon, P.** (2007). Parental separation, loss and psychosis in different ethnic groups: a case-control study. *Psychological medicine*, 37(4): 495-503.
46. **Oomura, Y., Hori, N., Shiraishi, T., Fukunaga, K., Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., Ishibashi, M., Aou, S., Li, XL., Kohno, D., Uramura, K., Sougawa, H., Yada, T., Wayner, MJ. y Sasaki, K.** (2006). Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides*, 27(11): 2738-2749.
47. **Owen, MJ., O'Donovan, MC., Thapar, A. y Craddock, N.** (2011). Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: the journal of mental science, 198(3): 173-175.
48. **Palmer, AC.** (2011). Nutritionally mediated programming of the developing immune system. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 2(5): 377-395.
49. **Paz-Filho, G., Wong, ML. y Licinio, J.** (2010). The procognitive effects of leptin in the brain and their clinical implications. *International journal of clinical practice*, 64(13): 1808-1812.
50. **Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, BA. y Riva, MA.** (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Molecular psychiatry*, 7(6): 609-616.
51. **Roubos, EW., Dahmen, M., Kozicz, T. y Xu, L.** (2012). Leptin and the hypothalamo-pituitary-adrenal stress axis. *General and comparative endocrinology*, 177(1): 28-36.
52. **Signore, AP., Zhang, F., Weng, Z., Gao, Y. y Chen, J.** (2008). Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *Journal of neurochemistry*, 106(5): 1977-1990.
53. **Suárez, J., Llorente, R., Romero-Zerbo, SY., Mateos, B., Bermúdez-Silva, FJ., de Fonseca, FR. y Viveros, MP.** (2009). Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB (1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus*, 19(7): 623-632.
54. **Suárez, J., Rivera, P., Llorente, R., Romero-Zerbo, SY., Bermúdez-Silva, FJ., de Fonseca, FR. y Viveros, MP.** (2010). Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. *Brain research*, 1349: 162-173.
55. **Tyrka, AR., Wier, L., Price, LH., Ross, NS. y Carpenter, LL.** (2008). Childhood parental loss and adult psychopathology: effects of loss characteristics and contextual factors. *International journal of psychiatry in medicine*, 38(3): 329-344.
56. **Udagawa, J., Hashimoto, R., Suzuki, H., Hattai, T., Sotomaru, Y., Hioki, K., Kagohashi, Y., Nomura, T., Minami, Y. y Otani, H.** (2006). The role of leptin in the development of the cerebral cortex in mouse embryos. *Endocrinology*, 147(2): 647-658.
57. **Varga, J., Ferenczi, S., Kovács, KJ., Garafova, A., Jezova, D. y Zelena, D.** (2013). Comparison of stress-induced changes in adults and pups: is aldosterone the main adrenocortical stress hormone during the perinatal period in rats? *PLoS One*, 8(9): e72313.
58. **Vázquez, DM. y Levine, S.** (2005). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in post-natal life. En Steckler, T., Kalin, NH. y Reul, JM (Eds), *Handbook of stress and the brain*, vol. 2 (3-21). Amsterdam: Elsevier.

- 
59. **Viveros, MP., Díaz, F., Mateos, B., Rodríguez, N., Chowen, JA.** (2010). Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Hormones and behavior*, 57(4-5): 405-414.
60. **Viveros, MP., Llorente, R., López-Gallardo, M., Suárez, J., Bermúdez-Silva, F., De la Fuente, M., Rodríguez de Fonseca, F. y García-Segura, L.** (2009). Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1: S217-226.
61. **Viveros, MP., Llorente, R., Díaz, F., Romero-Zerbo, SY., Bermúdez-Silva, FJ., Rodríguez de Fonseca, F., Argente, J. y Chowen, JA.** (2010b). Maternal deprivation has sexually dimorphic long-term effects on hypothalamic cell-turnover, body weight and circulating hormone levels. *Hormones and behavior*, 58(5): 808-819.
62. **Viveros, MP., Llorente, R., Moreno, E. y Marco, EM.** (2005). Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behavioural pharmacology*, 16(5-6): 353-362.
63. **Viveros, MP., Llorente, R., Suárez, J., Llorente-Berzal, A., López-Gallardo, M. y de Fonseca, FR.** (2012a). The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications. *Journal of psychopharmacology* (Oxford, England), 26(1): 164-176.
64. **Viveros, MP., Mendrek, A., Paus, T., López-Rodríguez, AB., Marco, EM., Yehuda, R., Cohen, H., Lehrner, A. y Wagner, EJ.** (2012b). A comparative, developmental, and clinical perspective of neurobehavioral sexual dimorphisms. *Frontiers in neuroscience*, 6: 84.
65. **Walker, CD., Naef, L., d'Asti, E., Long, H., Xu, Z., Moreau, A. y Azeddine, B.** (2008). Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1144: 189-202.
66. **Zupancic, ML. y Mahajan, A.** (2011). Leptin as a neuroactive agent. *Psychosomatic medicine*, 73(5): 407-414.